

Anreicherung und Charakterisierung von TRPV- und TRPC-Proteinen

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

vorgelegt von
Tobias Stumpf

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 21.10.2011

Promotionskommission: Vorsitzender: Prof. Dr. Stefan Kins
Referentin: Jun.Prof. Dr. Claudia Fecher-Trost
Koreferent: Prof. Dr. Eckhard Friauf

Kaiserslautern, Juli 2011

D386

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

Kaiserslautern, den 11. Juli 2011

Tobias Stumpf

Teile der Arbeit sind veröffentlicht in:

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.

Wischang D., Hartung J., Hahn T., Ulber R., Stumpf T., Fecher-Trost C. (2011): Vanadate(v)-dependent bromoperoxidase immobilized on magnetic beads as reusable catalyst for oxidative bromination. *Green Chemistry.* 13: 102-108

Zitate:

„Membranproteine solubilisieren benötigt wenig Intelligenz, aber Fleiß und Ausdauer“

und

„Das Lösungsverhalten integraler Membranproteine ist so wenig vorhersehbar, wie welche Seife sie für ihr spezielles Problem benutzen sollten oder wie das Wetter zu Weihnachten wird.“

(Hubert Rehm)

Inhaltsverzeichnis

1.....	Abkürzungsverzeichnis	1
2.....	Einleitung	2
2.1.	Der Kalziumtransport in Epithelgeweben	2
2.2.	Der Kalziumtransport in der Plazenta	3
2.3.	Die TRPV-Familie in der TRP-Superfamilie.....	4
2.4.	Das TRPV6-Protein	7
2.4.1.	Der Aufbau des TRPV6-Proteins.....	8
2.4.2.	Regulation des TRPV6-Proteins.....	9
2.4.3.	Effekte der TRPV6-Deletion oder -Überexpression in Geweben	11
2.5.	TRPC6 und die TRPC-Familie	12
2.5.1.	Direkte und indirekte Regulation des TRPC6-Proteins	13
2.5.2.	Effekte der TRPC6-Deletion oder -Überexpression in Geweben	14
2.6.	Zielsetzung der Doktorarbeit	15
3.....	Material und Methoden.....	16
3.1.	Material.....	16
3.1.1.	Geräte.....	16
3.1.2.	Chemikalien und Materialien	17
3.1.3.	Primärantikörper.....	18
3.1.4.	Sekundärantikörper	18
3.1.5.	Proteinmarker	19
3.1.6.	allgemein verwendete Lösungen.....	19
3.2.	Methoden.....	20
3.2.1.	Mikrosomenpräparation aus humaner Plazenta	20
3.2.2.	Proteinbestimmung nach der BCA-Methode	20
3.2.3.	Schnelltest zum Proteinnachweis (Coomassie-Schnelltest)	21
3.2.4.	Gewinnung von Antikörpern aus Hybridomaüberständen und Blutseren mittels einer Peptidsäule mit NHS (N-Hydroxy-Succinimid)-aktiviertem Sepharose-Säulenmaterial.....	21
3.2.5.	Gewinnung von Antikörpern aus Hybridomaüberständen und Blutseren mittels einer Protein A- bzw. G-gekoppelten Agarosesäule	22
3.2.6.	Herstellung einer Antikörpersäule durch Kopplung des Antikörpers an NHS- aktivierte Sepharose	22
3.2.7.	Affinitätschromatographie.....	23
3.2.7.1.	Affinitätssäulenchromatographie von TRPV6 aus humaner Plazenta	24
3.2.7.2.	Solubilisierung von Proteinen aus der mikrosomalen Fraktion des humanen Plazentagewebes	24
3.2.7.3.	Aufreinigungstechniken der Affinitätssäulenchromatographie.....	25

3.2.7.4. Affinitätssäulenchromatographie von TRPC6 aus Mastzellen und aus muriner Lunge von Wildtyp- und TRPC6-Knockout-Tieren	27
3.2.8. <i>in vitro</i> -Translation (ivTL).....	27
3.2.9. Immun-/Coimmunpräzipitation.....	28
3.2.9.1. Herstellung der Proteinextrakte aus humanen und murinen Geweben und Mastzellen für die Coimmunpräzipitation	28
3.2.9.2. Durchführung der Coimmunpräzipitation	29
3.2.10. TRPV6-Peptidblotanalyse mit ivTL-Produkten.....	30
3.2.11. Aufreinigung von Cyclophilin B.....	31
3.2.11.1. Aufreinigung aus Kuhmilch.....	31
3.2.11.2. Aufreinigung aus transformierten Bakterien.....	31
3.2.11.3. Aufreinigung von CyPB aus humaner Plazenta	33
3.2.12. Chymotrypsin-Aktivitätsassay zur Beurteilung der Cyclophilin B-Aktivität.....	33
3.2.13. Reinigung von TRPV6-GST-Fusionsproteinen	34
3.2.14. GST-Pulldown-Analyse	35
3.2.15. Saccharosedichtegradientenzentrifugation.....	36
3.2.16. Eindimensionale Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (1D-SDS-PAGE)	37
3.2.17. „Blue Native“ Gelelektrophorese zur Isolierung des TRPV6-Proteinkomplexes .	38
3.2.18. Silbernitratfärbung	40
3.2.19. Coomassie-Färbung.....	41
3.2.20. Kolloidale Coomassie-Färbung	42
3.2.21. „Blue Silver“-Färbung	42
3.2.22. Färbung mit RapidStain.....	43
3.2.23. Western-Blot	43
3.2.24. Ablösen von Antikörpern von der Western-Blot-Membran	44
3.2.25. Proteinfällung mit Trichloressigsäure (TCA)	45
3.2.26. Vorbereitung der Proteinbanden bzw. Proteinspots für die MALDI-ToF-Massenspektrometrie	45
3.2.27. Tryptischer Verdau	46
3.2.28. Extraktion der Peptide aus dem Polyacrylamidgel und Vorbereitung der MALDI-ToF-Massenspektrometrie	47
3.2.29. Durchführung der MALDI-ToF-Massenspektrometrie	47
3.2.30. Analyse der Daten aus der MALDI-ToF-Massenspektrometrie.....	48
4..... Ergebnisse	49
4.1. Nachweis der TRPV6 – Cyclophilin B Interaktion	49
4.1.1. Detektion von TRPV6 und Cyclophilin B in Eluaten der Affinitätschromatographie der Calmodulinsäule	49
4.1.2. Coimmunpräzipitationen mit ivTL-Produkten und TRPV6-spezifischen Antikörpern.....	53

4.1.3.	Coimmunpräzipitationen von TRPV6 aus Mikrosomen von humaner Plazenta mit TRPV6-spezifischen Antikörpern	55
4.1.4.	Saccharosedichtegradientenzentrifugation.....	57
4.1.5.	Einengen der Bindestelle von Cyclophilin B auf TRPV6 mittels TRPV6-Peptidblot.....	59
4.1.6.	Reinigung von endogen exprimiertem Cyclophilin B.....	61
4.1.6.1.	Reinigung von CyPB aus Kuhmilch	62
4.1.6.2.	Anreicherung von rekombinantem, humanem CyPB aus <i>E. coli</i> -Bakterien ..	64
4.1.6.3.	Anreicherung von humanem CyPB aus Plazentagewebe	67
4.1.7.	Aktivitätstest von gereinigtem Cyclophilin B	70
4.1.8.	GST-Pulldownanalyse mit Plazentagewebeextrakt	71
4.2.	Herstellung und Überprüfung neuer polyklonaler TRPV6-Antikörper-Affinitätschromatographiesäulen	73
4.3.	Isolation von TRPV6 aus muriner Plazenta	75
4.4.	Solubilisierung und Affinitätschromatographie von TRPV6 aus humanem Plazentagewebe	76
4.4.1.	Testung der Eignung von Natriumdeoxycholat, CHAPS und Nonidet P-40 für die mehrstufige Affinitätschromatographie.....	76
4.4.2.	Vergleich verschiedener Färbemethoden von Proteingelen	79
4.4.3.	Eignung von Natriumdeoxycholat, Nonidet P-40, Thesit und Dodecyl- β -D-maltosid für die einstufige Affinitätschromatographie	81
4.4.4.	Optimierung der Blue Native-Gelelektrophorese-Methode	84
4.5.	Blue Native-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) mit affinitätsgereinigten TRPV6-Multiproteinkomplexen.....	86
4.5.1.	Anreicherung des TRPV6-Proteinkomplexes nach DDM-Solubilisierung mittels Antikörper-Affinitätsreinigung und anschließende Blue Native-PAGE	86
4.5.2.	Anreicherung des TRPV6-Proteinkomplexes nach Digitonin-Solubilisierung mittels Antikörper-Affinitätsreinigung und anschließende Blue Native-PAGE	89
4.5.3.	Anreicherung des TRPV6-Proteinkomplexes nach Triton-X-100-Solubilisierung mittels Antikörper-Affinitätsreinigung und anschließende Blue Native-PAGE.....	93
4.6.	Nachweis und Anreicherung des TRPC6-Proteins in murinen Mastzellen und murinem Lungengewebe.....	95
4.6.1.	Immunpräzipitation von TRPC6 aus Mastzellen	95
4.6.2.	Antikörper-Affinitätschromatographie des TRPC6-Proteins aus Mastzellen.....	97
4.6.3.	Immunpräzipitation des TRPC6-Proteins aus Mauslunge.....	98
4.6.4.	Affinitätschromatographie aus muriner Lunge von Wildtyp- und TRPC6-KnockOut-Mäusen	100
5.....	Diskussion.....	102
5.1.	Nachweis und Charakterisierung der TRPV6 – Cyclophilin B- Interaktion	104
5.1.1.	Die Cyclophilin B-TRPV6-Interaktion ist unter definierten Bedingungen nachweisbar.....	104
5.1.2.	Das TRPV6-Protein bildet Multimere.....	106

5.1.3. Mögliche Bindestellen von Cyclophilin B im TRPV6-Protein	107
5.1.4. Mögliche Funktionen der TRPV6-Cyclophilin B-Interaktion	111
5.2. Optimierungsstrategien zur Isolierung der niedrig exprimierten, integralen TRP-Membranproteinen.....	118
5.2.1.1. Das TRPV6-Protein kann auch aus muriner Plazenta isoliert werden.....	119
5.2.1.2. Verwendbarkeit von verschiedenen Detergenzien für die mehrstufige Affinitätschromatographie	120
5.2.1.3. Dodecyl- β -D-maltosid (DDM) und Digitonin sind für die einstufige TRPV6-Affinitätschromatographie verwendbar	121
5.3. TRPV6-Multiproteinkomplexe besitzen eine Größe von mindestens 440 kDa	122
5.4. Die etablierte TRPV6-Isolierungsmethode ist auch auf den TRPC6-Kanal in Mastzellen und murinem Lungengewebe übertragbar.....	124
6..... Zusammenfassung	126
7..... Anhang.....	127
7.1. Ergebnistabellen der MALDI-ToF-Massenspektrometrie	127
8..... Literaturverzeichnis	141
Danksagung	153
Lebenslauf.....	155

1. Abkürzungsverzeichnis

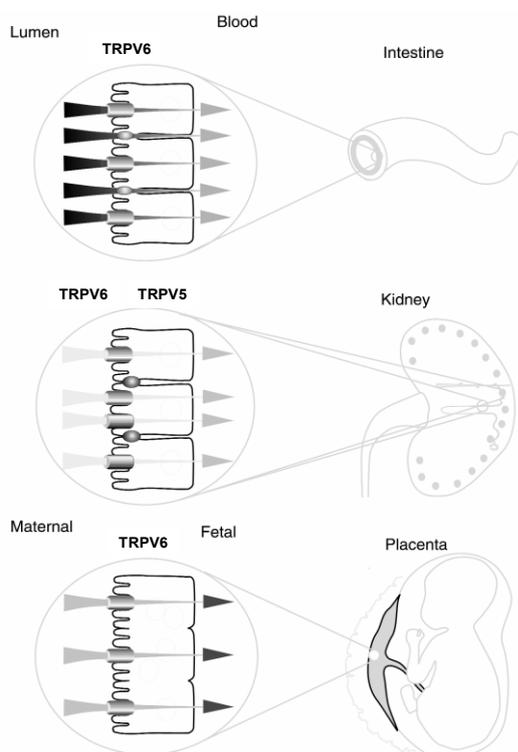
Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Abkürzungen.

µg	Mikrogramm	MALDI	Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisierung
µl	Mikroliter	MAPKinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
1D	eindimensional	mg	Milligramm
2-APB	2-Aminoethoxyphenylborat	Min	Minute
2D	zweidimensional	ml	Milliliter
Å	Ångström	mM	millimolar
Abb.	Abbildung	mRNS	messenger Ribonukleinsäure
ADP	Adenosin-disphosphat	MW	Molekulargewicht
AK	Antikörper	NCBI	National Centre for Biotechnology Information
Ala	Alanin	NCX	Natrium-Kalzium-Tauscher
APS	Ammoniumpersulfat	NHERF	Na ⁺ /H ⁺ exchanger regulatory factor
ARD	Ankyrinwiederholungsdomäne	NKA	Natrium-Kalium-ATPase
AS	Aminosäure	nm	Nanometer
Asn	Asparagin	NO	Stickstoffoxid
ATP	Adenosin-triphosphat	OAG	1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol
BCA	2,2'-Bichinolin-4,4'-Dicarbonsäure	OD	optische Dichte
BPH	benigne Prostatahyperplasie	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
BSA	Rinderserumalbumin	PCMA	plasmamembranäre Kalzium-ATPase
CaM	Calmodulin	PDZ	Post synaptic density, Discs, Zonula occludentes-1
cAMP	zyklisches Adenosin-monophosphat	pl	isoelektrischer Punkt
CaT1	Kalziumtransportprotein 1	PI(3)K	Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase
CaT-L	Kalziumtransportprotein-ähnlich	PIP ₂	Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat
cGMP	zyklisches Guanosin-monophosphat	PKA	Proteinkinase A
Da	Dalton	PKC	Proteinkinase C
DAG	Diazylglyzerol	PLC	Phospholipase C
DDM	Dodecyl-β-D-maltosid	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
DNS	Desoxyribonukleinsäure	Pro	Prolin
DTT	Dithiothreitol	PTH	Parathormon
ECaC2	Epithelialer Kalziumkanal 2	RGS	Regulator der G-Protein Signalisierung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	ROC	rezeptorgesteuerter Kalziumkanal
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-Tetraessigsäure	rpm	Umdrehung pro Minute
ER	Endoplasmatische Reticulum	RT	Raumtemperatur
ESI	Elektronenspray-Ionisation	SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>et al.</i>	und andere	SGK	Serum- und glukokortikoid-induzierbare Kinase
FKBP	FK506-Bindeprotein	SOC	speichergesteuerter Kalziumkanal
FSGS	Fokal segmentale Glomerulosklerose	SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
g	Gramm	Std.	Stunde
GDP	Guanosin-5-diphosphat	TBS	TRIS-gepufferte Salzlösung
GPCR	G-Protein gekoppelten Rezeptoren	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
GST	Glutathion-S-Transferase	TFA	Trifluoressigsäure
GTP	Guanosin-5-triphosphat	Thr	Threonin
HCG	Humanes Choriongonadotropin	TM	Transmembrandomäne
HCl	Salzsäure	ToF	Time of Flight, Flugzeit
HCS	Humanes Chorionsomatomammotropin	TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethansulfonsäure	TRP	Transientes Rezeptorpotential
HRPO	Horseradish Peroxidase (Meerrettich Peroxidase)	V	Volt
IAA	Iodacetamid	v/v	volume per volume
IEF	isoelektrische Fokussierung	VDCC	spannungsgesteuerter Kalziumkanal
Ile	Isoleucin	VDR	Vitamin D-Rezeptor
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphate	VDRE	Vitamin D-Antwortelement
kDa	Kilodalton	Vh	Voltstunden
Konz.	Konzentration	W	Watt
l	Liter	w/v	weight per volume
M	Molar	xg	x-fache der Erdbeschleunigung
mA	Milliampere		

2. Einleitung

2.1. Der Kalziumtransport in Epithelgeweben

Kalzium bzw. das Kalziumion (Ca^{2+}) ist entscheidend an der Muskelkontraktion, dem Aufbau der Knochen, der Freisetzung von Hormonen und Transmittern, sowie der Blutgerinnung beteiligt (Schmidt, 2001; Berridge et al., 2003; Campbell und Reece, 2006; Flockerzi, 2009). 99% des körpereigenen Kalzium (ca. 1200 g) ist in die Knochen eingelagert (Flockerzi, 2009) und beträgt damit ca. 1,5 % des gesamten Körpergewichts (Campbell und Reece, 2006).



In nichterregbaren Zellen erfolgt die Aufnahme von Kalzium über Epithelzellen, welche u.a. in der Niere, im Dünndarm und in der Plazenta vorkommen. Dabei gibt es Unterschiede im Kalziumtransport. Im Dünndarm erfolgt er sowohl trans- als auch parazellulär (über die *tight junctions*). In der Niere und in der Plazenta ist der transzelluläre Weg obligatorisch (Abb. 1), obwohl bei hohen Ca^{2+} -Konzentrationen (≥ 1 mM) im Lumen der Nieren auch schon der parazelluläre Transport (Abb. 2) beobachtet wurde (Hoenderop et al., 2005; Suzuki et al., 2008b). Kalziumselektive Kanalproteine der „transient receptor potential“-Proteinfamilie (TRPV5 und TRPV6) sind in allen drei Transportepithelien für den Transport verantwortlich.

Abb. 1: Kalziumtransportierende Epithelgewebe (modifiziert nach Peng et al., 2003). Der Kalziumtransport erfolgt über Epithelzellen des Dünndarms trans- und parazellulär, über die Epithelzellen von Niere und Plazenta transzellulär. Die kalziumselektiven Kanalproteine TRPV5 und TRPV6 sind hauptsächlich für den Transport verantwortlich.

Am Beispiel einer Nierenepithelzelle (Abb. 2) gezeigt, strömt Ca^{2+} apikal, d.h. von Seiten des Lumens, entlang des elektrochemischen Gradienten über die Kanalproteine TRPV5 und TRPV6 in die Zelle ein. Der Gradient entsteht durch einen ca. 10.000-20.000fachen Konzentrationsunterschied zwischen extrazellulärer (ca. 1-2 mM) und zytosolischer (ca. 100 nM) Kalziumkonzentration (Clapham, 1995; Alberts et al., 2001; Flockerzi, 2009). Intrazellulär sorgen Ca^{2+} -bindende Proteine, wie z.B. Calbindin-D für den Transport durch die Zelle zur basolateralen, dem Blut zugewandten, Seite. Der Transport von Ca^{2+} über die basolaterale Plasmamembran ins Blut erfolgt entgegen des elektrochemischen Gradienten über die Ca^{2+} -ATPase und den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher unter Energieverbrauch.

Im Epithelgewebe der Plazenta stellt man sich den Ca^{2+} -Transport ähnlich vor, auch wenn dieser Mechanismus und die daran beteiligten Proteine noch nicht vollständig aufgeklärt sind.

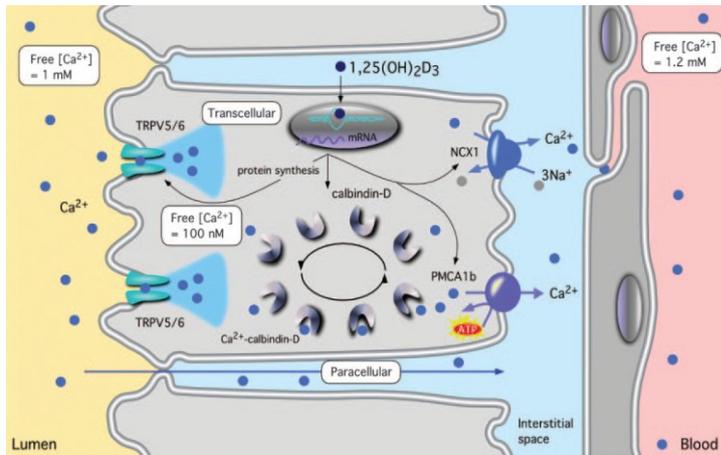


Abb. 2: Kalziumtransport am Beispiel einer Nierenepithelzelle. TRPV5 und TRPV6 leiten Ca^{2+} in die Zelle, dieses wird von Calbindin-D zur basolateralen Seite geleitet und dort vom $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) und der plasmamembranären Ca^{2+} -ATPase (PMCA) wieder aus der Zelle in den Blutkreislauf der Niere geschleust (Hoenderop et al., 2005).

2.2. Der Kalziumtransport in der Plazenta

Über die Plazenta (Mutterkuchen) wird der Fötus mit Nährstoffen (z.B. Glukose, Aminosäuren, Mineralien, Spurenelementen) und Sauerstoff versorgt (Sibley et al., 1997; Schmidt, 2000). Sie besteht aus einem kindlichen und einem mütterlichen Teil. Während der Implantation zu Beginn der Schwangerschaft verwächst der Trophoblast der Blastozyste mit der Uterusschleimhaut der Mutter (Abb. 3). Die entstehenden embryonalen Chorionzotten enthalten ein Kapillargeflecht und werden dort in sog. Blutlakunen vom maternalen Blut umspült (Campbell und Reece, 2006).

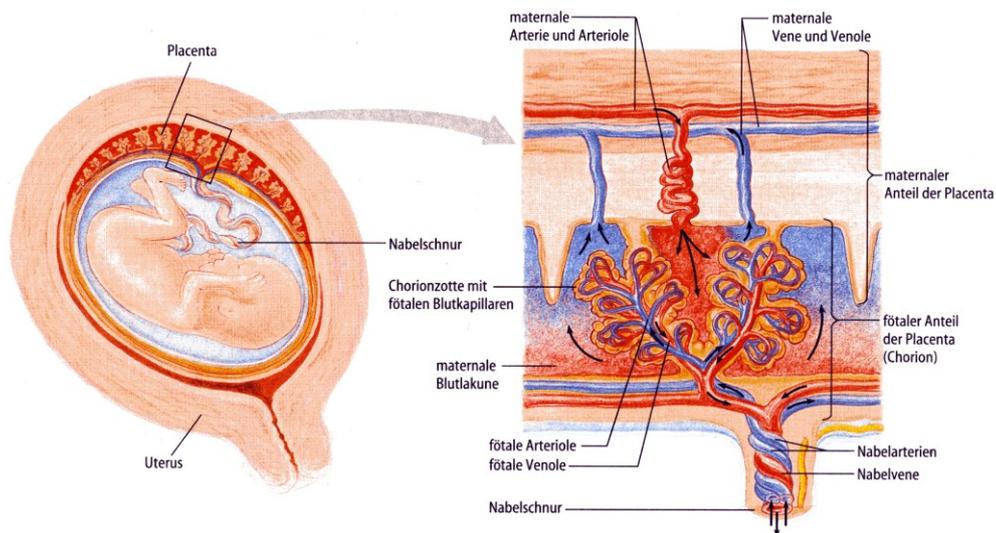
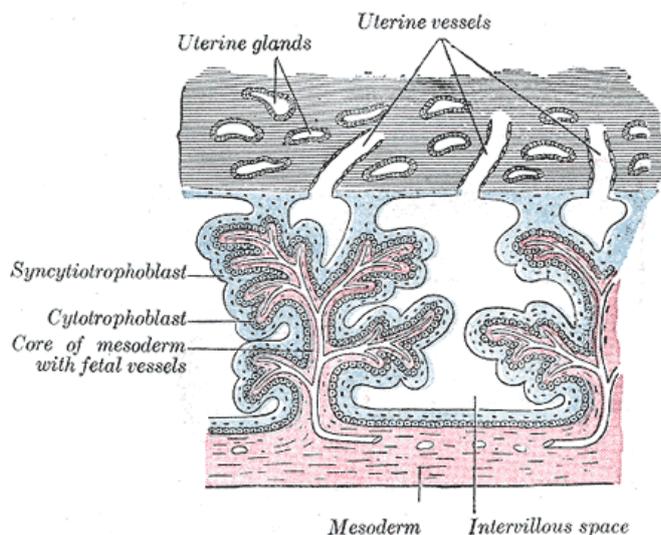


Abb. 3: Blutkreislaufsystem der Plazenta (Campbell und Reece, 2006). Der Blutkreislauf des Fötus reicht über die Nabelschnur bis in die Plazenta. Hier umspült das maternale Blut die fötale Chorionzotte und gewährleistet damit die Versorgung des Kindes mit Sauerstoff und lebenswichtigen Nährstoffen.

Die äußere, polynukleäre Zellschicht der Chorionzotten, der Synzytiotrophoblast (Abb. 4), entwickelt sich aus dem Trophoblasten und besitzt keine Interzellularspalten (tight junctions) (Welsch und Sobotta, 2006). Das Synzytium produziert mit Progesteron, Östriol, Östron, 17β -

Östradiol, HCG, HCS und Relaxin Hormone, die zur Aufrechterhaltung der Schwangerschaft und für die Entwicklung und die Reifung von Uterus und Fötus benötigt werden.

Der Austausch der Stoffe vom mütterlichen zum kindlichen Blutkreislauf und umgekehrt erfolgt durch Diffusion, bzw. aktiven und selektiven Transport (Campbell und Reece, 2006). Insgesamt werden während der Schwangerschaft 30 g Kalzium von der Mutter zum Kind transportiert (Lafond et al., 2001), wobei 80 % der Gesamtkalziummenge erst im letzten Drittel der Schwangerschaft die Plazentaepithelzellen passieren (Suzuki et al., 2008a). Der Kalziumeinstrom in die Synzytiotrophoblastenzelle erfolgt vermutlich ähnlich wie in der Nierenepithelzelle (2.1). TRPV5- und TRPV6-Proteine fungieren sehr wahrscheinlich als hoch selektive Kalziumkanäle in diesen Zellen (Hoenderop et al., 1999; Wissenbach et al., 2001; Belkacemi et al., 2005; Bernucci et al., 2006). Spannungs- und speichergesteuerte Ca^{2+} -Kanäle werden auch in Plazentagewebe, z.B. der Maus (Singh et al., 2007), exprimiert. Ihre Funktion ist noch unbekannt. Eine Beteiligung an Ca^{2+} -transportierenden Prozessen kann für



diese Kanäle ausgeschlossen werden, da ihre Blocker und Modulatoren, im Gegensatz zu denen von TRPV5 und TRPV6, die Ca^{2+} -Aufnahme in Trophoblastenzellen nicht beeinflussen (Moreau et al., 2002).

Abb. 4: Aufbau des Synzytiotrophoblasten (Henry Gray, 2000). Detailsicht der vom Synzytiotrophoblasten (hellblau) umgebenen Chorionzotten. Diese polynukleäre Zellschicht grenzt den mütterlichen vom kindlichen Blutkreislauf ab und ermöglicht die Kontrolle des Stoffaustauschs zwischen beiden Kompartimenten.

2.3. Die TRPV-Familie in der TRP-Superfamilie

Der Name *transient receptor potential (TRP)* beruht auf der Entdeckung einer *Drosophila melanogaster*-Mutante, die mit einem transienten anstatt plateauförmigen Signal auf einen Lichtreiz antwortet (Montell und Rubin, 1989; Wong et al., 1989). Das zugrunde liegende TRP-Protein, das in den Photorezeptorzellen der Fruchtfliege exprimiert wird, bildet mit anderen Proteinen einen Proteinkomplex, der den Lichtreiz in eine Depolarisation der Zellen umwandelt. Der Komplex enthält neben dem TRP-Protein das Strukturprotein INAD, zwei zu TRP homologe Kanäle, TRPL (TRP-like) (Phillips et al., 1992) und TRPy, sowie Calmodulin, Rhodopsin, Phospholipase C β und augenspezifische Proteinkinase C (Pedersen et al., 2005). Mittlerweile wurden insgesamt 39 verschiedene TRP-Proteine identifiziert, 28 TRP-Proteine im

Menschen, fünf in der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*), drei im Fadenwurm (*Caenorhabditis elegans*) und ein Vertreter im Zebrafährbling (*Danio rerio*) (Abb. 5).

Die Superfamilie gliedert sich auf Grund von Strukturhomologien in die sieben TRP-Familien TRPC, TRPV, TRPM, TRPP, TRPML, TRPA und TRPN, wobei die TRPN-Familie nicht im Menschen vorkommt (Clapham et al., 2003).

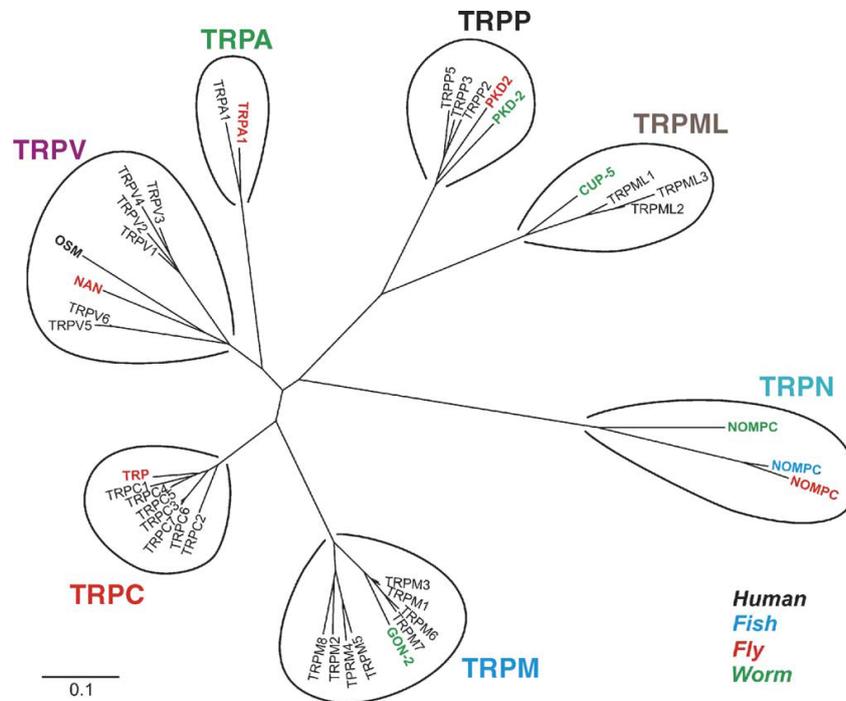


Abb. 5: Phylogenetischer Stammbaum der TRP-Proteinsuperfamilie und ihre Verteilung in verschiedenen Tierfamilien (Pedersen et al., 2005). Es existieren 7 TRP-Familien, die insgesamt 39 TRP-Proteine beinhalten und sich über die Spezies Mensch, Fisch, Fliege und Wurm erstrecken. Dabei können innerhalb der Familien Sequenzhomologien von unter 20 % auftreten (Clapham et al., 2003).

Übereinstimmend haben alle TRPs einen intrazellulären N- und C-Terminus, sowie sechs Transmembrandomänen (TM). Alle TRPCs und einige andere TRP-Proteine enthalten ein 25 Aminosäure lange Domäne mit der Konsensussequenz EWKFAR, die so genannte TRP-Box. Gemeinsam sind den TRP-Familien C, V und A die im N-Terminus enthaltenen Ankyrinwiederholungen (Clapham et al., 2003). Sequenzunterschiede liegen in den N- und C-Termini, sowie den die Transmembrandomänen verbindenden Schleifen vor. Im Bereich der Kanalpore ist die Aminosäuresequenz am stärksten konserviert (Ramsey et al., 2006). Die unterschiedlichen Strukturen der einzelnen Familien zeigt Abb. 6.

TRP-Ionenkanäle ermöglichen Ca^{2+} - und Na^{+} -Ionen den Ein- und Ausstrom in und aus der Zelle in Richtung ihres elektrochemischen Gradienten. Die daraus resultierenden Funktionen der einzelnen Vertreter sind sehr weitreichend. So werden TRP-Ionenkanäle in erregbaren und nicht erregbaren Zellen exprimiert und sind dort z.B. an der Reizübertragung beim Sehen, Schmecken, Hören, Riechen, Hitze- und Schmerzempfinden, sowie an der Mineralhomöostase beteiligt.

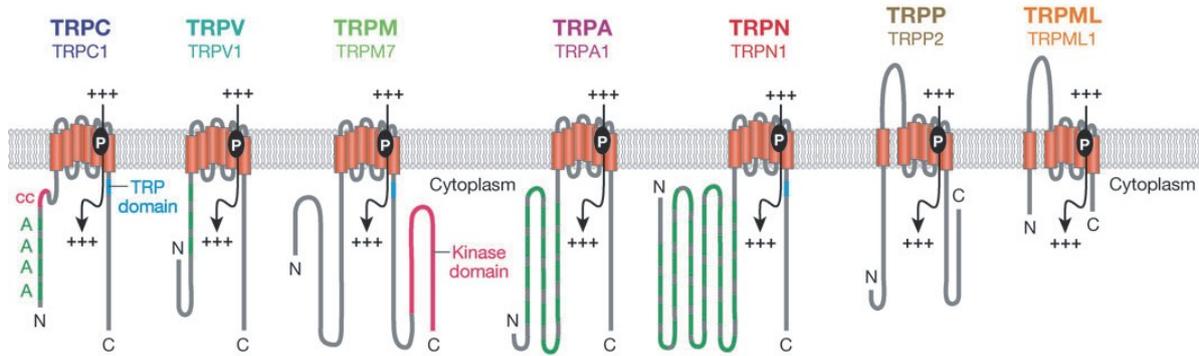


Abb. 6: Strukturen der verschiedenen TRP-Familien (Venkatachalam und Montell, 2007). Gemeinsam sind allen TRP-Proteinen 6 Transmembrandomänen (TM) und intrazelluläre N- und C-Termini. Die Strukturunterschiede liegen meist in den Längen der N- und C-Termini, sowie in den die TM verbindenden Bereiche.

Eine Vielzahl verschiedener Stimuli führen zur Aktivierung der TRP-Kanäle. Dazu zählen u.a. intra- und extrazelluläre Messenger, chemischer, mechanischer oder osmotischer Stress, sowie die Ca^{2+} -Konzentration in intrazellulären Speichern. Des Weiteren ist eine Aktivierung der Kanäle über ihre Phosphorylierungsstellen durch Serin/Threonin- und Tyrosinkinasen gezeigt (Pedersen et al., 2005). Man unterscheidet dabei drei verschiedene Arten der Aktivierung: 1. die rezeptorgesteuerte Aktivierung, 2. die ligandengesteuerte Aktivierung und 3. die direkte Aktivierung (Ramsey et al., 2006).

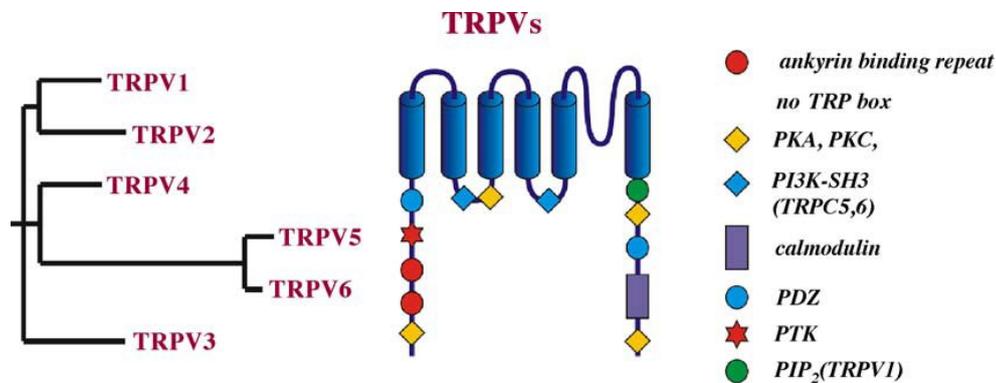


Abb. 7: Verwandtschaft und Struktur der humanen TRPV-Proteine (Pedersen et al., 2005). Die TRPV-Familie umfasst 6 Mitglieder. Die intrazellulären Bereiche beinhalten verschiedene Struktur- und Interaktionsdomänen.

Namensgeber der TRPV-Familie ist der Vanilloid-Rezeptor (TRPV1). Sein auswärtsgerichteter Ca^{2+} - und Mg^{2+} -selektiver Ionenstrom ist durch Vanilloidkomponenten (z.B. Capsaicin, ein Bestandteil der Chilischoten) oder Temperaturen über 43 °C aktivierbar und durch PKC sensibilisierbar. TRPV1 ist am Schärfe-, Schmerz- und Hitzeempfinden beteiligt, dient aber auch z.B. in der Harnblase als Dehnungssensor (Nilius und Voets, 2005). Des Weiteren wurde eine Beteiligung an pathophysiologischen Prozessen wie Entzündungen (z.B. der Bauchspeicheldrüse) und Asthma gezeigt (Nilius und Voets, 2005).

Die sechs im Menschen entdeckten Vertreter der TRPV-Familie sind bis zu 25 % homolog zu TRPC-Proteinen und gliedern sich in zwei Untergruppen, der TRPV1 bis 4 und TRPV5 und 6 angehören. TRPV5 und TRPV6 zeichnen sich durch eine hohe Selektivität für Kalziumionen aus ($P_{Ca}/P_{Na} > 100$, den Dekker et al., 2003) und sind im Überexpressionssystem konstitutiv aktiv (Ramsey et al., 2006; Vennekens et al., 2000). Andere TRP-Kanäle können durch Hitze, Rezeptorstimulation, PKC, IP_3 , DAG, Wachstumsfaktoren oder Liganden aktiviert werden (Vennekens et al., 2002). Allen TRPV-Proteinen sind verschiedene putative AS-Motive und Interaktionsdomänen in ihren N- und C-Termini gemeinsam (Abb. 7). Diese weisen z.B. Calmodulin-Bindestellen, PDZ-Domänen, Phosphorylierungsstellen für Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase C und cGMP-abhängige Kinasen und mehrere Ankyrinbindedomänen auf (Erler et al., 2004).

2.4. Das TRPV6-Protein

Die TRPV6-mRNS wurde erstmals 1999 im Duodenum von Ratten nachgewiesen (Peng et al., 1999). Die Transkripte im Menschen wurden im folgenden Jahr in höheren Konzentrationen in Duodenum, Pankreas, Plazenta (im Tropho- und Synzytiotrophoblasten), Prostata und Speicheldrüse und in mäßigen Konzentrationen in Leber, Niere und Hoden nachgewiesen (Peng et al., 2000; Barley et al., 2001; Wissenbach et al., 2001). Eine einheitliche Nomenklatur für „transient receptor potential“-Proteine wurde 2002 eingeführt. Man verständigte sich auf die neue Bezeichnung TRPV6 anstelle von Calcium transport protein 1 (CaT1), epithelial calcium channel 2 (ECaC2) oder CaT-like (CaT-L) (Montell et al., 2002).

Das humane TRPV6-Protein (725 AS, theoretisches MW 83,21 kDa, pI 7,56) wird an der Aminosäure Asparagin (Asn) an Position 358 in der ersten extrazellulären Schleife glykosyliert (Hirnet et al., 2003). Hierdurch erhöht sich das Molekulargewicht des nicht glykosylierten Proteins von ~75 kDa auf ~88 kDa (Hirnet et al., 2003). Diese N-Glykosylierung ist für das Verbleiben des Kanals in der Plasmamembran und die Kanalaktivität verantwortlich. Für den zu TRPV6 hoch homologen TRPV5-Kanal wurde ein völlig neuartiger Aktivierungsmechanismus durch die β -Glukoronidase Klotho gezeigt (Chang et al., 2005), der vermutlich auch den TRPV6-Kanal aktiviert (Lu et al., 2008) (siehe auch 2.4.2). Das Enzym Klotho sorgt für die Abspaltung n-terminaler, extrazellulärer Zuckerreste vom TRPV5- und TRPV6-Protein, in deren Folge der aktive Kanal länger in die Plasmamembran integriert ist.

TRPV5 und TRPV6 sind zu 75 % homolog und unterscheiden sich hauptsächlich im N- und C-Terminus. Sie sind aber nur zu 30-40 % homolog zu anderen Mitgliedern der TRP-Familie. *In vitro* ist die Pore in Abwesenheit von zweiwertigen Ionen auch für monovalente Ionen permeabel. An der engsten Stelle der Pore (Durchmesser: 5,4 Å, Voets et al., 2004) ist der in TRPV6 über alle Spezies konservierte Asparaginsäurerest D541 (entspricht D542 in TRPV5)

verantwortlich für die Selektivität und den einwärts gerichteten Ca^{2+} -Strom (bei anderen TRPV-Proteinen ist der Ca^{2+} -Strom auswärtsgerichtet). Im Tetramer (Abb. 8) bilden die vier negativ geladenen Seitenketten einen Ring, den Selektivitätsfilter. Dieser vermittelt sowohl die Ca^{2+} -Permeabilität, als auch die Blockierung durch Mg^{2+} (Nilius et al., 2001).

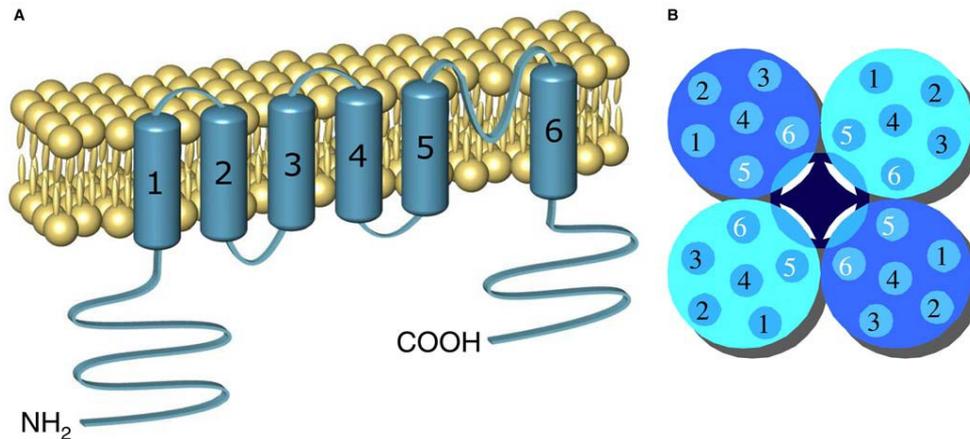


Abb. 8: Struktur von TRPV5/6 in der Membran (Nijenhuis et al., 2005). A: Lage der hydrophoben Transmembrandomänen und des N- und C-Terminus in bzw. an der Membran, B: Anordnung der Untereinheiten und Ausbildung der Pore im Tetramer.

Unterschiede zeigen TRPV5 und TRPV6 zum einen in der 100fach höhere Affinität von TRPV5 für den Blocker Ruthenium Rot, die geringere Permeabilität für Barium (Ba^{2+}) bei TRPV6, sowie eine stärkere kalziumabhängige Inaktivierung des TRPV6-Kanals (Nijenhuis et al., 2005). Genetische Analysen sprechen auf Grund der verwandtschaftlichen und chromosomalen Nähe von TRPV6 (Chromosome 7q33-q34) und TRPV5 (7q35) für eine evolutionäre Genverdopplung (Hoenderop et al., 2005).

2.4.1. Der Aufbau des TRPV6-Proteins

Die Ausbildung eines funktionellen Kanals erfolgt über die Zusammenlagerung von Tetrameren, wobei für TRPV6 sowohl Homo- als auch Heterotetramere beschrieben sind (Hoenderop et al., 2003; Hellwig et al., 2005). Die Funktion der Heterotetramere könnte die Feinmodulation des Ca^{2+} -Stroms sein (Owsianik et al., 2006). Zur Ausbildung der Tetramerstruktur und der funktionellen Pore sind Ankyrindomänen notwendig, die sich am N-Terminus des TRPV6-Proteins befinden. Die Multimerisationsdomänen bestehen aus sechs Ankyrinbindungsstellen, die aus 33 stark konservierten Aminosäuresequenzen aufgebaut sind. Diese Ankyrindomänen sind Protein-Protein-Interaktionsmotive und essentiell für die Tetramerisierung der Kanalproteine TRPV4, TRPV5 und TRPV6 (Abb. 9) (Erler et al., 2004; Schindl und Romanin, 2007). Phelps und Kollegen haben mithilfe von Kristallstrukturanalysen der TRPV6-Ankyrindomänen (TRPV6-ARD) gezeigt, dass diese in Lösung als Monomere vorliegen (Phelps et al., 2008). Hierbei bilden die Ankyrindomänen eine antiparallele innere

und äußere α -Helix aus, die über eine Schleife („Loop“) miteinander verbunden sind und deren exponierten Seiten variable Aminosäurereste enthalten, die für die Bindepartner spezifisch sind. Die Ankyrinbindestellen weisen potentielle Phosphorylierungsstellen an den Tyrosinen Y161 und Y162 auf (Phelps et al., 2008). Dephosphorylierung durch die Tyrosinphosphatase PTP1B verringert, Phosphorylierung durch die Tyrosinkinase Src verstärkt den Ca^{2+} -Einstrom (Sternfeld et al., 2005; Sternfeld et al., 2007). Die Verwandten TRPV1-4 bilden homotetramere Komplexe, wofür die erste und die zweite Ankyrindomäne essentiell sind. Ohne sie kommt es zum Verlust der Tetramerbildung und der Ca^{2+} -Leitfähigkeit, vermutlich durch die Retention des Proteins im ER (Hellwig et al., 2005).

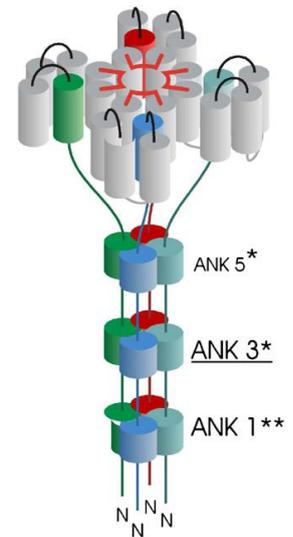


Abb. 9: Anordnung der Ankyrindomänen 1, 3 und 5 im TRPV6-Homotetramer (Niemeyer, 2005). Die Assoziation der jeweiligen Ankyrindomänen führt zur Ausbildung und zum Erhalt des funktionellen Kanals.

2.4.2. Regulation des TRPV6-Proteins

Das TRPV6-Protein kann auf verschiedenen Ebenen reguliert werden: Im Bereich seiner Transkription und Translation, über den Transport von und zur Plasmamembran und über die Beeinflussung der Kanalaktivität des Proteins in der Plasmamembran (Nijenhuis et al., 2005).

Tabelle 2: Regulatorische Effekte verschiedener Faktoren auf TRPV6 (modifiziert nach Hoenderop und Bindels, 2008). + = aktiviert, - = inhibiert

<u>Regulierender Faktor</u>	<u>Effekt auf TRPV6</u>	<u>Regulierter Prozess</u>	<u>Referenz</u>
Vitamin D ₃	+	Transkription	Van Cromphaut et al., 2001; Hoenderop et al., 2001a; Hoenderop et al., 2005;
Östrogen	+	Transkription	van Abel et al., 2002; van Abel et al., 2003
Progesteron	+	Transkription	Lee und Jeung, 2007
Prednisolon	-	Transkription	Huybers et al., 2007
Geringer Ca^{2+} -Gehalt der Nahrung	+	Transkription	Hoenderop et al., 2002
Klotho	+	Proteintransport	Chang et al., 2005; Lu et al., 2008; Kuro-o, 2010
S100A10/Annexin 2	+	Proteintransport	van de Graaf et al., 2003
Rab11a	+	Proteintransport	van de Graaf et al., 2006a
SGK1/SGK3	+	Proteintransport	Bohmer et al., 2007; Sopjani et al., 2010
NHERF4	+	Proteintransport	van de Graaf et al., 2006b
Nipsnap1	-	Kanalaktivität	Schoeber et al., 2008
Calmodulin	-	Kanalaktivität	Niemeyer et al., 2001; Lambers et al., 2004
$[Ca^{2+}]_i$	-	Kanalaktivität	Hoenderop et al., 2001b; Bödding und Flockerzi, 2004
$[Ca^{2+}]_o$	+	Proteinexpression	Lehen'kyi et al., 2007a
$[Mg^{2+}]_i$	-	Kanalaktivität	Hoenderop et al., 2001b
RGS2	+	Kanalaktivität	Schoeber et al., 2006
Inositol-(4,5)-bisphosphat	-	Kanalaktivität	Thyagarajan et al., 2008
Tyrosinphosphatase PTP1B/ Tyrosinkinase Src	-/+	Kanalaktivität	Sternfeld et al., 2007

Eine Übersicht über die verschiedenen TRPV6 beeinflussenden Faktoren und Interaktionspartner und die resultierenden regulatorischen Auswirkungen zeigt Tabelle 2.

Hohe, intrazelluläre Konzentrationen von Ca^{2+} führen zu einer schnellen Inaktivierung der Pore (Hoenderop et al., 2001b; Bödding und Flockerzi, 2004). Kalzium wirkt dabei auf die Aminosäuren Leucin 409, Valin 411 und Threonin 412 in der intrazellulären Schleife zwischen den Transmembrandomänen 2 und 3 und vermittelt hierüber die Inaktivierung des Kanals (Niemeyer et al., 2001; Nilius et al., 2002; Lambers et al., 2004; Derler et al., 2006). Die Inaktivierung ist bei TRPV6 größer als bei TRPV5, was auf die unterschiedlichen Aminosäuresequenzen der intrazellulären Schleife zwischen TM2 und TM3 zurückzuführen ist (den Dekker et al., 2003). Durch die TRPV6-Pore einströmendes Ca^{2+} aktiviert Phospholipase C (PLC), was zum Abbau von Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat (PIP_2) zu Inositol-1,4,5-trisphosphate (IP3) und Diazylglyzerol (DAG) führt und anschließend zur Inaktivierung des TRPV6-Kanals beiträgt (Thyagarajan et al., 2008). Diese Feedback-Hemmung erlaubt eine Regulation der Ca^{2+} -Konzentration auf Zytoplasmaniveau. Die Inaktivierung des Kanals erfolgt bei erhöhter Ca^{2+} -Konzentrationen über einen Ca^{2+} -Calmodulin-abhängigen Mechanismus (Niemeyer et al., 2001). Calmodulin (CaM), der erste identifizierte Interaktionspartner von TRPV6, bindet kalziumabhängig an eine C-terminale Region von TRPV6 und inaktiviert folglich den Kanal. Die Bindung von CaM an die Domäne kann durch Phosphorylierung eines Threoninrestes durch Proteinkinase C verhindert werden. Die Konkurrenz von CaM und PKC um diese Domäne scheint ein wichtiger Mechanismus zur Kontrolle der TRPV6-Aktivität zu sein (Niemeyer et al., 2001).

Die extrazelluläre Kalziumkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_o$) kann die TRPV6-Expression aber auch indirekt aktivieren. Bei Keratinozyten, einem Zelltyp der Haut, kommt es zur Zelldifferenzierung in Folge eines erhöhten extrazellulären Ca^{2+} -Levels („calcium-switch“). Dabei wird sowohl die mRNA- als auch die Proteinexpression bei der Ca^{2+} -induzierten Differenzierung erhöht, um einen verstärkten Ca^{2+} -Einstrom zu ermöglichen (Lehen'kyi et al., 2007a). Die Regulation der Expression wird dabei von Vitamin D_3 gesteuert.

Vitamin D_3 , vielmehr seine physiologisch aktive Form Kalzitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), ist ein hochwirksames Steroidhormon, welches das TRPV6-Protein auf Transkriptionsebene reguliert. Der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Vitamin-D-Rezeptor (VDR)-Komplex wird nach Bindung in den Zellkern transportiert und bindet dort gemeinsam mit Kofaktoren an das „Vitamin D response element“ (VDRE) des TRPV6-Gens (Meyer et al., 2006). Die gesteigerte Expression erhöht die TRPV6-Konzentration in der Zelle. Gleiches gilt für TRPV5 und die Kalzium bindenden Proteine Calbindin- D_{9k} und D_{28k} . Außerdem fördert das Parathormon die Bildung von Kalzitriol (Schmidt, 2001). Somit wird eine verstärkte Ca^{2+} -Resorption in Niere und Darm und ein verstärkter Kalziumtransport zu den Knochen ermöglicht (Hoenderop et al., 2004).

Divalente Magnesiumionen (Mg^{2+}) blockieren intrazellulär und extrazellulär den Kanal, indem sie als Kationen vom negativ geladenen Selektionsfilter der Pore angezogen werden, aber die Pore nicht passieren können.

Aktivierend auf TRPV5 und vermutlich auch auf TRPV6 wirkt das Protein Klotho, ein Membranprotein mit einer Transmembrandomäne und Mitglied der β -Glukoronidasefamilie (Lu et al., 2008). Nach seiner Sezernierung in den Prä-Urin trennt das Hormon die endständige Sialinsäure durch Hydrolyse vom extrazellulären Zuckerrest des TRPV5-Proteins am N-Terminus. Durch Bindung der nun freien Galaktose an Galectin-1 in der extrazellulären Matrix verbleibt der Kanal länger in der Plasmamembran und ist länger aktiv (Chang et al., 2005; Kuro-o, 2010).

2.4.3. Effekte der TRPV6-Deletion oder -Überexpression in Geweben

Die Deletion bzw. die Überexpression des TRPV6-Proteins im Organismus geht mit einem veränderten Phänotyp einher. In TRPV6-defizienten Mäusen führt die Deletion des TRPV6-Gens zur einer verringerten Ca^{2+} -Konzentration im Blut. Die physiologischen Folgen sind eine geringere Knochendichte, langsamere Gewichtszunahme, Haarausfall und Dermatitis. Die Abnormitäten sind vermutlich zum einen auf die verminderte Kalziumaufnahme aus der Nahrung und zum anderen auf den verminderten Ca^{2+} -Transfer während der Schwangerschaft und der embryonalen Entwicklung zurückzuführen (Bianco et al., 2007; Suzuki et al., 2008a). Hierbei versucht der Organismus der Mäuse der verringerten Ca^{2+} -Menge durch eine erhöhte Bildung und Ausschüttung von $1,25(OH)_2D_3$ und Parathormon (PTH) entgegenzusteuern. So wurden in TRPV6-defizienten Tieren Serumspiegel für diese beiden Hormone gemessen, die im Vergleich zu Wildtyp-Tieren bei Vitamin D_3 2,4fach und bei PTH 3,8fach erhöht waren.

Beim Menschen sind TRPV6-Transkripte in karzinomem Prostatagewebe nachweisbar (Wissenbach et al., 2004a). Im Gegensatz dazu sind diese in gesundem Prostatagewebe oder bei gutartigem Wachstum (benigne Prostatahyperplasie, BPH) nicht vorhanden. Die Expression von TRPV6 wird während der Karzinomentwicklung in metastatischen Läsionen und wiederkehrenden androgeninsensitiven Prostatadrüsenkarzinomen stark hochreguliert (Wissenbach et al., 2001). Die erhöhte Expression ermöglicht eine höhere Proliferationsrate und eine Steigerung der Überlebensfähigkeit und Resistenz gegen Apoptose (Lehen'kyi et al., 2007b). Auf Grund der Verknüpfung mit der Krebsentwicklung gilt TRPV6 als einen potentiellen Krebsmarker (Fixemer et al., 2003; Wissenbach et al., 2004b). Untersuchungen an Magenkarzinomzellen zeigen, dass in diesen TRPV6 ebenfalls überexprimiert wird. Interessanter Weise lässt sich bei diesen Zellen durch hohe Dosen Capsaicin eine TRPV6-vermittelte Apoptose induzieren. Daraus ergibt sich ein möglicher Ansatzpunkt für eine

Krebsvorbeugung bzw. -behandlung (Chow et al., 2007). Weiterhin wurden erhöhte TRPV6-Expressionen auch in Brust- (Bolanz et al., 2008), Schilddrüsen-, Dickdarm- und Eierstockkarzinomen festgestellt (Zhuang et al., 2002; Nilius et al., 2005; Bodding, 2007; Prevarskaya et al., 2007).

2.5. TRPC6 und die TRPC-Familie

Die TRPC6-cDNS wurde erstmals 1997 in Maushirn nachgewiesen (Boulay et al., 1997), wohingegen die menschliche TRPC6-cDNS in Plazenta, Lunge, Bauchspeicheldrüse, Eierstock und Dünndarm identifiziert wurde (Hofmann et al., 1999; Dalrymple et al., 2002). Offensichtlich wird TRPC6 in der Plazenta erst nach dem ersten Trimester exprimiert (Clarson et al., 2003). Weitere Studien detektierten TRPC6 im Menschen mit den höchsten Konzentrationen in Plazenta und Lunge und weiterhin in der Niere, in Mastzellen und im ZNS (Riccio et al., 2002). Humanes TRPC6 besitzt 931 Aminosäuren, ein kalkuliertes Molekulargewicht von ca. 106 kDa und ist zu 93 % homolog zum TRPC6-Protein der Maus (930 AS).

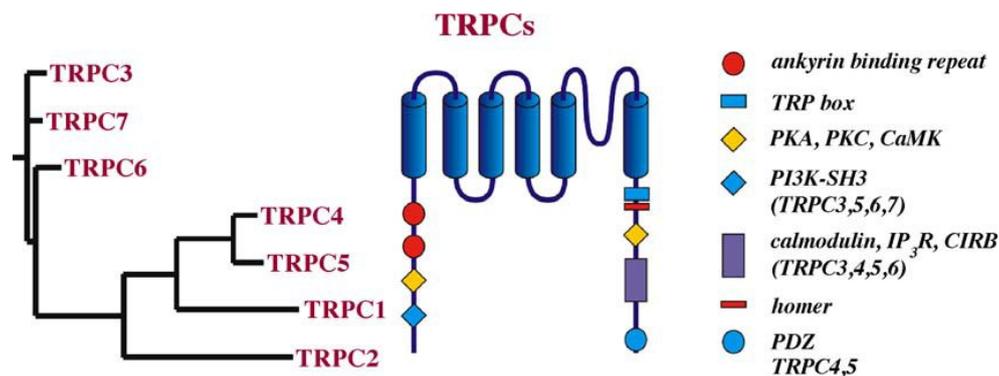


Abb. 10: Verwandtschaft und Struktur der humanen TRPC-Proteine (Pedersen et al., 2005). Die TRPV-Familie umfasst 7 Mitglieder. Die intrazellulären Bereiche beinhalten verschiedene Struktur- und Interaktionsdomänen.

Die TRPC6-Familie besteht aus sieben Mitgliedern, wobei TRPC2 beim Menschen ein Pseudogen ist. Diese TRP-Proteine stehen dem „Ursprungs-TRP-Protein“ aus *Drosophila melanogaster* verwandtschaftlich am nächsten (Ramsey et al., 2006). Allen TRPCs gemeinsam ist die oben genannte TRP-Box. Aufgrund von Sequenzhomologien und Funktionen werden die Mitglieder der TRPC-Familie in 3 Gruppen unterteilt: TRPC1/4/5, TRPC3/6/7 und TRPC2 (Ramsey et al., 2006), welche 65-78 % Sequenzhomologie aufweisen (Hofmann et al., 1999). In Analogie zu Mitgliedern anderer TRP-Familien bildet sich auch bei den TRPC-Proteinen der funktionelle Kanal aus vier Proteinmonomeren.

Die Ausbildung des funktionellen Kanals erfolgt bei TRPC6 ebenso wie TRPV6 über n-terminale Ankyrindomänen (2.4.1). Zusätzlich sind auf die Ankyrindomänen folgende „Coiled-coil-Domänen“ ebenfalls für die Tetramerisierung der Monomere notwendig (Schindl und Romanin, 2007). Das funktionelle Protein besteht auch hier aus einem Homo- bzw.

Heterotetramer, wobei sich die Ausbildung der Heterotetramere auf die Gruppenmitglieder der TRPC3-Familie, konkret auf TRPC3/6/7, beschränkt (Hofmann et al., 2002). Heterotetramere mit Mitgliedern der anderen TRP-Familien sind nicht bekannt.

TRPC6 ist ein nichtselektiver Kationenkanal ($P_{Ca}/P_{Na}=5$) (Pedersen et al., 2005) mit zwei Asn-Glykosylierungsstellen, die in den extrazellulären Schleifen S1-S2 und S3-S4 lokalisiert sind und die basale Kanalaktivität beeinflussen (Dietrich et al., 2003; Dietrich und Gudermann, 2007). Die Eliminierung der zweiten Glykosylierungsstelle bei Zellkulturversuchen führte zur konstitutiven Aktivierung des stark regulierten Kanals. Ein Enzym, das die Deglykosylierung *in vivo* durchführt, wurde noch nicht beschrieben. Ein Mechanismus ähnlich dem zu Klotho bei TRPV6 (2.4.2) wäre aber auch hier denkbar.

2.5.1. Direkte und indirekte Regulation des TRPC6-Proteins

TRPC6 wird durch verschiedene Faktoren reguliert. Diese und ihre Auswirkungen auf das Protein sind in Tabelle 3 beschrieben.

Tabelle 3: Regulatorische Effekte verschiedener Faktoren auf TRPC6. + = aktiviert, - = inhibiert

<u>Regulierender Faktor</u>	<u>Effekt auf TRPC6</u>	<u>Regulierter Prozess</u>	<u>Referenz</u>
DAG/OAG	+	Kanalaktivität	Hofmann et al., 1999; Montell, 2005)
PLC	+	Kanalaktivität	Shi et al., 2004
PKC	-	Kanalaktivität	Estacion et al., 2004
Tyrosinkinase Src	+	Kanalaktivität	Hisatsune et al., 2004
Tyrosinkinase Fyn	+	Kanalaktivität	Hisatsune et al., 2004
$[Ca^{2+}]_i$	+	Kanalaktivität	Boulay, 2002
Calmodulin	+	Kanalaktivität	Boulay, 2002, Shi et al., 2004
La^{3+}/Gd^{3+}	-	Kanalaktivität	Inoue et al., 2001; Jung et al., 2002
Flufenamat	+	Kanalaktivität	Inoue et al., 2001; Jung et al., 2002
FKBP12	+	Kanalaktivität	Sinkins et al., 2004; Kim und Saffen, 2005

Der TRPC6-Kanal wird durch Phospholipase C, Diazylglyzerol (DAG) und das zu DAG analoge 1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG) direkt aktiviert (Hofmann et al., 1999; Montell, 2005). Muskarinerge Rezeptoren führen zusammen mit DAG zu einer verstärkten Aktivierung von TRPC6 (Estacion et al., 2004). DAG aktiviert auch Proteinkinase C, welche durch Phosphorylierung zur Inaktivierung des Kanals und dadurch zur Feedback-Hemmung führt (Shi et al., 2004).

Weitere Faktoren, die eine Aktivierung des TRPC6-Kanals zur Folge haben, sind die Tyrosinkinasen Src (analog zu TRPV6) und Fyn (Hisatsune et al., 2004), Flufenamat, ein unspezifischer Kationenkanalblocker (Inoue et al., 2001; Jung et al., 2002), sowie die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration. Für eine Interaktion zwischen TRPC6 und dem Ca^{2+} -bindenden Protein Calmodulin, welches vermutlich zur Aktivierung des Ionenkanals führt,

sprechen elektrophysiologische Messungen im Überexpressionssystem mit verschiedenen Calmodulininhibitoren (Boulay, 2002; Shi et al., 2004). Die Metallionen La^{3+} und Gd^{3+} wirken dagegen inhibierend auf den Kanal (Inoue et al., 2001; Jung et al., 2002).

Auch das TRPC6-Protein scheint in große Proteinkomplexe integriert zu sein. Mittels Coimmunpräzipitationsversuchen wurde ein Multiproteinkomplex in neuronalen PC12D-Zellen identifiziert, der sich aus TRPC6, Proteinkinase C, FK506-binding Protein (FKBP 12) und Calcineurin/Calmodulin zusammensetzt (Kim und Saffen, 2005). Die Interaktion mit FKBP12 und auch seinem Verwandten FKBP52 wurde bereits für mehrere TRPC-Proteine nachgewiesen (Sinkins et al., 2004). Die Bindung ist dabei TRPC-gruppenspezifisch, d.h. FKBP12 bindet nur an TRPC3/6/7 und FKBP52 nur an TRPC1/4/5. Die FKBP's zählen zur Gruppe der Immunophiline und binden an das Immunsuppressivum Tacrolimus (FK506). Die Zugabe von FK506 löst die Bindung zwischen den FKBP's und den TRPC-Proteinen und führt zu einer Inhibierung der Rezeptoraktivierung bei z.B. TRPC6. Das Immunophilin FKBP59 ist auch Bestandteil des Proteinkomplexes der Photorezeptorzelle in *Drosophila melanogaster*, in dem auch TRP und TRPL detektiert wurden (Goel et al., 2001).

2.5.2. Effekte der TRPC6-Deletion oder -Überexpression in Geweben

Die mit TRPC6 in Verbindung stehenden Krankheiten beruhen meist auf Gendefekten, Mutationen oder Änderungen des Expressionsmusters (Nilius et al., 2005; Möller et al., 2007). Die verringerte Immunantwort von TRPC6-defizienten Mäusen bei experimentell induzierten Atemwegsallergien deutet auf eine immunologische Funktion des Proteins hin (Sel et al., 2008). Der für die Aktivierung von verschiedenen Immunzelltypen essentielle Ca^{2+} -Einstrom ist hier vermutlich geringer. Bei chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen (COPD) trägt TRPC6 zu einer übermäßigen Schleimproduktion bei (Li et al., 2003).

TRPC6 ist in den Podozyten der Niere ein Bestandteil der Schlitzmembran des glomerulären Filters. Fehlt Nephrin, ein Transmembranprotein der Schlitzmembran, im glomerulären Filter, führt dies zur erhöhten Expression von TRPC6 und einer veränderten Lokalisierung des Kanals (Reiser et al., 2005; Nilius et al., 2007). Daraus resultiert, ebenso wie bei einer Mutation des TRPC6-Gens ein Defekt der Permeabilitätsmembran (Winn et al., 2005; Möller et al., 2007; Nilius et al., 2007). Die Folge ist eine erhöhte Eiweißausschüttung in den Urin (Proteinurie), die im Krankheitsverlauf zu Nierenversagen führt. Diese Nierenerkrankung wird als „Familiäre fokal-sklerosierende Glomerulonephritis“ (FSGS) bezeichnet.

Die übermäßige Proliferation der Gefäßmuskelzellen der Lungenschlagader durch eine TRPC6-Überexpression führt zu pulmonalem Bluthochdruck, in dessen Folge eine Insuffizienz der rechten Herzseite entstehen kann (Yu et al., 2004; Nilius et al., 2007).

2.6. Zielsetzung der Doktorarbeit

Bei der Entwicklung des Fötus werden alle lebenswichtigen Stoffe über die Plazenta transportiert. Dieses transiente Organ embryonalen Ursprungs stellt die einzige Verbindung zwischen dem maternalen und dem fötalen Blutkreislauf dar. Hierbei werden neben Nährstoffen und Abfallstoffen auch Mineralien, wie z.B. Kalzium transportiert, welches für den Aufbau von Skelettknochen und Zähnen, aber auch für zelluläre Signalweiterleitungsprozesse essentiell ist.

Mehrere Untersuchungen weisen darauf hin, dass der humane TRPV6-Ionenkanal in den Zellen der Plazenta exprimiert ist und dort als Kalziumkanal den transepithelialen Ca^{2+} -Transport zwischen Mutter und Fötus ermöglicht.

Basierend auf den in meiner Diplomarbeit erhaltenen Ergebnissen, bei der ich im Rahmen einer mehrstufigen Affinitätschromatographie eine Interaktion des TRPV6-Kanalproteins mit Cyclophilin B (CyPB) nachgewiesen habe, sollte diese Interaktion mit verschiedenen biochemischen Methoden bestätigt und die Bindungsstelle bzw. Bindungsregion im TRPV6-Protein bestimmt werden. Hierzu sollten GST-Pulldown-Assays, Peptidblots, Saccharosedichtegradientenzentrifugation und Immunpräzipitationsversuche mit CyPB- und TRPV6-Proteinen bzw. -Peptiden durchgeführt werden.

Da die in meiner Diplomarbeit verwendete mehrstufige Affinitätschromatographie von TRPV6 über eine Calmodulinsäule mit anschließender EGTA-Elution erfolgte und hierbei eventuell kalziumabhängige Proteinbindungen verloren gehen, sollte eine Modifizierung dieser Affinitätschromatographie entwickelt werden. Hierbei war das Ziel eine Methode zu etablieren, die die Isolierung von TRPV6-Proteinkomplexen mit einer Antikörper-Affinitätschromatographie in Anwesenheit von Kalzium aus Gewebe ermöglicht. Dazu sollte neben der Herstellung neuer hochaffiner TRPV6-Antikörpersäulen auch die Solubilisierung der Membranproteine mit Hilfe verschiedener Detergenzien getestet und die Pufferbedingungen optimiert werden.

Die über die Affinitätschromatographie gewonnenen TRPV6-Proteinkomplexe sollten dann über eine zweidimensionale Blue Native-Gelelektrophorese aufgetrennt und massenspektrometrisch identifiziert werden. Die hierbei identifizierten Proteine sollten mit den identifizierten Proteinen der mehrstufigen Affinitätschromatographie verglichen werden.

Abschließend sollte überprüft werden, inwiefern die hier neu etablierte Methode zur Isolierung anderer Vertreter der TRP-Kanalproteine mittels spezifischer Antikörpersäulen übertragbar ist. Hierzu sollte das TRPC6-Kanalprotein aus Mastzellen und Lungengewebe von WT und TRPC6-defizienten Mäusen angereichert werden.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte

Tabelle 4: Liste der verwendeten Geräte und deren Hersteller.

<u>Gerät</u>	<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
3D-Taumelschüttler	Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
Gelsystem	NuPAGE	Invitrogen, Karlsruhe
Gelsystem	Mini Protean 3 Electrophoresis System	Bio-Rad, München
Gelsystem	Hofer SE 600 Ruby	GE Healthcare, München
heizbares Wasserbad		Memmert, Schwabach
Heizblock	Rotilabo-Block-Heater H 250	Roth, Karlsruhe
Heizrührer	MR 3001	Heidolph, Schwabach
Massenspektrometer	Ultraflex-ToF-ToF II	Bruker Daltonics, Leipzig
Mikrotiterplattenphotometer	Multiskan EX	Thermo Labsystems, Egelsbach
Mixer	Commercial Blendor	Bender + Hobein, Zürich (CH)
Netzteil (Powersupply)	E815, E802	Consort, Turnhout (B)
Peristaltikpumpe	Pump P-1	GE Healthcare, München
Peristaltikpumpe		Ismatec, Wertheim-Mondfeld
Pipetten	2 µl - 20 µl; 20 µl - 200 µl; 100 µl - 1000µl	Abimed, Langenfeld
Pipetten	0,1 µl - 2,5 µl; 0,5 µl - 10 µl	Eppendorf, Hamburg
Spektralphotometer	Ultrospec 2100 pro	GE Healthcare, München
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Ausschwing-Zentrifuge	Laborfuge 400R	Heraeus, Hanau
Ultrazentrifuge	L-80 Ultracentrifuge	Beckman, München
Evaporationszentrifuge	Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Vortex	Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York (USA)
Zentrifuge	RC-5B Refrigerated Superspeed	Sorvall, Langenselbold

3.1.2. Chemikalien und Materialien

Tabelle 5: Liste der verwendeten Chemikalien und deren Hersteller.

Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
Acetonitril	Merck, Darmstadt
a-Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure	Bruker Daltonics, Leipzig
Ammoniumhydrogenkarbonat	Roth, Karlsruhe
Ammoniumsulfat	Roth, Karlsruhe
BCA Protein Assay Kit (inkl. Proteinstandard)	Pierce, Rockford (IL)
Bromphenol Blau	GE Healthcare, München
DTT	GE Healthcare, München
Entwicklerlösung	Agfa, Köln
Fixierlösung	Agfa, Köln
Harnstoff	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Supermarkt
Natriumcarbonat	Fluka + Riedel-de Haën, München
Natriumdodecylsulfat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
NHS-aktivierte Sepharose	GE Healthcare, München
ortho-Phosphorsäure (89%)	Merck, Darmstadt
Peptidstandard-Lösung	Bruker Daltonics, Leipzig
PMSF	Roth, Karlsruhe
Protein A-Agarose	Roche Diagnostics, Mannheim
Protein G-Agarose	Upstate, Charlottesville, Virginia, USA
Röntgenfilme, Hyperfilm MP	GE Healthcare, München
Silbernitrat	Ögussa, Wien (A)
TEMED	Roth, Karlsruhe
TRIS	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	GE Healthcare, München
Trypsin (Porcine)	Promega, Mannheim
Western Lightning Chemilumineszenz Reagent Plus	Perkin Elmer, Boston (USA)

Lösungen wie Säuren, Basen und Lösungsmittel stammen aus der Chemikalienabteilung der Technischen Universität Kaiserslautern. Alle anderen Chemikalien, soweit nicht anders im Text erläutert, wurden von der Firma AppliChem, Darmstadt bezogen.

3.1.3. Primärantikörper

Tabelle 6: Liste der verwendeten Primärantikörper. Verwendung: Western Blot (WB), Affinitätschromatographie, Coimmunpräzipitation (CoIP).

<u>Name</u>	<u>Antigen; Epitop</u>	<u>Typ</u>	<u>Wirtstier</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Verdünnung/ Konz. im WB</u>
20C6	hTRPV6, mTRPV6; RGDLEDGESWEYQI (AS 713-725)	monoklonal	Maus	Daniela Hirnet (Hirnet et al., 2003)	5 µg/ml in 1% BSA in TBS-Puffer
429	hTRPV6, mTRPV6; RGDLEDGESWEYQI (AS 713-725)	polyklonal	Kaninchen	Daniela Hirnet (Hirnet et al., 2003)	10 µg/ml in 1% BSA in TBS-Puffer
981	hTRPV6, mTRPV6; RGDLEDGESWEYQI (AS 713-725)	Polyklonal, ungereinigtes Serum	Kaninchen	AG Fecher-Trost	
26B3	hTRPV6; LGCPFSPHLSLP (AS 669-680)	monoklonal	Maus	Daniela Hirnet (Hirnet et al., 2003)	5 µg/ml in 1% BSA in TBS-Puffer
Anti- Cyclophilin B	Cyclophilin B (Mensch, Hund, Maus, Ratte); CGKIEVEKPFIAIKE (AS 194-208)	polyklonal	Ziege	Affinity BioReagents, Golden, USA; PA1-027	1:1000 in 1% BSA in TBS-Puffer
Anti-TRPC6	mTRPC6; CEKGRRLANRGPAYMFND (AS 72-88)	polyklonal	Kaninchen	Flockerzi, Pharmakologie, Universität des Saarlandes	5 µg/ml in 1% BSA in TBS-Puffer
Anti-TRPC6	rTRPC6, mTRPC6; CIRKLGERSLESKQEESRR (AS 912-930)	Monoklonal, ungereinigter Hybridoma- überstand	Ratte	Meissner/Flockerzi, Pharmakologie, Universität des Saarlandes	1:1 in TBS-Puffer

3.1.4. Sekundärantikörper

Tabelle 7: Liste der verwendeten Sekundärantikörper. Verwendung: Western Blot (WB).

<u>Name</u>	<u>Antigen; Epitop</u>	<u>Wirtstier</u>	<u>Hersteller; Artikelnummer</u>	<u>Verdünnung im WB</u>
Anti-mouse- HRPO	IgGs aus Maus; (H+L)	Ziege	Dianova, Hamburg; 115-035-146	1:30.000 in 5%iger Magermilch in TBS-Puffer
Anti-rabbit- HRPO	IgGs aus Kaninchen; F(ab') ₂ -Fragment	Esel	GE Healthcare, München; NA9340	1:50.000 in 5%iger Magermilch in TBS-Puffer
Anti-rabbit- HRPO	IgGs aus Kaninchen; Fc-Fragment	Maus	Dianova, Hamburg; 211-032-171	1:10.000 in 5%iger Magermilch in TBS-Puffer
Anti-goat-HRPO	IgGs aus Ziege; (H+L)	Esel	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg; sc-2020	1:30.000 in 5%iger Magermilch in TBS-Puffer
Anti-rat- HRPO	IgGs aus Ratte; (H+L)	Ziege	Biozol; 3050-05	1:80.000 in 5%iger Magermilch in TBS-Puffer

3.1.5. Proteinmarker

Tabelle 8: Liste der verwendeten Proteinmarker, ihre Hersteller und die Standardgrößen. Verwendung: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, Western Blot und Blue Native-PAGE.

<u>Markername</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Markerbanden [kDa]</u>
peqGOLD Proteinmarker I	Peqlab, Erlangen	116; 66; 55; 45; 35; 25; 18,4; 14,4
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot	170; 130; 100; 70; 55; 45; 35; 25; 17; 10
HMW Native Marker Kit	GE Healthcare, München	669; 440; 232; 140; 66
NativeMark	Invitrogen, Karlsruhe	1236; 1048; 720; 480; 242; 146; 66; 20
Prestained Protein Molecular Weight Marker	Fermentas, St. Leon-Rot	117; 90; 49; 35; 26; 19

3.1.6. allgemein verwendete Lösungen

10x TBS-Puffer:

500 mM Tris HCl, pH 7,4

1,5 M NaCl

10x SDS Elektrophoresepuffer :

250 mM Tris HCl, pH 8,3

1,92 M Glycin

1 % (w/v) SDS

2x Laemmli-Puffer (Laemmli, 1970):

8 % (w/v) SDS

120 mM Tris HCl, pH 6,8

0,01 % (w/v) Bromphenolblau

20 % (v/v) Glycerin

10 % (v/v) β -Mercaptoethanol (vor Gebrauch zugeben)

Proteaseinhibitorenmix (PI-Mix):

Leupeptin: Stammlösung: Konz. 1 mg/ml in H₂O, Verdünnung im PI-Mix: 1:1000

Pepstatin: Stammlösung: Konz. 1 mg/ml in Isopropanol, Verdünnung im PI-Mix: 1:500

PMSF: Stammlösung: Konz. 17,4 mg/ml in Ethanol, Verdünnung im PI-Mix: 1:500

3.2. Methoden

3.2.1. Mikrosomenpräparation aus humaner Plazenta

Zur Gewinnung der mikrosomalen Fraktion der Plazenta werden 50 g gefrorenes Plazentagewebe (gelagert bei -80 °C) nach dem Auftauen in 100 ml Lysispuffer unter Zugabe eines Proteaseinhibitorenmixes (3.1.6) im Ultraturrax bzw. Mixer und anschließend durch Pottern mit je 20 Hüben im 50 ml- und im 24 ml-Potter homogenisiert. Die entstandene Lösung wird auf 500 ml mit Saccharosepuffer aufgefüllt. Mittels differentieller Zentrifugation (Richter, 2003), bestehend aus Nieder- und Ultrazentrifugationsschritten, werden die mikrosomalen Membranen gewonnen. Bei der Niederzentrifugation (5.000 xg, 4 °C, 15 Min.) werden Zytosol und Membranen von Zellkernen, Zellfragmenten und nicht aufgeschlossene Zellen getrennt. Das entstandene Sediment wird noch weitere 2-mal rehomogenisiert. Durch Ultrazentrifugation der vereinigten Überstände bei 100.000 xg und 4 °C für 45 Min. wird die zytosolische Fraktion von der Membranfraktion getrennt. Die Mikrosomen im Sediment werden mit 9 ml 20 mM Tris/HCl, pH 7,5 resuspendiert und durch pottern homogenisiert. Aliquots der Mikrosomensuspension werden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Lösungen:

Saccharosepuffer (4 °C):

0,25 M Saccharose

10 mM Tris/HCl, pH 7,5

Lysispuffer (4 °C):

100 mM Tris/HCl pH 8,0

1 mM MgCl₂

3.2.2. Proteinbestimmung nach der BCA-Methode

Die Bestimmung der Proteinmenge in einer Lösung erfolgt mithilfe von Proteinstandards (Rinderserumalbumin = BSA) verschiedener Konzentrationen (0, 0,01, 0,02, 0,04, 0,06, 0,08 und 0,1 µg/µl) und verschiedener Verdünnungen der Proteinprobe (1:250, 1:500, 1:1000, 1:2500, 1:5000), von denen jeweils Doppelansätze angefertigt werden. 50 µl der jeweiligen Verdünnung werden mit 300 µl BCA-Reagenz (Pierce, Herstellung nach Anleitung) versetzt und für 45 Min. bei 60 °C im Wasserbad inkubiert. 300 µl pro Kavität werden in eine Mikrotiterplatte pipettiert und im Multiskan Mikrotiterplattenphotometer (Thermo, Egelsbach)

die Absorption bei 562 nm gemessen. Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgt mittels der Software Ascent (Version 2.6, Thermo Labsystems, Egelsbach).

3.2.3. Schnelltest zum Proteinnachweis (Coomassie-Schnelltest)

Der Coomassie-Schnelltest dient dem qualitativen Nachweis von Proteinen in einer Lösung. Dafür wird die Coomassie-Reagenz „Coomassie Protein Assay Reagent“ (Pierce, Rockfort, Illinois) 1:1 mit der Probenlösung in einer Mikrotiterplatte gemischt. In Anwesenheit von Proteinen färbt sich die Lösung blau. Als Kontrolllösung dient das Puffermedium, in das die Proteine aufgenommen wurden bzw. in dem die Proteine gelöst sind.

Damit kann u.a. bei der Affinitätschromatographie, das vollständige Eluieren bzw. Abwaschen von Proteinen von der Säule kontrolliert werden. Die Säule wird solange gewaschen bis sich die Proben der aus der Säule tropfenden Lösung in der Mikrotiterplatte nicht mehr blau färben bzw. die Färbung der Lösung, der der Kontrolllösung entspricht.

3.2.4. Gewinnung von Antikörpern aus Hybridomaüberständen und Blutseren mittels einer Peptidsäule mit NHS (N-Hydroxy-Succinimid)-aktiviertem Sepharose-Säulenmaterial

Bei der Gewinnung von Antikörpern aus Hybridomaüberständen und Blutseren wird das zur Immunisierung des Tieres verwendete Peptid an ein aktiviertes Säulenmaterial gekoppelt. Der spezifische Antikörper im Serum oder Hybridomaüberstand kann dann an das immobilisierte Peptid binden und mit Hilfe eines pH-Wechsels (z.B. durch Zugabe von 100 mM Glycin, pH 2,1) von der Peptidsäule gelöst werden. Hierbei kann der spezifische Antikörper von unspezifischen Immunglobulinen getrennt und angereichert werden (Harlow und Lane, 1988).

Herstellung der Peptidsäule:

Eine Glassäule mit Fritte wird mit 2–3 ml Säulenmaterial (NHS-aktivierte Sepharose, GE Healthcare, München) befüllt und das Säulenmaterial mit der 10–15fachen Menge an 1 mM Salzsäure (4 °C) aktiviert. Das lyophilisierte Peptid (2 mg/ml Säulenmaterial) wird in 0,2 M NaHCO₃ + 0,5 M NaCl (pH 8,3) gelöst und mit dem Säulenmaterial für 2,5 Std. unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur (RT) in der geschlossenen Glassäule inkubiert. Anschließend lässt man die Peptidlösung heraustropfen und blockiert noch freie, reaktive NHS-Gruppen durch Inkubation mit 0,5 M Ethanolamin + 0,5 M NaCl (pH 8,0) für mindestens 4 Std. bei 4 °C. Durch dreimaliges alternierendes Waschen mit 0,1 M NaOAc + 0,5 M NaCl (pH 4,0) und 0,5 M Ethanolamin + 0,5 M NaCl (pH 8,0) können ungebundene oder schwach gebundene Moleküle von der Säule entfernt werden. Die Säule wird in TBS + 0,05 % NaN₃ bei 4 °C gelagert.

Affinitätsreinigung eines Antikörpers über die Peptidsäule:

Ca. 5 ml der Antikörper enthaltenden Lösung (Hybridomaüberstand oder Kaninchenserum) wird mit 15-20 ml TBS verdünnt und anschließend über Nacht bei 4 °C über die epitopspezifische Peptidsäule gepumpt. Danach wird die Säule mit TBS gewaschen, bis die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm nahezu null ist. Das Ablösen der Antikörper (Elution) erfolgt zuerst mit 100 mM Glycin (pH 2,1) und anschließend mit 100 mM Ethanolamin (pH 11,5), wobei die Eluate mit 1 M Tris (pH 8,0) neutralisiert werden. Durch Absorptionsmessung bei 280 nm im Photometer kann die eluierte Antikörpermenge mithilfe folgender Formel ermittelt werden:

$$\text{Antikörpermenge [mg]} = \text{Absorption (280 nm)} \cdot \text{Volumen [ml]} \cdot 0,8 \text{ mg/ml}$$

Die Antikörpereluate werden in Vivaspin-Röhrchen (MWCO 30.000 Da) dreimal mit 15 ml 0,2 M NaHCO₃ + 0,5 M NaCl (pH 8,3) gewaschen (2500 xg, 4 °C) und auf eine Endkonzentration von 1 mg/ml eingestellt.

3.2.5. Gewinnung von Antikörpern aus Hybridomaüberständen und Blutseren mittels einer Protein A- bzw. G-gekoppelten Agarosesäule

Protein A bzw. Protein G sind Zellwandproteine aus *Staphylococcus aureus* bzw. *Streptococcus sp.*, die eine hohe Affinität zu Immunglobulinen (IgG) haben. Je nach Antikörperwirtspezies binden diese IgGs unterschiedlich stark an Protein A bzw. Protein G. So binden z.B. Kaninchenantikörper besser an Protein A, Mausantikörper dagegen besser an Protein G. Vorteil dieser Methode ist die einfache Handhabung und die hohe Ausbeute an gereinigtem Antikörper (Harlow und Lane, 1988).

Affinitätsreinigung der Immunglobuline aus Blutserum über eine Protein A- bzw. G-Säule:

Das Blutserum wird 10-mal über die Protein A- bzw. G-Säule geleitet, die Säule danach mit TBS bis zu einer Absorption ($A_{280\text{nm}}$) ~ 0 gewaschen und die IgGs mit 100 mM Glycin pH 2,1 eluiert. Die Mengenbestimmung und Konzentrierung der Antikörper im Vivaspin-Röhrchen erfolgt analog zu 3.2.3.

3.2.6. Herstellung einer Antikörpersäule durch Kopplung des Antikörpers an NHS-aktivierte Sepharose

Bei der Herstellung einer Antikörpersäule werden 2,5 mg des affinitätsgereinigten Antikörpers an 1,5 ml Säulenmaterial (NHS-aktivierte Sepharose, GE Healthcare) in 0,2 M NaHCO₃ +

0,5 M NaCl (pH 8,3) für 2,5 Std. bei 4 °C gekoppelt. Nicht kovalent gebundener Antikörper wird mit 10 ml 3,5 M MgCl₂ vom Säulenmaterial eluiert (Harlow und Lane, 1988, Tabelle 13.4). Anschließend wird das Säulenmaterial erneut mit TBS gewaschen und bei 4 °C in Gegenwart von TBS und 0,05 % NaN₃ gelagert.

3.2.7. Affinitätschromatographie

Im Rahmen meiner Dissertation habe ich verschiedene Affinitätschromatographien durchgeführt. Generell können mittels einer Affinitätssäulenchromatographie Proteine und Proteinkomplexe aufgrund der Affinität zu einem Liganden, einem anderen Protein oder zu Antikörpern sehr stark aus einer Probe angereichert werden. Der Anreicherungsfaktor kann dabei bis zu 1.000 - 10.000 betragen (Harlow und Lane, 1988).

Während meiner Diplomarbeit konnte ich eine Affinitätschromatographie etablieren, welche es ermöglichte das TRPV6-Protein und assoziierte Proteine anzureichern. Hierbei erfolgte zunächst eine Anreicherung über eine Calmodulin-Säule (GE Healthcare, München) in Gegenwart von Ca²⁺-Ionen mit anschließender EGTA-Elution der Proteine. Dieses Eluat wurde dann über eine TRPV6-Antikörpersäule geleitet und von dieser mit dem antikörperspezifischen Peptid eluiert (siehe auch Abb. 11).

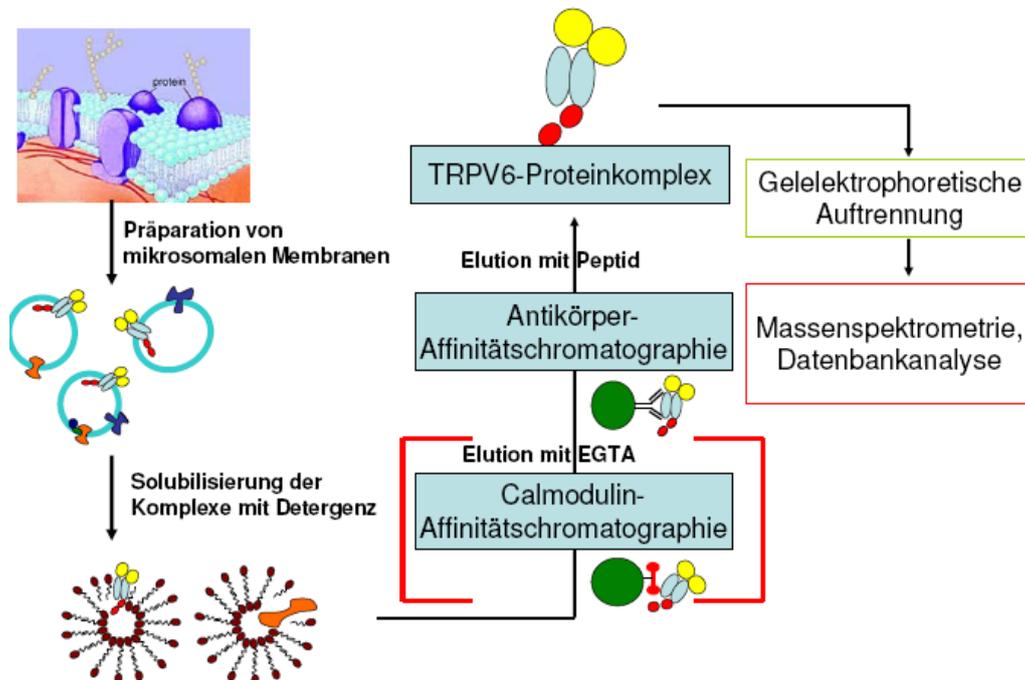


Abb. 11: Flussschema der Affinitätschromatographie des TRPV6-Komplexes aus der mikrosomalen Membranfraktionen. Der Schritt der Calmodulin-Affinitätschromatographie und die dazugehörige Elution mit EGTA sollen zum Erhalt Ca²⁺-abhängiger Bindungen übersprungen werden (Stumpf, 2006).

Da die Elution mit EGTA Ca²⁺-abhängige Bindungen zerstört, wird diese Vorgehensweise im Rahmen meiner Dissertation so modifiziert, dass auf die Vorreinigung des TRPV6 Proteins

über Calmodulin verzichtet wird und die Isolierung des TRPV6-Proteinkomplexes über eine Antikörperaffinitätssäule erfolgt. Hierzu werden zunächst verschiedene TRPV6-spezifische Antikörpersäulen hergestellt (3.2.6), mikrosomale Membranen gewonnen (3.2.1) und TRPV6-Solubilisierungsbedingungen in Gegenwart verschiedener Detergenzien variiert und optimiert (3.2.7.2).

3.2.7.1. Affinitätssäulenchromatographie von TRPV6 aus humaner Plazenta

Der in humaner Plazenta gering exprimierte TRPV6-Proteinkomplex wird mit Hilfe eines antikörpergekoppelten Chromatographiematerials affinitätsgereinigt. Hierzu werden fünf Chromatographiesäulen mit einem Bettvolumen von 1,5 – 3,0 ml mit polyklonalen TRPV6-Antikörpern (429, 981) bzw. monoklonalen TRPV6-Antikörpern (20C6, 24C3, 26B3) hergestellt und für TRPV6-Affinitätschromatographien aus 500 - 1000 mg Plazentagewebe eingesetzt (siehe Tabelle 9).

Als Negativkontrolle für die Säulen mit polyklonalen TRPV6-Antikörpern dient eine Säule, die mit unspezifischen Kaninchen-IgGs gekoppelt ist. Zur Kontrolle der Säulen mit monoklonalen TRPV6-Antikörpern wird eine mit Maus-IgG gekoppelte Säule hergestellt.

Die Negativkontrollen werden immer parallel zur Affinitätschromatographie mit den spezifischen Antikörpern durchgeführt.

3.2.7.2. Solubilisierung von Proteinen aus der mikrosomalen Fraktion des humanen Plazentagewebes

Die Suspension der mikrosomalen Plazentafraktion wird dazu zunächst mit verschiedenen Detergenzien und Puffern bei 4 °C (siehe Tabelle 9) mittels eines Glas/Teflon-Potters homogenisiert, anschließend eine Stunde auf dem Schüttler inkubiert und die solubilisierten mikrosomalen Proteine durch Ultrazentrifugation (100.000 xg, 45 Min., 4 °C) von den festen Mikrosomenbestandteilen abgetrennt. Die aus der Mikrosomenmembran gelösten Proteine befinden sich im Überstand und werden im Folgenden über die in Tabelle 9 aufgezeigten Affinitätssäulen geleitet.

Tabelle 9: Zusammensetzung der Solubilisierungslösungen für die Mikrosomen aus humaner Plazenta bzw. die verwendeten Antikörperaffinitätsäulen.

Detergenz (Konzentration)	Ausgangs- material	Pufferzusammen- setzung	End- volumen	Affinitäts- säulen	Verwendung
Natriumdeoxy- cholat (0,5 %)	750 mg Mikrosomen	20 mM Hepes (pH 7,5) 1 mM Ca ²⁺ Proteaseinhibitoren*	200 ml	20C6 / Maus -IgG	CaM-Säulen- Elutionsprofil + Affinitätschromato- graphie
CHAPS (0,5 %)	900 mg Mikrosomen	50 mM Hepes (pH 7,5) 1 mM Ca ²⁺ Proteaseinhibitoren*	200 ml	20C6 / Maus -IgG	Affinitätschromato- graphie + 1D-SDS- PAGE + WB
Nonidet P-40 (1,25 %)	500 mg Mikrosomen	20 mM Hepes (pH 7,5) 1 mM Ca ²⁺ Proteaseinhibitoren*	200 ml	20C6 / Maus -IgG	Affinitätschromato- graphie + 1D-SDS- PAGE
Thesit (2,5 %)	1000 mg Mikrosomen	50 mM Hepes (pH 7,5) 1 mM Ca ²⁺ Proteaseinhibitoren*	320 ml	26B3+24C3 / Maus-IgG	Affinitätschromato- graphie + 1D-SDS- PAGE + WB
Dodecyl-β-D- maltosid (1,25 %)	500 mg Mikrosomen	1x Extraktionspuffer** 1 mM Ca ²⁺ Proteaseinhibitoren*	40 ml	981 / Präimmun	Affinitätschromato- graphie + Blue Native-PAGE
Digitonin (1 %)	1000 mg Mikrosomen	1x Extraktionspuffer** 1 mM Ca ²⁺ Proteaseinhibitoren*	80 ml	981 / Präimmun	Affinitätschromato- graphie 1D-SDS- PAGE + WB + Blue Native-PAGE
Triton-X-100 (1,25 %)	500 mg Mikrosomen	1x Extraktionspuffer** 1 mM Ca ²⁺ Proteaseinhibitoren*	40 ml	20C6 + 429 / Maus IgG	Affinitätschromato- graphie + Blue Native-PAGE

* Der Proteaseinhibitorenmix besteht aus Leupeptin (Konz. 1 mg/ml, Verdünnung 1:500), Pepstatin (Konz. 1 mg/ml, Verdünnung 1:500) und PMSF (Konz. 17,4 mg/ml, Verdünnung 1:1000).

** Zusammensetzung Extraktionspuffer: 0,75 M ε-Aminocaprinsäure, 40 mM NaCl, 50 mM Bis-Tris/HCl (pH 7,0).

3.2.7.3. Aufreinigungstechniken der Affinitätsäulenchromatographie

Manuelle Aufreinigung

Das Solubilisat der Plazentamikrosomen wird mit einer Fließgeschwindigkeit von ca. 3 ml/Min. mithilfe einer Peristaltikpumpe über die zuvor von Hand mit 30 ml Puffer äquilibrierte jeweilige AK-Säule für 4 Std. bei 4 °C gepumpt. Anschließend wird die AK-Säule mit Extraktionspuffer bis zum Erreichen einer A_{280nm} von nahezu null gewaschen. Die folgende Elution erfolgt fünfmal mit 1 ml einer Lösung mit dem antigenen Peptid (1,3 mg/ml), wobei unterschiedliche Inkubationszeiten von 5, 10 und 15 Min. gewählt werden. Die Elution erfolgt durch kompetitive Verdrängung, wobei das antigene Peptid in weit aus höherer Konzentration als das TRPV6-Protein vorliegt und mit diesem um die Bindestellen am Antikörper konkurriert.

Nach Vereinigung der Eluate werden diese in Vivaspinn-Röhrchen (MWCO: 10.000 Da) ultrafiltriert und konzentriert, wobei auch die niedermolekularen Antigen-Peptide abgetrennt werden. Hierzu wird das Eluat auf ein Volumen von ca. 500-1000 µl eingengt, mit 3 mal 15 ml TBS-Puffer gewaschen und auf ein Endvolumen von ca. 100-250 µl eingengt. Werden die Proteine für die sich anschließende Methode in nativer Form benötigt, wird die Lösung bis zur schnellstmöglichen Weiternutzung bei 4 °C oder auf Eis gelagert. Zur Denaturierung kann

die Proteinlösung mit Laemmli-Puffer versetzt werden. Die mit Peptid beladene Antikörpersäule wird mit 100 mM Glycin pH 2,1 unter Beobachtung der Absorption des Eluats bei $A_{280\text{nm}}$ regeneriert werden. Anschließend wird die Säule in TBS mit 0,05 % NaN_3 gelagert.

Automatische Aufreinigung mittels einer DuoFlow (BioRad)-Chromatographie-einheit

Die Affinitätsreinigung kann mit Hilfe einer FPLC-Anlage, z.B. DuoFlow der Firma Bio-Rad (München), zum Großteil automatisiert werden. Die Aufreinigung folgt dem in Tabelle 10 wiedergegebenen Arbeitsprotokoll. Die Äquilibrierung, die Beladung, das Waschen und die Elution der Antikörpersäulen erfolgt analog zu der oben beschriebenen manuellen Aufreinigung (3.2.7.3). Der maximale Pumpendruck kann zum Schutz der Probe und des Geräteaufbaus eingestellt werden und liegt bei den verwendeten Glassäulen bei 12 psi.

Tabelle 10: Ablaufprotokoll der Affinitätschromatographie mittels des DuoFlow-Systems. Die Tabelle zeigt die verschiedenen Schritte, Dauer und Durchflussvolumen der verwendeten Puffer und Lösungen während der automatisch vom DuoFlow-System durchgeführten Affinitätschromatographie.

Schritt	Medium	Volumen	Fließrate	Bemerkung	
1	Äquilibrieren der Säule	Extraktionspuffer	15 ml	1,00 ml/Min.	
2	Inkubation mit Extrakt	Extrakt	40 ml	1,00 ml/Min.	Lösung wird dreimal über die Säule gepumpt.
3	Waschen der Säule	Extraktionspuffer	30 ml	1,00 ml/Min.	OD-Kontrolle mittels UV-Detektor im Gerät
4	Elution der gebundenen Proteine	Elutionspuffer	5 ml	0,25 ml/Min.	
5	Waschen der Säule	Extraktionspuffer	5 ml	1,00 ml/Min.	

Während der Waschvorgänge (Schritt 1, 3, und 5) und dem Elutionsvorgang (Schritt 4) liegt ein linearer Lösungsfluss vor, d.h. die Lösung läuft einmalig über die Säule und wird am Ende aufgefangen. Dagegen wird der Extrakt zur bestmöglichen Bindung der Proteine an die Antikörpersäule mehrfach über die Säule gepumpt (Schritt 2). Der angeschlossene Fraktionierer sammelt die Elutionslösung und die anschließend verwendete Waschlösung nach Durchlaufen der Säule in 1 ml-Fraktionen.

An beide Techniken schließt sich eine Konzentrierung der Eluate mittels Ultrafiltration und die Regeneration des Säulenmaterials an. Hierzu werden die Eluate in Vivaspin-Röhrchen (MWCO: 10-100 kDa) konzentriert und mit TBS umgepuffert.

Die Regeneration der Säule erfolgt wie im vorhergehenden Abschnitt zur manuellen Aufreinigung (3.2.7.3) beschrieben.

3.2.7.4. Affinitätssäulenchromatographie von TRPC6 aus Mastzellen und aus muriner Lunge von Wildtyp- und TRPC6-Knockout-Tieren

Zur Isolierung der TRPC6-Proteine werden zwei TRPC6-Affinitätschromatographiesäulen hergestellt.

Für die Versuche mit Mastzellen werden je 50 µl aktivierte NHS-Sepharose mit 50 µg TRPC6-Antikörper 861 bzw. mit 150 µl TRPC6-spezifischem Rattenhybridomaüberstand laut Hersteller (GE Healthcare, München) kovalent gekoppelt. Für die Isolationen des TRPC6-Proteinkomplexes aus muriner Lunge werden 100 µg TRPC6-Antikörper 861 bzw. 5 ml TRPC6-spezifischer Rattenhybridomaüberstand laut Hersteller an 150 µl aktivierte NHS-Sepharose gekoppelt.

Zur Solubilisierung der TRPC6-Proteine aus Mastzellen werden fünf Zellsedimente, die aus einer Primärzellkultur gewonnen wurden (Nassgewicht ca. 100-200 mg, hergestellt von M. Meißner Pharmakologie, Universität des Saarlandes), in 25 ml 1 % Dodecyl-β-D-maltosid, 20 mM Hepes (pH 7,5) und Proteaseinhibitorenmix 20-mal gepottert. Bei der Verwendung von Lungengewebe werden je zwei Stück aus Wildtyp und Knockout-Mäusen präpariert (ca. 300-400 mg, bei -80 °C gelagert und mit 10 ml des gleichen NaDox-Puffers ebenfalls 20-mal gepottert.

Die Lösungen werden anschließend 1 Std. bei 4 °C geschüttelt und dann 45 Min. bei 100.000 xg ultrazentrifugiert. Die Überstände mit den solubilisierten Proteinen werden weiter mit den TRPC6-Antikörpersäulen, sowie mit bereits in der Arbeitsgruppe vorhandenen Säulen mit gekoppeltem Kaninchen-Präimmunserum und Immunglobulinen aus der Maus für 4 Std. bei 4 °C inkubiert. Die Elution der Proteine erfolgt durch Inkubation der Säule mit je 50 µl 2x Laemmli-Puffer ohne Reduktionsmittel bei 61 °C für 20 Min. Nach Zentrifugation für 10 Sek. bei maximaler Geschwindigkeit wird der Überstand abgenommen, die Proben mit 6,25 µl 2 mM DTT versetzt und für weiter 15 Min. auf 61 °C erhitzt.

3.2.8. *in vitro*-Translation (ivTL)

Zur Herstellung der *in vitro*-translatierten Proteine werden folgende cDNS-Konstrukte und Plasmide verwendet:

- **TRPV6:** hTRPV6/pcDNA3 (Dr. U. Wissenbach, Pharmakologie, Universität des Saarlandes, beschrieben in Wissenbach et al., 2001)
- **Cyclophilin B:** CyPB-myc/pcDNA3 (T. Matsuyama, Nagasaki Universität, Japan; beschrieben in Obata et al., 2005)

Die *in vitro*-Translation wird mit Hilfe eines kombinierten Transkription/Translation-Systems (TNT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation System, Promega, Darmstadt) in einem Ansatz durchgeführt.

Dazu wird 1 µg der jeweiligen cDNS mit 25 µl Retikulozytenlysat (Master Mix), 1 µl Transcend tRNA™ und 1 µl nichtradioaktivem Methionin gemischt und für 90 Min. bei 30 °C inkubiert.

Die gebildeten Proteine lassen sich auf Grund der eingebauten biotinylierten Aminosäure Lysin im folgenden Western Blot mit biotinaffinem Streptavidin-HRPO-Enzym nachweisen.

3.2.9. Immun-/Coimmunpräzipitation

Bei der Immunpräzipitation (IP) werden Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper präzipitiert. Sind mit diesen Proteinen andere Proteine assoziiert, werden auch diese mit Hilfe des Antikörpers coimmunpräzipitiert. Dabei können sowohl bekannte, als auch unbekannte Interaktionspartner identifiziert werden (Adams et al., 2002). Zur IP eignen sich sowohl polyklonale als auch monoklonale Antikörper. Der Vorteil der polyklonalen Antikörper liegt darin, dass sie meist mehrere Epitope eines Proteins erkennen und dadurch mit höherer Affinität an Proteine binden (Harlow und Lane, 1988).

3.2.9.1. Herstellung der Proteinextrakte aus humanen und murinen Geweben und Mastzellen für die Coimmunpräzipitation

Zur Herstellung eines Gewebeextraktes aus humaner Plazenta werden zu 25 g Gewebe (frisch oder gefroren) 200 ml NaDox-Hepes-Puffer (0,5 % Natriumdeoxycholat, 20 mM Hepes pH 7,5) und PI-Mix gegeben und das Gemisch zunächst im Mixer und anschließend durch 20 Hübe im Glas/Teflon-Potter homogenisiert. Nach Inkubation auf dem Schüttler für 1 Std. bei 4 °C wird die Lösung ultrazentrifugiert (100.000 xg, 45 Min., 4 °C).

Zur Herstellung des Extrakts aus den Plazentamikrosomen werden jeweils 10 mg Mikrosomen pro Ansatz eingesetzt. Hierbei stehen drei verschiedene Solubilisierungspuffer zur Auswahl:

1. 4,0 ml NaDox-Hepes-Puffer plus PI-Mix
2. 4,5 ml Solubilisierungspuffer mit EGTA plus PI-Mix
3. 4,5 ml Solubilisierungspuffer mit Ca²⁺ plus PI-Mix

Die Solubilisierungspuffer mit EGTA bzw. Ca²⁺ weisen im Vergleich zum NaDox-Hepes-Puffer schonendere Solubilisierungseigenschaften auf.

Die Mikrosomenlösungen werden mit dem jeweiligen Solubilisierungspuffer durch 20 Hübe im Glas/Teflon-Potter homogenisiert und nach Inkubation auf dem Schüttler für 1 Std. bei 4 °C ultrazentrifugiert (100.000 xg, 45 Min., 4 °C). Die Überstände werden weiterverwendet.

Solubilisierungspuffer mit EGTA*: 1 % (w/v) Dodecyl- β -D-maltosid
10 mM Hepes (pH 7,5)
190 mM NaCl
10 mM KCl
1 mM EDTA

Solubilisierungspuffer mit Ca²⁺***: 1 % (w/v) Dodecyl- β -D-maltosid
10 mM Hepes (pH 7,5)
190 mM NaCl
10 mM KCl
1 mM CaCl₂

*Die Zusammensetzung des Puffers ist in zwei Veröffentlichungen (Bildl et al., 2004; Berkefeld et al., 2006) der Arbeitsgruppe von Bernd Fakler (Universität Freiburg) beschrieben.

**Aufgrund möglicher Ca²⁺-abhängiger Bindungen zwischen TRPV6 und anderen Proteinen wird der Ca²⁺-Chelator EGTA durch CaCl₂ ersetzt.

Bei der Verwendung von Mauslungen- und Mausplazentagewebe oder Primärzellkulturen von Mastzellen werden vier Plazenten, 2 Lungen oder das Sediment einer Mastzellkulturflasche in 10 ml 1 % Dodecyl- β -D-maltosid, 20 mM Hepes (pH 7,5) und Proteaseinhibitorenmix nach der o.g. Vorgehensweise homogenisiert und ultrazentrifugiert.

3.2.9.2. Durchführung der Coimmunpräzipitation

Bei der Verwendung von *in vitro*-translatierten Proteinen wird mit NaDox-Hepes-Puffer und Proteaseinhibitoren eine Proteinlösung hergestellt.

Zur Coimmunpräzipitation werden in der Regel 2 μ g Antikörper an 30 μ l Protein A-, G- oder L-Agarose (abhängig von der Spezies, aus der der Antikörper stammt) über 2 Std. im jeweiligen Solubilisierungspuffer bei 4 °C inkubiert (Abweichungen siehe Tabelle 11). Nach anschließendem Waschen der Agarosematrix wird der Proteinextrakt bzw. die Proteinlösung für mindestens 4 Std. bei 4 °C mit der antikörpergebundenen Agarose inkubiert. Danach wird das Agarosematerial dreimal mit dem Puffer gewaschen. Dazu kann das Agarosematerial entweder bei 800 xg und 4 °C für 3 Min. in Reaktionsgefäßen sedimentiert und die überstehende Lösung abgenommen werden oder die Agarosematrix in Röhrchen mit Frittenboden durch Zentrifugation für 1 Min. bei 800 xg und 4 °C von der durch die Fritte laufenden Lösung getrennt werden. Im Anschluss kann das Material mit den gebundenen Antikörpern und Proteinen wiederum durch Zugabe von Puffer gewaschen werden.

Zum Ablösen der immunpräzipitierten Proteine von der Protein A- oder G-Säule wird paratopspezifisches Peptid im Überschuss (Konzentration: 1,3 mg/ml) zugegeben oder die

Proteine werden durch Inkubation mit 30 µl Laemmli-Puffer für 20 Min. bei 61 °C eluiert. Die denaturierten Proteine werden anschließend für die SDS-PAGE und die Western Blot-Analyse eingesetzt.

Tabelle 11: Mengenverhältnisse von Serum / affinitätsgereinigtem Antikörper / Hybridomaüberstand und Protein A-, G- oder L-Agarosematerial für die Coimmunpräzipitation.

<u>Antikörper</u>	<u>Menge</u>	<u>Volumen Agarosematerial</u>
981-Serum	6 µl	30 µl Protein A-Agarose
861 (affinitätsgereinigt)	5 µg	50 µl Protein A-Agarose
Rattenhybridomaüberstand	250 µl	50 µl Protein L-Agarose

3.2.10. TRPV6-Peptidblotanalyse mit ivTL-Produkten

Zur Untersuchung der Region im TRPV6-Protein in der die Wechselwirkung mit Cyclophilin B stattfindet, wird ein Peptidplot verwendet. Der TRPV6-Peptidplot (M. Jung, Medizinische Biochemie, Universität des Saarlandes) besteht aus einer Filtermembran, auf die die komplette TRPV6-Aminosäuresequenz aufgeteilt in Peptidspots von je 12 Aminosäuren synthetisiert wurde. Die Sequenzüberlappung zwischen zwei Peptiden beträgt 6 Aminosäuren. Außerdem ist das Epitop des 26B3-Antikörpers an einer Stelle aufgetragen und dient als Kontrolle. Die Membran wird nacheinander mit 25 µl ivTL CyPB (Herstellung siehe 3.2.8) und 25 µl Retikulozytenlysat (als Negativkontrolle), jeweils mit 15 ml TBS verdünnt, über Nacht bei 4 °C inkubiert. Der Nachweis biotinylierter Proteine erfolgt nach dem Waschen mit TBS mit Streptavidin-HRPO (siehe 3.2.23).

Nach der Inkubation mit CyPB wird die Membran regeneriert und anschließend mit Retikulozytenlysat inkubiert. Zur Regeneration wird die Membran dreimal 10 Min. in Regenerationspuffer A, dreimal 10 Min. in Regenerationspuffer B und dreimal 10 Min. in 100 % Ethanol inkubiert.

Zur Identifikation der möglichen Interaktionsstellen zwischen TRPV6 und CyPB werden die durch Retikulozytenlysat angefärbten Spots von den CyPB-positiven Spots subtrahiert.

Lösungen:

Regenerationspuffer A:

8 M Harnstoff

1 % (w/v) SDS

0,1 % (v/v) β-Mercaptoethanol

Regenerationspuffer B:

50 % (v/v) Ethanol

10 % (v/v) Essigsäure

3.2.11. Aufreinigung von Cyclophilin B

Das Cyclophilin B-Protein soll aufgereinigt werden, um damit Bindungsstudien und biochemische Analysen in Anwesenheit bzw. Abwesenheit mit dem TRPV6-Protein durchführen zu können.

Aufgrund eines kalkulierten isoelektrischen Punktes von 9,33 bietet sich eine Aufreinigung des Cyclophilin B-Proteins bei neutralen Pufferbedingungen von pH 7,5 über eine Kationenaustauschersäule, in diesem Fall SP-Sepharose™ Fast Flow (GE Healthcare, München), an. Unter diesen Bedingungen ist CyPB positiv geladen und bindet an die SP-Säule. Die Bindung lässt sich durch die Erhöhung der Kationenkonzentration von z.B. Na⁺ lösen, da diese um die negativen Bindestellen des Säulenmaterials mit dem Cyclophilin B-Protein konkurrieren. Die Kationenaustauschchromatographie erfolgt in Anlehnung an die Vorgehensweise von Spik *et al.* (Spik *et al.*, 1991).

Aufgrund der unterschiedlichen CyPB-Quellen ergeben sich mehrere Möglichkeiten das Protein zu isolieren.

3.2.11.1. Aufreinigung aus Kuhmilch

Zur Isolierung von CyPB aus frischer, nicht entrahmter Kuhmilch, die 1-2 Std. nach dem Melken direkt vom Bauernhof geholt wurde, muss zunächst das darin enthaltene Fett entfernt werden. Durch Zentrifugation bei 4 °C und 2.500 xg für 10 Min. setzt sich der Rahm als zähflüssige Phase oben ab und wird mit einem Löffel entnommen. Die Lösung wird durch Mull oder einen Papierfilter filtriert und dann 1:5 mit NaDox-Hepes-Puffer (0,5 % Natriumdeoxycholat, 20 mM Hepes pH 7,5) verdünnt. 50 ml der Lösung werden bei 4 °C dreimal über eine zuvor äquilibrierte SP-Ionenaustauschersäule (GE Healthcare, München) gepumpt (Flussrate: ~3 ml/Min.). Die Elution der gewaschenen Säule erfolgt mit einem Ionengradienten von 0 – 0,5 M NaCl in 2 ml Fraktionen (Flussrate: ~3 ml/Min.). Für die anschließende SDS-PAGE und Western Blot-Analyse werden die Proteine aus 500 µl pro Fraktion mittels Trichloressigsäure gefällt (siehe 3.2.25). Die benutzte SP-Ionenaustauschersäule wird durch Inkubation mit 1 M NaCl und Waschen mit NaDox-Hepes-Puffer regeneriert. Das Ablösen der Proteine wird durch Absorptionsmessung bei 280 nm kontrolliert.

3.2.11.2. Aufreinigung aus transformierten Bakterien

Anzucht von CypB-BL21(pLys)-Bakterien

400 ml LB-Medium (plus 50 µg/ml Chloramphenicol und 50 µg/ml Ampicillin) werden mit 50 ml einer „über Nacht“-Vorkultur, die CyPB/pGEX2T (Dr. U. Wissenbach, Pharmakologie, Universität des Saarlandes) in BL21-Bakterien enthält, angeimpft und bei 37 °C angezogen.

Am folgenden Tag wird die gesamte Bakteriensuspension zugegeben und bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer OD_{280nm} von 0,7–1 wachsen gelassen. Anschließend wird 0,1 mM IPTG dazugeben und die Expression des CyPB-Proteins gestartet. Die Expression erfolgt bei 29 °C für 3 Std. Anschließend wird die Bakteriensuspension abzentrifugiert (15 Min bei 3.000 xg). Der Überstand wird in 15 ml TBS resuspendiert und bei -80 °C eingefroren.

Lösungen:

LB-Medium (pH 7,5):

1 % (w/v) Select Pepton¹⁴⁰ (Bacto Trypton)

1 % (w/v) NaCl

0,5 % (w/v) Hefe (Select Yeast Extrakt)

+ 50 µg/ml Ampicillin (vor Animpfen)

+ 50 µg/ml Chloramphenicol (vor Animpfen)

Proteinfreisetzung durch Frier-Tau-Lyse

Die eingefrorene Bakteriensuspension wird wieder aufgetaut und in der Ultrazentrifuge bei 20.000 xg für 45 Min. zentrifugiert. Durch das Einfrieren und anschließende Auftauen wird die äußere Bakterienhülle zerstört und die im periplasmatischen Raum (auch Periplasma genannt) enthaltenen Proteine, auch das Cyclophilin B, freigesetzt. Das Protein wird somit im Überstand der Ultrazentrifugation erwartet.

Proteinfreisetzung durch Ultraschall/Triton-X-100-Lyse

Die eingefrorene Bakteriensuspension wird wieder aufgetaut und die Zellen mit einer Ultraschallsonde mit 5 Pulsen bei 20 % Intensität für 1 Min. lysiert. Anschließend gibt man Triton-X-100 bis zu einer Endkonzentration von 2 % hinzu und inkubiert die Suspension für 45 Min. auf Eis. Zuletzt wird die Bakteriensuspension für 45 Min. bei 20.000 xg ultrazentrifugiert. Der erhaltene Überstand sollte die freigesetzten Proteine, darunter auch das Cyclophilin B, enthalten.

Aufreinigung von CyPB über SP-Ionenaustauschersäule

Der Überstand wird 1:5 mit TBS-Puffer verdünnt, und dreimal bei 4 °C über die mit TBS-Puffer äquilibrierte SP-Ionenaustauschersäule gegeben. Nach anschließendem Waschen mit TBS-Puffer erfolgt die Elution der gebundenen Proteine mit 0,5 M NaCl. Die abgelösten Proteine werden danach mit Ultrafiltrationsröhrchen (MWCO: 30.000 Da bzw. 10.000 Da) in Größenfraktionen von > 30 kDa, >10 kDa x <30 kDa und <10 kDa aufgetrennt und diese im

Western Blot auf Cyclophilin B getestet. Die SP-Ionenaustauschersäule kann durch Inkubation mit 1 M NaCl und Waschen mit NaDox-Hepes-Puffer regeneriert werden.

3.2.11.3. Aufreinigung von CyPB aus humaner Plazenta

25 g Plazentagewebe wird mit 100 ml NaDox-Hepes-Puffer und Proteaseinhibitorenmix im Mixer zerkleinert und ca. 20mal im Glas/Teflon-Potter gepottert. Durch differentielle Zentrifugation wird zunächst bei 4 °C und 5.000 xg für 15 Min. der Zellschrott entfernt und anschließend bei 100.000 xg für 45 Min. die gelösten Proteine von den ungelösten Proteinen getrennt. Der nun erhaltene Überstand mit gelösten Proteinen wird zu Aufreinigung von Cyclophilin B über eine mit NaDox-Hepes-Puffer äquilibrierte SP-Ionenaustauschersäule gegeben. Die fraktionierende Elution erfolgt hier wie bei 3.2.11.1 allerdings mit einem Ionengradienten von 0 - 0,3 M NaCl. Von den erhaltenen Eluatfraktionen werden 500 µl entnommen und die Proteine mit TCA gefällt (siehe 3.2.25).

3.2.12. Chymotrypsin-Aktivitätsassay zur Beurteilung der Cyclophilin B-Aktivität

Zur Überprüfung der Aktivität des gereinigten Cyclophilin B-Proteins wird ein Enzymassay mit der Serinprotease Chymotrypsin durchgeführt. Chymotrypsin spaltet Proteine und Peptide auf der Carboxy-Seite von aromatischen und hydrophoben Aminosäuren, wie Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan und Leucin (Karlson et al., 2005). Bei einer Prolin-haltigen Bindung wird dabei die *trans*-Konformation gegenüber der *cis*-Konformation bevorzugt.

Als Substrat dient Succinyl-Alanyl-Alanyl-Prolyl-Phenylalanin-4-Nitroanilid (Suc-AAPF-pNA), das von der Protease gespalten wird. Die Entstehung der Produkte kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen werden.

Durch Zugabe von Chymotrypsin in großem Überschuss wird der größte Teil des Substrats in *trans*-Konformation innerhalb der ersten 10 Sek. gespalten (sog. burst-Phase). Die *cis/trans*-Isomerisierung des verbleibenden Substratpeptids erfolgt in einer langsameren Reaktion, die letztlich den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt für den Abbau des Substrats in diesem gekoppelten Testes darstellt (Fischer et al., 1984)

Befindet sich in den gereinigten Cyclophilin B Proben das aktive Enzym erfolgt die *cis/trans*-Isomerisierung schneller und das Substrat wird schneller vom Chymotrypsin abgebaut.

Der Versuchsansatz wird in einer Photometerküvette durchgeführt. Dazu werden 0,5 ml der verschiedenen Substrat-CyPB-Verdünnungen aus Tabelle 12 mit 0,1 ml Chymotrypsinlösung (0,0025 mg/ml) gemischt und die Extinktionsänderung (ΔE) auf Grund des freiwerdenden

4-Nitroanilin alle 20 Sek. über einen Zeitraum von 3 Min. bei 405 nm bestimmt. Der molare Extinktionskoeffizient ϵ bei dieser Wellenlänge beträgt $9.600 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Tabelle 12: Herstellung verschiedener Ansätze an Substrat-CyPB-Verdünnungen. Die Lösung mit 0,4 M NaCl + 50 mM Hepes dient als Negativkontrolle.

Verdünnungspuffer [ml]	0,89	0,88	0,87	0,85	0,80	0,75	0,65
gereinigte CyPB-Lösung / 0,4M NaCl + 50mM Hepes [ml]	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Substratstammlösung [ml]	0,01	0,02	0,03	0,05	0,10	0,15	0,25

Die spezifische Aktivität $A \text{ [U/mg]} = [\mu\text{mol Substrat} / (\text{min} * \text{mg Enzym})]$ errechnet sich nach folgender Formel: $A = ((\Delta E * V) / (\Delta t * \epsilon * d * m)) * 10^6$

Δt = Zeit [min]

V = Volumen des Testansatzes in der Küvette [l]

d = Schichtdicke [cm]

m = Enzymmenge in Küvette [mg]

Lösungen:

Verdünnungspuffer:

100 mM Tris, pH 8,0

10 mM CaCl_2

Substratstammlösung:

1mM Suc-AAPF-pNA in 200 mM Tris-HCl, pH 8,0

Enzymlösung:

0,0025 mg/ml Chymotrypsin in Verdünnungspuffer

3.2.13. Reinigung von TRPV6-GST-Fusionsproteinen

Die TRPV6-GST-Fusionsproteine (Details siehe Abb. 12) werden analog zu Cyclophilin B in *E. coli* BL21-Bakterien exprimiert (siehe 3.2.11.2) und durch Zentrifugation (15 Min. bei 3.000 xg) geerntet. Das Sediment der Bakterienkultur wird mit 15 ml TBS und PI-Mix resuspendiert. Der Aufschluss der Bakterien erfolgt mittels Ultraschall/Triton-X-100-Lyse (siehe 3.2.11.2). Die Aufreinigung der Fusionsproteine erfolgt mit einer Glutathion (GSH)-Agarose-Säule. Der Überstand der Ultrazentrifugation wird für 2 Std. bei 4 °C mit dieser Säule inkubiert, die Säule anschließend mit TBS + PI-Mix gewaschen. Die Elution der gebundenen Fusionsproteine erfolgt in 7 Fraktionen à 1 ml Glutathionpuffer (50 mM Tris, pH 8,0; 50 mM Glutathion; pH 7,4), wobei die Säule jeweils für 4 Min. damit inkubiert wird. Die Eluate werden

danach in Ultrafiltrationsröhrchen (MWCO 10.000 Da) konzentriert und die gewonnenen Fusionsproteine bis zu ihrer Weiterverwendung bei -80 °C gelagert.

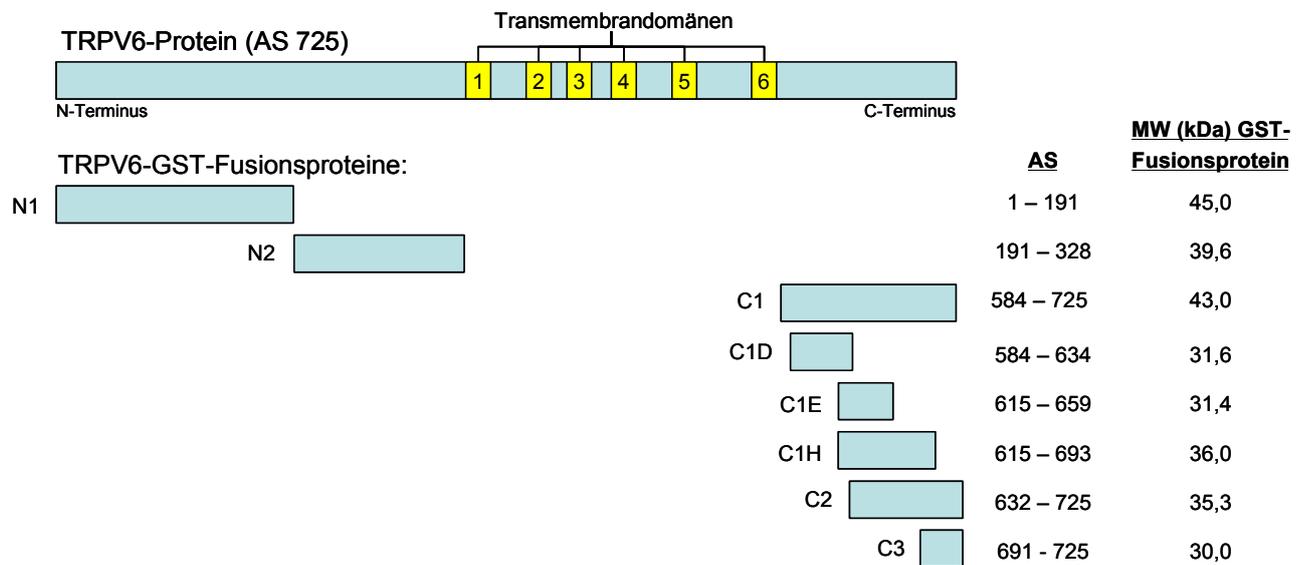


Abb. 12: Lage und Aminosäuresequenzen der TRPV6-Fragmente im Gesamtprotein und Größe der daraus gebildeten TRPV6-GST-Fusionsproteine.

3.2.14. GST-Pulldown-Analyse

GST-Pulldown-Analysen werden zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen eingesetzt (Vikis und Guan, 2004). Hierbei ist ein Protein an GST gebunden, das andere wird in Lösung dazugegeben. Im Falle einer Interaktion kann das Protein in Lösung mit dem GST-gebundenen Protein auf Grund der Affinität von GST zu Glutathion (GSH) über eine GSH-Agarosesäule isoliert werden.

Nach Denaturierung der Proteine erfolgt deren Auftrennung in der SDS-PAGE. Die Interaktion zweier Proteine kann dann im Western Blot mittels spezifischer Antikörper gegen eines der Proteine oder aufgrund der Verwendung eines markierten Proteins, das z.B. zuvor in Gegenwart von ³⁵S-Methionin *in vitro*-translatiert wurde, detektiert werden (*in vitro*-Translation, Einarson und Orlick, 2002).

In diesem Experiment sind die Proteine, welche an TRPV6 binden könnten, in einem Plazentagewebeextrakt enthalten. Zu dessen Herstellung werden 50 g Plazentagewebe mit 200 ml Extraktionspuffer und Proteaseinhibitorenmix im Mixer zerkleinert, nacheinander mit jeweils 20 Hüben im 50 ml- und im 24 ml-Glas/Teflon-Potter homogenisiert und für 1 Std. bei 4 °C gerührt. Anschließend werden die löslichen Bestandteile von den unlöslichen durch Ultrazentrifugation bei 100.000 xg für 45 Min. getrennt. Für den Pulldownansatz werden ca. 20 ml des Überstands der Ultrazentrifugation mit 20 µg des jeweiligen Fusionsproteins und 75 µl GSH-Agarose gemischt. Nach anschließender Inkubation für 2 Std. bei 4 °C werden die

ungebundenen Proteine mit TBS von der Säule gewaschen bis möglichst kein Protein mehr in der Waschlösung zu detektieren ist. Die Detektion erfolgt über einen Coomassie-Schnelltest (3.2.3). Die an die Säule gebundenen Proteine werden anschließend mit 2x Laemmli-Puffer eluiert.

3.2.15. Saccharosedichtegradientenzentrifugation

Dichtegradientenzentrifugation mit Saccharose dient der Auftrennung von Proteinen und Proteinkomplexen nach ihrer Dichte. Durch die Zentrifugationskräfte wandern Proteine mit größerem Molekulargewicht und kugelförmiger Struktur schneller durch den Gradienten als solche mit geringerem Molekulargewicht und nichtkugelförmiger Struktur. Besteht zwischen zwei Proteinen unterschiedlichen Molekulargewichts eine Interaktion können sie gemeinsam in einer Gradientenfraction detektiert werden, deren Dichte höher liegt, als die der Fractionen der Einzelproteine.

Zur Herstellung eines Saccharosegradienten von 20% - 60% werden jeweils 6,5 ml einer 20%igen und einer 60%igen Saccharoselösung (in H₂O) hergestellt und diese in die beiden Kammern eines Gradientenmischers gegeben. Dabei kommt die geringer konzentrierte Lösung in die Kammer mit der Ausflussöffnung. Nach Anschalten der angeschlossenen Peristaltikpumpe wird die 20%ige Saccharoselösung herausgepumpt. Unter Rühren wird die in der Kammer befindliche Lösung durch die Verbindung zur zweiten Kammer kontinuierlich mit der 20%igen Saccharoselösung verdünnt. Dadurch entsteht der Gradient der über einen Schlauch mit einer langen Nadel am Ende in ein 14 ml-Zentrifugationsröhrchen gepumpt wird (Richter, 2003). Die Nadel berührt dabei fast den Boden des Röhrchens, so dass die geringer konzentrierte Lösung mit der höher konzentrierten unterschichtet wird.

Nach vorsichtigem Entfernen der Nadel wird der Gradient mit 500 µl des hergestellten Mikrosomenextrakts der humanen Plazenta (Herstellung siehe 3.2.9.1) überschichtet. Parallel wird zur späteren Größenbestimmung der Proteine und Proteinkomplexe eine Mischung aus Kontrollproteinen in NaDox-Hepes-Puffer auf ein zweites Zentrifugationsröhrchen aufgetragen. Die Zusammensetzung des Proteingemischs gibt Tabelle 13 wieder.

Tabelle 13: Kontrollproteine der Saccharosedichtegradientenzentrifugation.

<u>Protein</u>	<u>Molekulargewicht</u>	<u>Eingesetzte Menge</u>
Ferritin	440 kDa	100 µg
IgGs der Ziege	160 kDa	60 µg
Rinderserumalbumin (BSA)	65 kDa	100 µg

Die Ultrazentrifugation im Ausschwingrotor wird bei 90.000 xg und 4 °C für 16,5 Std. durchgeführt. Anschließend wird die Lösung in den Zentrifugationsröhrchen durch Anstechen

der Unterseite des Röhrchens heraus tropfen gelassen und die Lösung in 500 µl Fraktionen aufgefangen.

Die Proteine in den Fraktionen werden mit TCA-Lösung gefällt (siehe 3.2.25) und anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die Proben des Kontrollansatzes werden im Photometer auf ihren Proteingehalt hin gemessen (OD 280 nm) und die Werte in einem Diagramm dargestellt. Im Diagramm sollte dreimal eine ansteigende OD erkennbar sein. Die Höchstwerte dieser Erhebungen können den Kontrollproteinen ihrer Größe entsprechend zugeordnet werden.

3.2.16. Eindimensionale Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (1D-SDS-PAGE)

Zur Herstellung von Polyacrylamidgelen mit verschiedenen Acrylamidkonzentrationen werden folgende Komponenten in der entsprechenden Reihenfolge gemischt. Zur Herstellung des Trenngels von kleinen Gelen (ca. 8 x 8,5 cm) benötigt man 5 ml pro Gel, für das Sammelgel 2,5 ml. Für ca. 14 x 15 cm-Gele (große Gele) benötigt man 30 ml für das Trenngel und 5 ml für das Sammelgel. In das Sammelgel wird durch Einsetzen eines Kammes eine variable Anzahl von Taschen eingebaut.

Tabelle 14: Reagenzien und entsprechende Mengen zur Herstellung von 1D-SDS-Polyacrylamidgelen.

		<u>Trenngel</u>			<u>Sammelgel</u>
		7 %	10 %	12,5 %	4 %
1	Acrylamid 40 % (29:1)	1,75 ml	2,50 ml	3,13 ml	0,50 ml
2	H ₂ O	5,66 ml	4,91 ml	4,28 ml	3,21 ml
3	Trenngelpuffer, pH 8,8	2,50 ml	2,50 ml	2,50 ml	-
4	Sammelgelpuffer, pH 6,8	-	-	-	1,25 ml
5	APS	75 µl	75 µl	75 µl	37,5 µl
6	TEMED	15 µl	15 µl	15 µl	7,5 µl
	Σ	10 ml	10 ml	10 ml	5 ml

Nach Zugabe von TEMED und 10%igem APS beginnt die Polymerisierung und die Ausbildung des Gels. Unmittelbar nach Zugabe dieser beiden Substanzen wird die Lösung zwischen die dafür vorgesehenen Glasplatten gegossen. Das Trenngel wird mit Isopropanol p.a. zur Ausbildung einer schärferen Grenzschicht überschichtet, welches nach der Polymerisierung und vor dem Gießen des Sammelgels wieder entfernt wird. Nach der Polymerisierung von Trenn- und Sammelgel, kann das Gel für die Elektrophorese genutzt oder bei 4 °C gelagert werden. Dazu werden die Gele in der zusammengebauten Gelkammer mit 1x SDS Elektrophoresepuffer überschichtet und mit den jeweiligen in 2x Laemmli-Puffer denaturierten Proben (37 °C - 30 Min. / 61 °C - 20 Min. / 95 °C - 5 Min.) beladen. Die elektrophoretische Probenauftrennung erfolgt durch Anlegen einer Spannung nach folgendem Programm:

kleine Gele:

80 V 0:30 Std.
150 V 1:00 Std.

große Gele:

100 V 0:30 Std.
400 V bis Ende

Lösungen:*Trenngelpuffer, pH 8,8:*

1,5 M Tris HCl
0,4 % (w/v) SDS (Sodiumdodecylsulfat)

Sammelgelpuffer, pH 6,8 :

0,5 M Tris HCl
0,4 % (w/v) SDS

3.2.17. „Blue Native“ Gelelektrophorese zur Isolierung des TRPV6-Proteinkomplexes

Intakte Proteinkomplexe können unter nicht denaturierenden Bedingungen mit der sogenannten Blue Native Gelelektrophorese, die von Schagger und von Jagow 1991 erstmals beschrieben wurde ihrer Größe nach separiert und anschließend die Komplexbestandteile aufgetrennt werden. In der 1. Dimension werden die Proteinkomplexe ihrer Größe nach aufgetrennt. Dabei wird die Eigenladung der Komplexe durch das negativ geladene und an Proteine bindende Coomassie (daher der Namensteil „Blue“) überdeckt. Coomassie lagert sich an die hydrophoben Aminosäuren der Proteine an (Wittig, 2008) Die Auftrennung der 1. Dimension ist eine Endpunktmethode, da die Proteinkomplexe aufgrund ihrer nichtdenaturierten Struktur im Gradientengel ab einer bestimmten Acrylamidkonzentration das Polyacrylamidnetz nicht mehr durchdringen können. Nach der Inkubation des Gels der 1. Dimension in denaturierendem Puffer, erfolgt in der 2. Dimension mittels einer reduzierten SDS-PAGE die Auftrennung der Komplexe in ihre Bestandteile gemäß ihrem Molekulargewicht.

Zur Solubilisierung werden die nichtionische Detergenzien Dodecyl- β -D-maltosid, Triton-X-100 oder Digitonin verwendet (3.2.7.2). Die konzentrierten Eluate der Affinitätschromatographie (3.2.7.3) werden direkt auf die Blue Native-Gelelektrophorese aufgetragen.

Blue Native Gel (1. Dimension):

Für die 1. Dimension wird ein 1,5 mm dickes Gradientengel von 4% - 13% angefertigt und mit einem 3,5%igen Sammelgel überschichtet. Dabei werden folgende Bestandteile in den entsprechenden Mengen gemischt:

Tabelle 15: Reagenzien und entsprechende Mengen zur Herstellung von Blue-Native Polyacrylamidgelen.

	<u>Trenngel</u>		<u>Sammelgel</u>
	4 %	18 %	3,5 %
1 Acrylamid 40 % (32:1)	1,47 ml	6,62 ml	0,86 ml
2 6x Gelpuffer BN	2,5 ml	2,5 ml	1,67 ml
3 Glycerol (87 %)	-	3,3 ml	-
4 H ₂ O	10,96 ml	2,53 ml	7,42 ml
5 APS (10 %)	65 µl	50 µl	45 µl
6 TEMED	6,5 µl	5 µl	4,5 µl
Σ	15 ml	15 ml	10 ml

Die konzentrierten Eluate werden 1:10 mit Ladepuffer versetzt, in die vorgesehenen Taschen gegeben und mit 1x Kathodenpuffer mit 0,02 % Coomassie überschichtet. Die obere Kammer wird ebenfalls mit dem Kathodenpuffer befüllt, die untere Kammer mit 1x Anodenpuffer.

Die Auftrennung der Proteinkomplexe erfolgt nach folgendem Programm über Nacht im Kühlraum:

100 V (max. 15 mA) 30 Min.
500 V (max. 15 mA) über Nacht

Nach ca. 1/3 der Laufstrecke wird der 1x Kathodenpuffer mit 0,02 % (w/v) Coomassie durch 1x Kathodenpuffer mit 0,002 % (w/v) Coomassie ersetzt.

Vorbereitung für 2. Dimension:

Nach Ende der Auftrennung werden die einzelnen Spuren mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, für 30 Min. in Äquilibriumspuffer inkubiert und danach 1 Min. in H₂O gewaschen.

SDS-PAGE (2. Dimension):

Für die 2. Dimension wird ein Trenngel von 2 mm Dicke und eine Acrylamidkonzentration von 10% oder 12,5% hergestellt (siehe 3.2.12). Darüber wird ein 4%iges Sammelgel bis 3 cm unterhalb der Glaskante gegossen. Der vorbehandelte Gelstreifen wird auf das polymerisierte Gel aufgesetzt und mit Agarose überschichtet. Eine Tasche zum späteren Auftragen des Markers wird durch Einlegen eines Kammes ausgespart.

Die Kammern werden mit 1x SDS-Puffer gefüllt und die Proteinauftrennung erfolgt unter folgenden Bedingungen: 100 V 30 Min.

500 V bzw. 50 V ü.N. Ende: Herauslaufen der Blaumarkerfront

Diese Gele können danach zur Blue Silver- (3.2.20), Silbernitratfärbung (3.2.18) oder zur Detektion bestimmter Proteine mittels Western Blot-Analyse (3.2.22) verwendet werden.

Lösungen (bei 4°C lagern):*2x Extraktionspuffer:*

1,5 M ϵ -Aminocaprinsäure
100 mM Bis-Tris/HCl, pH 7,0
40 mM NaCl
2 mM EDTA, pH 8,0

6x Gelpuffer:

1,5 M ϵ -Aminocaprinsäure
150 mM Bis-Tris/HCl, pH 7,0

Ladepuffer:

0,1 % (w/v) Ponceau S
50 % (w/v) Glycerol
10 x Anodenpuffer:
500 mM Bis-Tris/HCl, pH 7,0

10 x Kathodenpuffer Coomassie 0,02 %:

500 mM Tricin
150 mM Bis-Tris/HCl, pH 7,0
0,2 % (w/v) Coomassie G 250

10 x Kathodenpuffer Coomassie 0,002 %:

500 mM Tricin
150 mM Bis-Tris/ HCl, pH 7,0
0,02 % (w/v) Coomassie G 250

Äquilibrierungspuffer:

1 % (w/v) SDS
1 % (v/v) Mercaptoethanol

3.2.18. Silbernitratfärbung

Zur Färbung der Acrylamidgele mit Silbernitrat wird das Protokoll nach Blum (Blum et al., 1987) verwendet. Die Nachweisgrenze diese Färbemethode liegt bei 5-30 ng bei einer 0,5 cm breiten Proteinbande (Rehm, 2006) und ist somit 10-100fach sensitiver als die normale Coomassie-Färbung.

Die Silberfärbung umfasst folgende Arbeitsschritte. Dabei werden pro kleinem Gel jeweils mindestens 100 ml Lösung und pro großen Gel jeweils mindestens 200 ml Lösung benötigt.

1. Inkubation des Gels für min. 1 Std. in Fixierlösung
2. zweimal Waschen mit 30%igem (v/v) Ethanol für 25 Min.
3. einmal Waschen mit H₂O für 25 Min.
4. Sensibilisierung des Gels in 0,02%igem (w/v) Natriumthiosulfat • 5 H₂O für 1 Min.
5. dreimal Waschen mit H₂O für 20 Sek.
6. Inkubation in kalter AgNO₃-Lösung (0,1 %, w/v) für 20 Min.
7. dreimal Waschen mit H₂O für 20 Sek.
8. einmal Waschen mit H₂O für 1 Min.
9. Inkubation in Entwicklerlösung bis zur ausreichenden Färbung der Proteine (ca. 5-30 Min.)
10. einmal Waschen mit H₂O für 20 Sek.
11. Stoppen des Färbevorgangs durch Inkubation in 0,05 M EDTA-Lösung

Lösungen:

Fixierlösung :

40 % (v/v) Ethanol

10 % (v/v) Essigsäure

Entwicklerlösung :

3 % (w/v) Na₂CO₃

0,05 % (v/v) Formaldehyd

3.2.19. Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung ist weniger sensitiv als die Silbernitratfärbung. Ihre Nachweisgrenze liegt bei 200 – 400 ng Protein pro 0,5 cm Proteinbande (Rehm, 2006). Bei dieser Färbemethode wird das Gel für ca. 20 Min. mit der Coomassie-Lösung (Coomassie R 250) fixiert, gefärbt und anschließend nicht an Proteine gebundener Farbstoff durch Inkubation des Gels mit Entfärbelösung entfernt.

Lösungen:

Coomassie-Lösung (über Faltenfilter filtrieren):

0,125 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250

45 % (v/v) Ethanol

10 % (v/v) Essigsäure

Entfärbelösung :

9 % (v/v) Ethanol

6 % (v/v) Essigsäure

3.2.20. Kolloidale Coomassie-Färbung

Kolloidales Coomassie hat eine wesentlich niedrigere Nachweisgrenze für Proteine als die normale Coomassie-Färbung (siehe 3.2.19). Die Nachweisgrenze der Färbung liegt bei 20 – 50 ng Protein pro 0,5 cm Proteinbande (Rehm, 2006) Damit ist sie ähnlich sensitiv wie die Silberfärbung.

Bei dieser Färbemethode werden gleiche Mengen der Lösung A und der Lösung B miteinander gemischt, indem Lösung B sehr langsam und unter starkem Rühren zur Lösung A hinzugetropft wird, ohne dass dabei Ammoniumsulfat ausfällt. Bei richtiger Vorgehensweise bilden sich metallisch glänzende rötlich-violette Partikel, so genannte Kolloide, auf der Lösungsoberfläche.

Nach Inkubation des Gels in der Fixierungslösung (siehe 3.2.18) für mindestens eine Stunde, wird das Gel mindestens über Nacht, idealerweise für 2 Tage mit der frisch hergestellten Färbelösung überschichtet. Abschließend kann der Farbstoff durch Inkubation in H₂O aus dem Gel gelöst werden. Allerdings ist die Färbung der Proteine ebenso reversibel, d.h. nach einer gewissen Inkubationszeit wird auch der Farbstoff aus den Proteinbanden gelöst.

Lösungen:

Lösung A:

34 % (v/v) Methanol

2 % (v/v) ortho-Phosphorsäure

0,066 % (w/v) Coomassie G250

Lösung B:

17 % (w/v) Ammoniumsulfat

3.2.21. „Blue Silver“-Färbung

Die alternative Färbemethode „Blue Silver“ (Candiano et al., 2004) ist ebenfalls eine kolloidale Coomassie-Färbung. Ihr Name setzt sich aus dem Farbstoff Coomassie (Blue) und der Nachweisgrenze der Silberfärbung (Silver) zusammen.

Für 100 ml Färbelösung werden unter ständigem Rühren 11,2 ml 10%ige Phosphorsäure mit 10 ml H₂O gemischt. Darin werden 10 g Ammoniumsulfat falls notwendig unter Zuführung von

Hitze gelöst. Anschließend werden 0,12 g Coomassie G-250 in diesem Gemisch gelöst. Die Lösung wird mit H₂O auf 80 ml aufgefüllt und anschließend mit 100 %igem Methanol auf ein Volumen von 100 ml aufgefüllt.

Nach dem das Gel in Fixierlösung (siehe 3.2.18) für mindestens eine Stunde inkubiert wurde, wird es dreimal 10 Min. mit H₂O gewaschen und anschließend mindestens eine Nacht in der „Blue Silver“-Lösung inkubiert. Nicht an Proteine gebundener Farbstoff wird anschließend mit entionisiertem Wasser gewegewaschen.

Die grün-bläuliche Lösung wird bei Raumtemperatur aufbewahrt und mehrfach verwendet.

3.2.22. Färbung mit RapidStain

Die RapidStain-Färbelösung (G-Biosciences, St. Louis, USA) ist eine vorgefertigte Coomassie-Lösung, in der das Gel nach dreimaligem Waschen mit Wasser (5 Min./Waschschritt) für 1 Std. inkubiert wird. Anschließend wird wiederum 2-3mal mit Wasser gewaschen. Das Gel kann in Wasser aufbewahrt werden. Die Färbung ist irreversibel.

3.2.23. Western-Blot

Beim Western Blot werden Proteine innerhalb eines elektrischen Feldes aus einem Polyacrylamidgel auf die Oberfläche einer Nitrozellulosemembran (Whatman Protran, Perkin Elmer, Boston (USA)) transferiert. Dabei werden die Proteine fest an die Oberfläche der Membran gebunden und können im Folgenden durch spezifische Antikörper detektiert werden.

Beim hier verwendeten „Tankblotting“-Verfahren wird der Western Blot gemäß der Anleitung des Herstellers BioRad aufgebaut, in die Blotting-Kammer eingebaut und diese mit 4 °C-kaltem Tankblotting-Puffer befüllt. Die Proteine werden durch Anlegen eines Stroms unter Kühlung vom Gel auf die Membran übertragen.

Kleine Gele 350 mA 1:00 Std.

Große Gele 400 mA 4:30 Std.

Zur Überprüfung des erfolgreichen Proteintransfers werden die Proteine für 5 Min. auf der Membran mit Ponceau-Lösung angefärbt und mit entionisiertem Wasser entfärbt.

Der Nachweis von Proteinen erfolgt mittels spezifischer Antikörper (Primärantikörper). Dazu eignen sich polyklonale und monoklonale Antikörper. Monoklonale Antikörper haben den Vorteil spezifisch eine Region in einem Protein zu erkennen. Unspezifische Bindungen sind dadurch größtenteils ausgeschlossen (Harlow und Lane, 1988). Zuvor werden freie Bindestellen der Membran durch Inkubation mit 5 % (w/v) Magermilch in TBS geblockt. Die

Inkubation der Membran mit Primärantikörpern erfolgt über Nacht bei 4 °C. Danach wird die Membran dreimal 10 Min. mit TBS gewaschen und anschließend mit einem Sekundärantikörper, der gegen die Wirtsspezies des Primärantikörpers gerichtet ist, inkubiert. Dieser Antikörper trägt eine gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (HRPO), deren Enzymaktivität bei Zugabe von Luminol und Oxidierungsreagenz Chemilumineszenz erzeugt. Nach der Sekundärantikörperinkubation wird die Membran erneut dreimal 10 Min. mit TBS gewaschen.

Zum Nachweis *in vitro*-translatierter Proteine (Herstellung siehe 3.2.9.1) im Western Blot wird die Membran mit 1 % BSA in TBST (TBS-Puffer + 0,05 % (v/v) Tween 20) blockiert. Die Detektion der biotinylierten Proteine mittels Chemilumineszenz erfolgt nach Inkubation der Membran mit Streptavidin-HRPO (1:10.000 in TBST) für 1 Std. bei Raumtemperatur und dem anschließenden Waschen mit TBST für fünfmal 5 Min..

Der Nachweis der Proteine erfolgt auf einem lichtempfindlichen Röntgenfilm in der Dunkelkammer. Dazu wird Chemiluminiszenzreagenz (Western Lightning Chemiluminescence Reagent, Perkin Elmer, Boston (USA)) aus gleichen Teilen „Oxidizing“- und Luminol-Reagenz (nach Protokoll des Herstellers) hergestellt und für 1 Min. auf die Membran gegeben. Überschüssige Lösung wird danach entfernt, Röntgenfilme (Fuji Film) mit unterschiedlicher Expositionszeiten aufgelegt und die Filme in Entwickler- und Fixierlösung (Agfa) entwickelt.

Lösungen:

Tankblottingpuffer :

20 % (v/v) Methanol

1x SDS-Elektrophoresepuffer

Ponceau-Lösung :

0,5 % (w/v) Ponceau in 1 % (v/v) Essigsäure

3.2.24. Ablösen von Antikörpern von der Western-Blot-Membran

Zur Wiederverwendung von bereits mit Antikörpern inkubierten Blotmembranen, können diese vom Primär- und Sekundärantikörper befreit werden. Dazu wird die Membran viermal 5 Min. in TBST gewaschen, anschließend 30 Min. bei 50 °C in „Stripping“-Puffer inkubiert und anschließend sechsmal 5 Min. in TBST gewaschen. Frei gewordene Bindestellen auf der Membran werden im Anschluss mit 5 % Magermilch in TBS geblockt. Die Membran kann nun erneut zur Detektion von Proteinen mit anderen Antikörpern verwendet werden.

Lösungen:*Stripping-Puffer:*

62,5 mM Tris HCl, pH 6,8

2 % (w/v) SDS

0,7 % (v/v) β -Mercaptoethanol

TBST-Puffer:

TBS-Puffer + 0,05 % (v/v) Tween 20

3.2.25. Proteinfällung mit Trichloressigsäure (TCA)

Zur Fällung der Proteine in einer Lösung wird diese so mit kalter TCA-Lösung gemischt, dass eine Lösung mit einer TCA-Endkonzentration von 20 % entsteht. Nach 20 Min. Inkubation auf Eis werden die gefällten Proteine bei 14.000 xg in einer gekühlten Tischzentrifuge pelletiert und das Pellet anschließend zweimal mit dem gleichen Lösungsvolumen an Aceton gewaschen. Die gefällten Proteine können anschließend mit Laemmli-Puffer gelöst und für eine SDS-PAGE denaturiert werden (siehe 3.2.12).

3.2.26. Vorbereitung der Proteinbanden bzw. Proteinspots für die MALDI-ToF-Massenspektrometrie

Zur Gewinnung der Proteinbanden bzw. Proteinspots aus den gefärbten Polyacrylamidgelen werden Skalpelle, Rasierklingen oder runde Stanzaufsätze für Einwegspritzen eingesetzt. Die Gelstückchen können bis zur weiteren Behandlung bei -80 °C in 0,2 μ l-Eppendorf-Reaktionsgefäßen gelagert werden. Zum Ausstoßen der Gelstückchen aus den Stanzringen wird zuvor Wasser in die Einwegspritze aufgezogen, dann mit dem Gelstückchen herausgedrückt und das Wasser anschließend aus dem Eppendorfgefäß entfernt. Zum Waschen der Gelstückchen werden diese zweimal alternierend mit 15 μ l Lösung A und Lösung B für 5 Min. inkubiert und die Lösung jeweils wieder abgenommen. Die anschließende Inkubation mit je 50 μ l Reduktionslösung für 30 Min. bei 56 °C führt zur Reduktion der Disulfidbrücken der Proteine. Nach der Reduktion wird eine Alkylierung durchgeführt, welche zur irreversiblen Reduktion der Disulfidbrücken führt. Dazu werden je 50 μ l Alkylierungspuffer zu den Gelstückchen gegeben und diese für 30 Min. bei Dunkelheit aufbewahrt. Nach Entfernen der Lösung werden die Proben noch zweimal alternierend mit 15 μ l Lösung A und Lösung B gewaschen. Nach letztmaligem Entfernen der Lösung werden die Gelstückchen in einer Evaporationszentrifuge getrocknet und danach bei -80 °C gelagert.

Lösungen (kurz vor Gebrauch frisch ansetzen):*Lösung A:*

50 mM Ammoniumhydrogencarbonat

Lösung B:

50 % (w/v) Ammoniumhydrogencarbonat (50 mM)

50 % (v/v) Acetonitril

Reduktionslösung:

50 mM Ammoniumhydrogencarbonat

10 mM DTT

Alkylierungspuffer (im Dunkeln aufbewahren):

50 mM Ammoniumhydrogencarbonat

5 mM Iodacetamid

3.2.27. Tryptischer Verdau

Die Protease Trypsin schneidet die Proteine hinter den Lysin- und Arginin-Aminosäureresten. Die hierbei entstehenden Peptide können im Massenspektrometer gemessen und über eine Software ihrem Ausgangsprotein zugeordnet werden.

Je nach Intensität der Proteinfärbung und Spotgröße im Gel werden unterschiedlich stark konzentrierte Trypsinlösungen (1x, 2x oder 4x) verwendet. Die Trypsinlösung wird frisch auf Eis angesetzt oder entsprechende eingefrorene Aliquots aufgetaut. Je nach Größe des Gelstückchens werden 3 – 5 µl Lösung zugegeben und gewartet bis sich die trockenen Stückchen mit Lösung vollgesaugt haben.

Die Proben werden über Nacht bei 37 °C, dem Temperaturoptimum des Enzyms, inkubiert, wobei die Proteine vollständig zu Peptiden verdaut werden. Am Deckel kondensierte Lösung wird im Anschluss herunter zentrifugiert.

Lösungen:*1x Trypsinlösung (bei -80°C lagerbar):*

25 µg/ml Trypsin (Porcine, Promega) in 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat

2x Trypsinlösung (bei -80°C lagerbar):

50 µg/ml Trypsin (Porcine, Promega) in 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat

4x Trypsinlösung (bei -80°C lagerbar):

100 µg/ml Trypsin (Porcine, Promega) in 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat

3.2.28. Extraktion der Peptide aus dem Polyacrylamidgel und Vorbereitung der MALDI-ToF-Massenspektrometrie

Die Gelstückchen werden nach dem Trypsinverdau für 45 Min. in 15 µl TFA (0,1 %, v/v) inkubiert, dabei werden die Peptide aus dem Polyacrylamidgel extrahiert. Die Peptidlösungen werden mit PerfectPure C-18 Pipettenspitzen der Firma Eppendorf entsalzt und konzentriert.

Zunächst wird das C-18-Material mit 10 µl Acetonitril reaktiviert (Lösung einsaugen und wieder ausstoßen) und anschließend zweimal mit 10 µl TFA (0,1 %) gewaschen. Danach wird die TFA-Peptid-Lösung 15 mal mit der Spitze aufgezogen und ausgestoßen. Das C-18-Material wird erneut mit 10 µl TFA (0,1 %) gewaschen und Matrixlösung bis maximal zur 2 µl-Einkerbung der Pipettenspitze aufgenommen. Die Matrixlösung enthält das Lösungsmittel Acetonitril, das die Peptid-C-18-Wechselwirkung löst. Die Matrixlösung eluiert die Peptide und diese werden auf eine zum Massenspektrometer gehörende Metallplatte (steel target, Bruker Daltonics) in die dafür vorgesehenen Probenfelder aufzutragen. Zusätzlich wird in regelmäßigen Abständen (in jedem Quadranten) eine Peptidstandardlösung aus 0,2 µl Matrixlösung und 0,2 µl Peptidstandard (Peptide calibration standard II, Bruker Daltonics) pipettiert. Nach dem Trocknen der Proben bei RT sind diese bereit für die Analyse im MALDI-ToF-Massenspektrometer.

Bei der Herstellung der gesättigten Matrixlösung wird das Matrixmaterial (α-Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure) zunächst mit Acetonitril auf dem Vortexmischer geschüttelt, TFA (0,1 %) zugegeben und erneut geschüttelt. Nach Zentrifugation (max. rpm, 3 – 5 Min.) in der Tischzentrifuge wird der gesättigte Überstand als Matrixlösung verwendet.

Lösungen:

Matrixlösung:

20 µg α-Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure

150 µl Acetonitril

150 µl TFA (0,1 %, v/v)

3.2.29. Durchführung der MALDI-ToF-Massenspektrometrie

Die Methode der MALDI-Massenspektrometrie wurde von Michael Karas und Franz Hillenkamp 1988 erfunden (Karas und Hillenkamp, 1988). Sie erlaubt es Peptide und Proteine in einem Massenspektrometer zu analysieren und zu identifizieren.

Zur Messung der einzelnen Proben im Massenspektrometer wird das Softwareprogramm „flexControl“ (Bruker Daltonics) verwendet. Es steuert verschiedene Einstellungen wie Laserposition, Laserintensität, Anzahl an Laserpulsen, Kalibrierung, etc. Nach Einführen des

Stahltargets in die Vakuumkammer des Massenspektrometers kann die gewünschte Probe vor dem Laser zentriert und die genaue Laserposition mittels Videobild bestimmt werden. Im Fall der „Mass-Fingerprint“-Messung werden Spektren im m/z -Bereich von 500-3200 aufgenommen und dabei die Proben mit mehreren Serien von 50 Laserpulsen und einer Laserintensität von 18% beschossen. Die Einzelspektren werden zu einem auswertbaren Gesamtspektrum summiert. Bei der „LIFT“-Methode werden einzelne Peptide gezielt im Quadrupol isoliert und fragmentiert. Hierbei entstehen kleinere Bruchstücke des Peptides und einzelne Aminosäuren, die dann mit Hilfe der Software „flexAnalysis“ (Bruker Daltonics) analysiert werden. Dadurch können einzelne Peptide auf Grund ihrer ermittelten Aminosäuresequenz zusätzlich zu den Peptidmassenfingerprint (PMF)-Spektren identifiziert werden.

3.2.30. Analyse der Daten aus der MALDI-ToF-Massenspektrometrie

Das Softwareprogramm „flexAnalysis“ (Bruker Daltonics) ermöglicht die Analyse der Summenspektren nach der MALDI-ToF-Massenspektrometriemessung, indem es aus den Daten der Masse/Ladungs (m/z)-Verhältnisse und der Intensitäten Massenlisten erzeugt. Diese gewährleisten die Zuordnung der Peptide zu einem oder mehreren Proteinen durch den MASCOT-Suchalgorithmus (Matrix Science, London, UK) unter Verwendung von Proteindatenbanken. Als Parameter für den Suchalgorithmus werden hierzu die Protease Trypsin mit maximal einer übersehenen Schnittstelle, einer Fehlertoleranz der Peptidmasse von $\pm 0,15$ Da, sowie Methionin-Oxidation und Cystein-Carbamidomethylierung als mögliche Modifikationen gewählt. Die über den Datenbankabgleich ermittelten ersten 20 Proteine werden in einer Rangliste in Reihenfolge ihrer Wahrscheinlichkeiten (Scores) aufgelistet.

4. Ergebnisse

4.1. Nachweis der TRPV6 – Cyclophilin B Interaktion

Bereits während der von mir in der Abteilung Proteinfunktion/Proteomics durchgeführten Diplomarbeit wurde das Cyclophilin B-Protein als potentieller Interaktionspartner von TRPV6 durch Affinitätsreinigungen und massenspektrometrische Analysen von solubilisierten Proteinen aus der mikrosomalen Fraktion des Plazentagewebes identifiziert. Diese Interaktion soll nun mit weiteren biochemischen Methoden wie Coimmunpräzipitation, Pulldown-Assay und Dichtegradientenzentrifugation näher charakterisiert werden.

4.1.1. Detektion von TRPV6 und Cyclophilin B in Eluaten der Affinitätschromatographie der Calmodulinsäule

Die während meiner Diplomarbeit etablierte Affinitätschromatographiestrategie beinhaltete eine Kombination aus einer Calmodulin (CaM)- und einer TRPV6-Antikörpersäule (Stumpf, 2006). Hierbei gelang es sowohl das TRPV6-Protein als auch Cyclophilin B und Annexin A2 zu isolieren. Zu Beginn meiner Promotion habe ich die in meiner Diplomarbeit etablierte Affinitätsreinigung noch zweimal zur Bestätigung der Proteinwechselwirkung wiederholt und habe die Anwesenheit des TRPV6- und des Cyclophilin B-Proteins in den Eluatfraktionen der Calmodulinsäule untersucht. Hierzu werden mit TRPV6- und CyPB-Antikörpern durchgeführt. Hierbei zeigt sich, dass das TRPV6-Protein in den Fraktionen 2 bis 7 nachweisbar ist (Abb. 13), wobei es in Fraktion 2 bis 4 in größeren Konzentrationen eluiert als in Fraktion 5 bis 7. Cyclophilin B wird ebenfalls in den Fraktionen 1 bis 7 von der CaM-Säule eluiert, allerdings nimmt die Konzentration des eluierten CyPB im Gegensatz zu TRPV6 von Fraktion 1 bis 7 kontinuierlich ab. Als Positivkontrollen dienen für das TRPV6-Protein, COS-Zellen, die mit TRPV6 transfiziert wurden und für das CyPB-Protein Mikrosomen aus humanem Plazentagewebe (Abb. 13). In Zelllysaten von untransfizierten COS-Zellen wird TRPV6 nicht detektiert. Folglich kommen die TRPV6- und CyPB-Proteine teilweise in den gleichen Fraktionen (Fraktion 2-4) vor, in denen dann auch eine Interaktion beider Proteine möglich ist. Jedoch erkennt man weiterhin, dass das Cyclophilin B-Protein größtenteils nicht zusammen mit dem TRPV6-Protein eluiert wird. Demzufolge scheint das Protein entweder an Calmodulin bzw. an andere Calmodulin-interagierende Proteine zu binden.

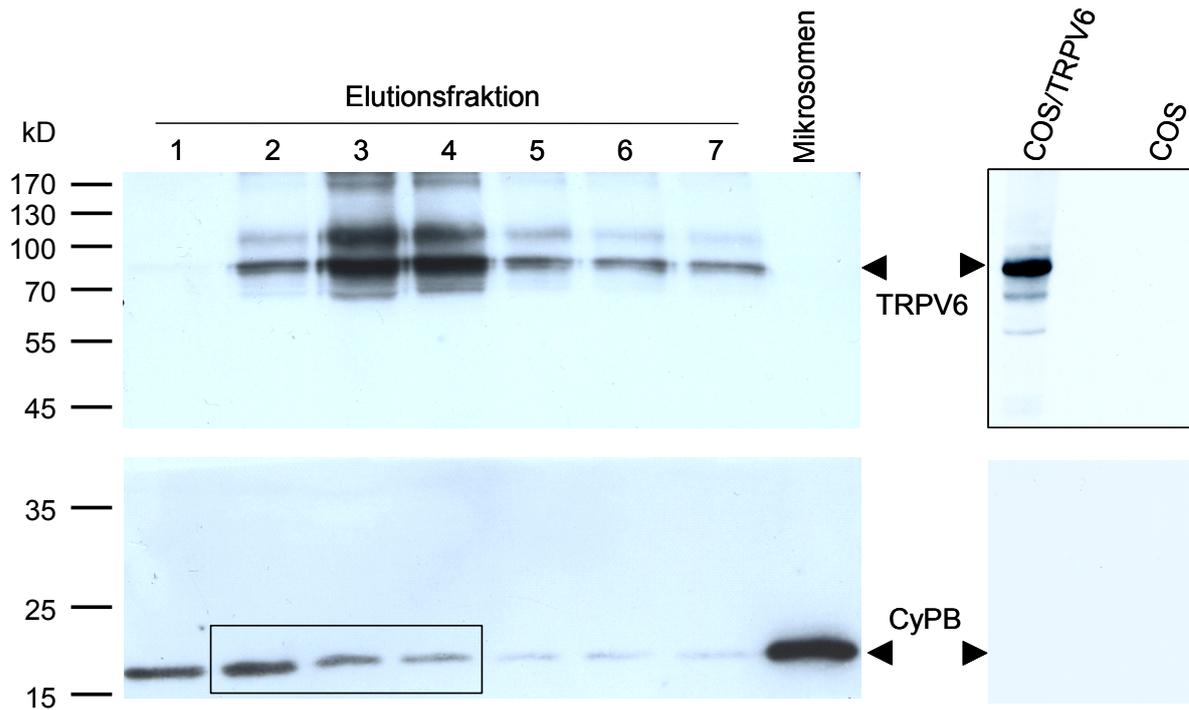


Abb. 13: Western Blot des Elutionsprofils der CaM-Säule (modifiziert nach Stumpf et al., 2008). TRPV6 wird am stärksten in Fraktion 3 und 4 detektiert (AK: 26B3), schwächer in den Fraktionen 2 und 5-7. Cyclophilin B wird am stärksten in Fraktion 1 und 2 detektiert (AK: anti-Cyclophilin B), danach nehmen die Signale bis Fraktion 7 an Stärke ab. Positivkontrollen: für Cyclophilin B: Mikrosomen (75 µg), für TRPV6: denaturierte TRPV6-transfizierte COS-Zellen (20 µg), Negativkontrolle für TRPV6: denaturierte native COS-Zellen (50 µg).

Bereits in meiner Diplomarbeit konnte das Protein Cyclophilin B nach einer zweistufigen Affinitätschromatographie aus solubilisiertem Plazentagewebehomogenat über eine Calmodulin- und eine Antikörperaffinitätssäule isoliert und mit Hilfe der Peptidmassenfingerprint-Analyse (PMF) in einer SDS-Gelbande detektiert werden.

Im SDS-Gel wird CyPB sowohl unter reduzierenden Bedingungen (Abb. 14B, grauer Pfeil) als auch unter nicht reduzierenden Bedingungen (Abb. 14C, grauer Pfeil) zusammen mit TRPV6 (Abb. 14B+C, schwarzer Pfeil) in den Proben der spezifischen TRPV6-Antikörpersäule identifiziert. Von der Aminosäuresequenz des TRPV6-Proteins können 28 % in der MALDI-ToF-MS analysiert werden (Abb. 14D, rot+grün). Durch eine Fragmentierung im Massenspektrometer (LIFT) kann die Sequenz eines im tryptischen Verdau entstandenen Peptidfragments detailliert analysiert werden. Im Falle der TRPV6 enthaltenden Gelbande kann das Peptid mit der Sequenz GLEDGESWEYQI identifiziert (Abb. 14E) und eindeutig dem Ende des C-Terminus von TRPV6 zugeordnet werden (Abb. 14D, Peptid grün eingefärbt). Zusätzlich konnte Annexin A2 ebenfalls unter reduzierenden (Abb. 14B) und nicht reduzierenden (Abb. 14C) Bedingungen in einer Gelbande massenspektrometrisch identifiziert werden.

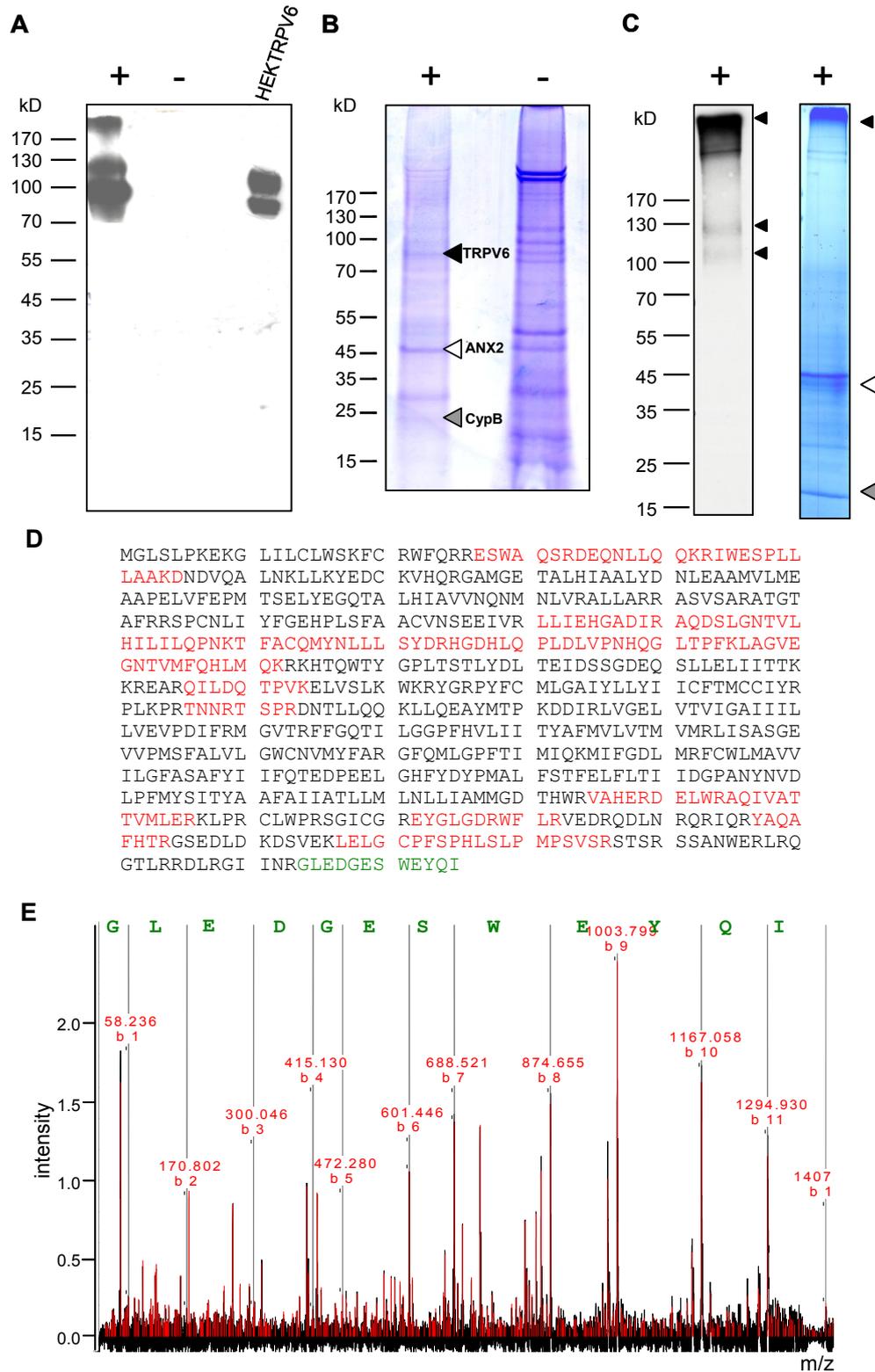


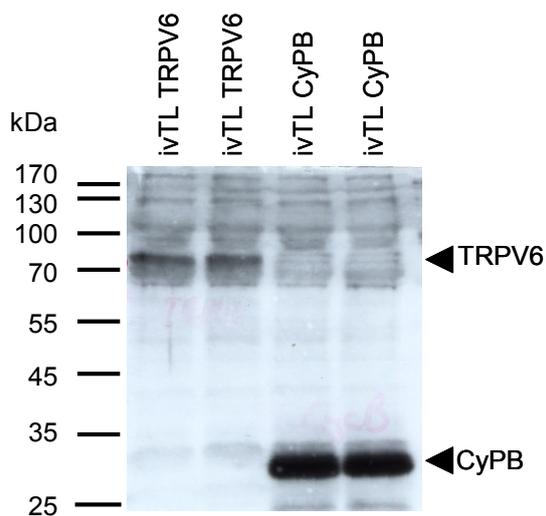
Abb. 14: SDS-PAGE und Western Blot-Analyse der Affinitätschromatographie und anschließende MALDI-ToF-Analyse von TRPV6 und assoziierten Proteinen (modifiziert nach Stumpf et al., 2008). A: SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen. TRPV6 liegt im Western Blot mit AK 429 als glykosyliertes und deglykosyliertes Monomer (100-120 kDa) und als Multimer (>170 kDa) vor (Spur +). TRPV6 wird nur über die TRPV6-spezifische Antikörpersäule (+) nicht über die unspezifische Maus-IgG-Säule (-) angereichert. B: Im kolloidal-Coomassie-gefärbten SDS-Gel werden TRPV6 (schwarzer Pfeil), Annexin A2 (weißer Pfeil) und Cyclophilin B (grauer Pfeil) mittels MALDI-ToF-MS in den jeweiligen ausgeschnittenen Gelbänden mit signifikanten Scores identifiziert. Die Probe der Maus-IgG-Säule (-) enthält mehr Proteine als die Probe der TRPV6-spezifische Antikörpersäule (+). C:

SDS-PAGE unter nichtreduzierenden Bedingungen; linker Streifen: TRPV6 liegt im Western Blot mit AK 429 fast ausschließlich als Multimer (>170 kDa) vor. Nur geringe Mengen der glykosylierten und deglykosylierten Monomere werden detektiert (schwarze Pfeile: TRPV6-Signale); rechter Streifen: Im kolloidal-Coomassie-gefärbten SDS-Gel werden TRPV6 (schwarzer Pfeil), Annexin A2 (weißer Pfeil) und Cyclophilin B (grauer Pfeil) mittels MALDI-ToF-MS in den jeweiligen ausgeschnittenen Gelbanden signifikant identifiziert. D: TRPV6-Aminosäuresequenzabdeckung auf Grund der massenspektrometrisch identifizierten Peptide (rot). Ein mittels MS-Fragmentierung ermitteltes Peptid kann eindeutig dem C-Terminus von TRPV6 zugeordnet werden (grün). E: Spektrum der MS-Fragmentierung des TRPV6-Peptids, welches zur Ermittlung der Aminosäuresequenz durch die Massenunterschiede der b-Ionenserie führt.

Dieses Protein ist bereits als Interaktionspartner des TRPV6-Kanals bekannt (van de Graaf et al., 2003). Im Western Blot des Eluats der Affinitätschromatographie wird TRPV6 nur in der Probe mit spezifischem Antikörper und in der Kontrolle mit TRPV6-transfizierten HEK293-Zellen gefunden. TRPV6 bindet nicht an die Kontrollsäule mit immobilisierten Maus-IgGs (Abb. 14A). In der Probe der Kontrollsäule werden im kolloidal-Coomassie-gefärbten SDS-Gel (Abb. 14B) allerdings mehr Proteine angefärbt, als die Probe der Antikörpersäule. Folglich wechselwirken viele Proteine unspezifisch mit dem Säulenmaterial und dem Reaktionsgefäß. Unter reduzierenden Bedingungen wird TRPV6 mittels spezifischer Antikörper im Western Blot (Abb. 14A) und auch massenspektrometrisch im SDS-Gel (Abb. 14B) im Bereich von ca. 80 kDa detektiert. Im Western Blot zeigt sich neben der charakteristischen Doppelbande von glykosyliertem und deglykosyliertem TRPV6 auch eine Bande bei einem Molekulargewicht von über 170 kDa. Dabei handelt es sich vermutlich um Multimere des Proteins. Unter nichtreduzierenden Bedingungen ist TRPV6 sowohl im Western Blot (Abb. 14C, oberer schwarzer Pfeil linker Streifen) als auch in massenspektrometrischen Analysen (Abb. 14C, schwarzer Pfeil rechter Streifen) bei einem Molekulargewicht von mehr als 170 kDa zu detektieren. Hierbei handelt es sich offensichtlich um nicht denaturierte Monomere. Nur sehr schwache Signale sind im Western Blot auf Höhe der glykosylierten (MW ~85-100 kDa) und deglykosylierten (MW ~75-80 kDa) Monomere sichtbar. TRPV6 kann in den Gelbanden dieses Molekulargewichts massenspektrometrisch nicht detektiert werden. Die beiden Interaktionspartner Cyclophilin B und Annexin A2 werden dagegen auf gleicher Höhe wie in der reduzierten Probe detektiert (Abb. 14C, Cyclophilin B = grauer Pfeil, Annexin A2 = weißer Pfeil).

4.1.2. Coimmunpräzitationen mit ivTL-Produkten und TRPV6-spezifischen Antikörpern

Zum Nachweis der vermuteten Interaktion zwischen humanem TRPV6 und humanem Cyclophilin B werden beide Proteine in *in vitro*-translations-Ansätzen hergestellt und in verschiedenen Ansätzen zur Coimmunpräzitation mit TRPV6-spezifischen Antikörpern verwendet. Zunächst wird die Translation des TRPV6 bzw. Cyclophilin Proteins untersucht. Hierbei werden die *in vitro*-translatierten Proteine wegen der biotinylierten Aminosäure Lysin von biotinaffinem Streptavidin-HRPO (Sigma Aldrich, Taufkirchen) nach dem Transfer auf eine Membran detektiert. Bei den Proben der TRPV6-ivTL korrelieren die Signale bei einem MW von ca. 80 kDa mit dem erwarteten Molekulargewicht von TRPV6 und deuten auf die Bildung des Proteins hin (Abb. 15, schwarzer Pfeil oben).



Ebenso korrelieren die Signale bei den Proben der CyPB-ivTL-Ansatzes bei einem MW von ca. 25-28 kDa mit der Bildung eines Proteins, das dem Molekulargewicht des CyPB-Proteins mit einer angefügten myc-Sequenz entspricht (Abb. 15, schwarzer Pfeil unten). Die myc-Erkennungssequenz erlaubt auch die Detektion des Proteins über einen myc-spezifischen Antikörper. Neben den beiden Produkten werden vom Streptavidin-HRPO-Enzym auch andere biotinylierte Proteine im Reaktionsansatz detektiert (~60-200 kDa).

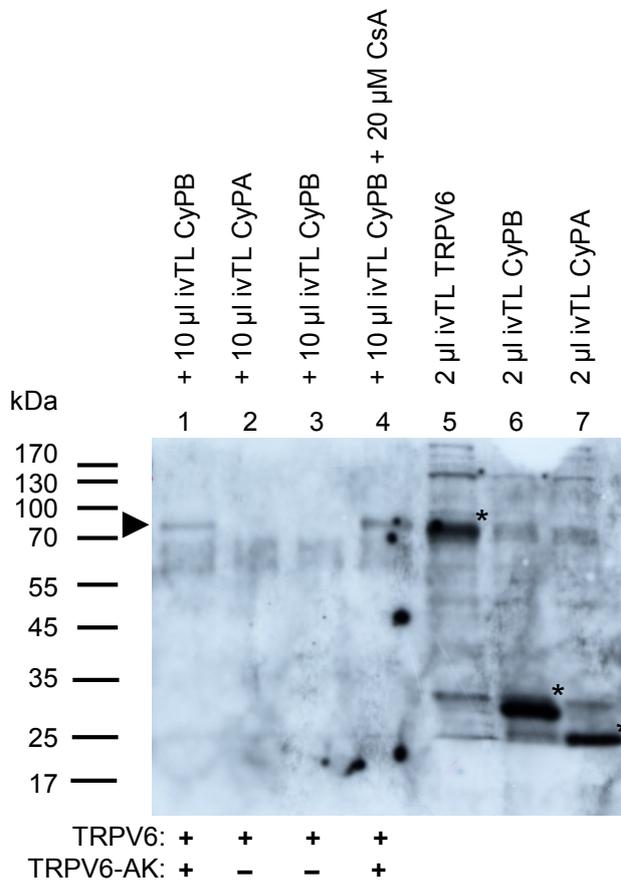
Abb. 15: Streptavidin-HRPO Blot zur Kontrolle der durch *in vitro* Translation hergestellten Proteine TRPV6 und Cyclophilin B. In beiden Ansätzen von TRPV6 (2 µl) zeigen sich bei ca. 80 kDa wesentlich stärkere Signale im Vergleich zu den Proben mit der CyPB-ivTL. Die Cyclophilin B-Proben (2 µl) zeigen auf der Höhe von ca. 25-28 kDa eindeutig stärkere Signale im Vergleich zur TRPV6-ivTL. Cyclophilin B wird aufgrund einer myc-Erkennungssequenz bei höherem MW detektiert. Die Detektion erfolgt mit Streptavidin-HRPO.

Folglich werden beide Proteine in den jeweiligen Ansätzen *in vitro*-translatiert und die Proben können für eine anschließende Coimmunpräzitation verwendet werden.

Neben TRPV6 und Cyclophilin B wird das zu CyPB-verwandte Protein Cyclophilin A ebenfalls *in vitro*-translatiert und für die Coimmunpräzitation eingesetzt. Das Cyclophilin A-Protein besitzt eine Größe von ca. 25 kDa (Abb. 16, rechts). Für den Versuchsansatz wird der ivTL-Ansatz von TRPV6 mit dem entsprechenden Ansatz von CyPB oder CyPA (siehe Abb. 16) gemischt und die Proteine mittels an Protein G-Agarose immobilisiertem TRPV6-Antikörper (26B3) coimmunpräzitiert. Die Proteine werden nach denaturierender Elution mit

2x Laemmli-Puffer und Auftrennung im SDS-Gel mit Streptavidin-HRPO im Western Blot nachgewiesen.

Der Röntgenfilm des Blots zeigt in den beiden Ansätzen mit TRPV6-Antikörper Signale auf Höhe der TRPV6-Positivkontrolle (Abb. 16, schwarzer Pfeil, Spur 1 und Spur 4). Allerdings



kann weder Cyclophilin B (CyPB) noch Cyclophilin A (CyPA) in einem der CoIP-Ansätze, im Gegensatz zu den Positivkontrollen (Abb. 16, *, Spur 6 und Spur 7), detektiert werden. Die immunpräzipitierte Menge an TRPV6 ist relativ gering, da das Signal der Kontrolle von TRPV6 (Spur 5) wesentlich stärker als das Signal in der Coimmunpräzipitation und zusätzlich der Kontrolleinsatz (2 µl) nur ein 1/5 des Versuchseinsatzes (10 µl) beträgt. Die beiden Ansätze ohne Antikörper (Spur 2 und Spur 3) sind frei von jeglichem Signal der *in vitro*-translatierten Proteine, woraus folgt, dass es zu keiner unspezifischen Bindungen zwischen diesen Proteinen und der Säulenmatrix kommt.

Abb. 16: Streptavidin-HRPO der Coimmunpräzipitation von *in vitro*-translatiertem TRPV6 und Cyclophilin B bzw. Cyclophilin A. TRPV6 kann in beiden Ansätzen mit Antikörper (AK +, Spur 1 und Spur 4) mittels Streptavidin-HRPO detektiert werden (schwarzer Pfeil). Cyclophilin B wird in diesen Proben nicht detektiert. Keines der ivTL-Produkte bleibt unspezifisch am Säulenmaterial ohne Antikörper hängen (AK -, Spur 2 und Spur 3). V6 = 12 µl ivTL TRPV6, AK = 429, * = Signal des jeweiligen ivTL-Produktes.

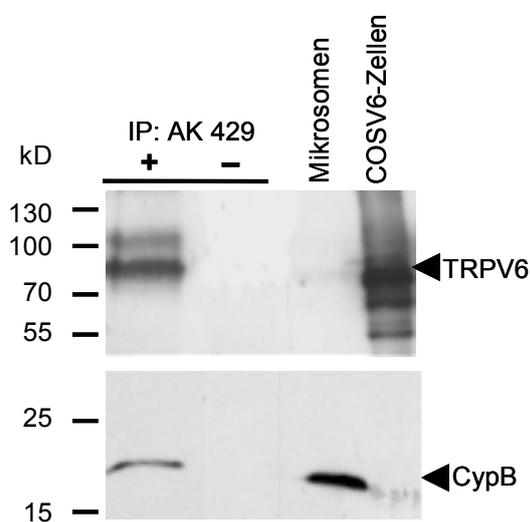
Unter diesen Versuchsbedingungen ist zwar eine Immunpräzipitation des TRPV6-Proteins möglich (Spur 1 und 4), aber keine Interaktion zwischen dem TRPV6-Protein und Cyclophilin B nachweisbar (Spur 1 und 4). Eventuell sind Co-Faktoren, die nicht im ivTL-Ansatz vorhanden sind, allerdings in der Plazenta bei der *in vivo*-Interaktion vorkommen, notwendig für eine nachweisbare Assoziation beider Proteine. Aus diesem Grund wird im Folgenden zur Überprüfung der Interaktion eine Coimmunpräzipitation mit solubilisierten Proteinen aus humanen Plazentamikrosomen durchgeführt.

4.1.3. Coimmunpräzitationen von TRPV6 aus Mikrosomen von humaner Plazenta mit TRPV6-spezifischen Antikörpern

Die Coimmunpräzitation hat zum Ziel sowohl den Ionenkanal als auch daran bindende Proteine, wie Cyclophilin B mittels eines immobilisierten TRPV6-Antikörpers zu isolieren. Anschließend wird die Anwesenheit des immun- bzw. coimmunpräzitierten Proteins im Western Blot untersucht.

Zur Herstellung eines Extraktes aus der mikrosomalen Plazentafraktion werden die Mikrosomen mit 0,5 % des ionischen Detergenz Natriumdeoxycholat (NaDox) und 20 mM Hapes-Puffer solubilisiert und der Extrakt mit an Protein A-Agarose gebundenem TRPV6-Antikörper 429 (2 µg) inkubiert. Als Negativkontrolle wird ungebundenes Protein A-Agarose-Material mit dem Plazentaextrakt inkubiert. Für den Western Blot werden die gebundenen Proteine nach dem Waschen mit 2x Laemmli-Puffer bei 61 °C von der Agarosematrix eluiert und denaturiert, in einer SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und TRPV6 und Cyclophilin B mittels Antikörper detektiert.

Der Western Blot (Abb. 17) mit dem TRPV6-Antikörper 26B3 zeigt Signale für TRPV6 im Immunpräzitationsansatz (+) und in der Probe der TRPV6-transfizierten COS-Zellen. Cyclophilin B wird in der Immunpräzitationsprobe (+) detektiert und ebenso in der Probe der



Plazentamikrosomen. Beide Proteine werden dagegen nicht im Ansatz ohne Antikörper detektiert. CyPB ist in den TRPV6-transfizierten COS-Zellen nicht nachweisbar, d.h. das Protein ist scheinbar nicht endogen in COS-Zellen exprimiert.

Daraus folgt zunächst dass die Immunpräzitation von TRPV6 gelungen ist. Die Detektion von Cyclophilin B in der gleichen Probe bedeutet, dass beide Proteine unter diesen Bedingungen miteinander interagieren und coimmunpräzitiert werden können.

Abb. 17: Western Blot der Coimmunpräzitation mit polyklonalem TRPV6-Antikörper (429). Antikörperdetektion von TRPV6 und Cyclophilin B. TRPV6 (AK: 26B3) und Cyclophilin B (AK: anti-Cyclophilin B) werden im Ansatz mit Antikörper (+) aber nicht im Ansatz ohne Antikörper (-) detektiert. Positivkontrollen: 75 µg Mikrosomen, 2 µl denaturiertes COSV6-Zellenlysat.

Die Interaktion soll im Anschluss auch unter anderen Pufferbedingungen bestätigt werden. Dazu wird ein Puffer gewählt der laut Publikation (Bildl et al., 2004; Berkefeld et al., 2006) sehr gut zur Isolierung von Membranproteinkomplexen aus Membranen geeignet sein soll.

Der Originalpuffer der Vorgehensweise enthält 1 % Dodecyl- β -D-maltosid, 10 mM Hepes (pH 7,5), 190 mM NaCl, 10 mM KCl ist mit 1 mM EDTA versetzt. Die Immunpräzipitation wird analog zur oben beschriebenen CoIP mit NaDox durchgeführt. Als Antikörper werden die beiden polyklonalen TRPV6-Antikörper 429 und 981 (3.1.3) eingesetzt. Im Western Blot (Abb. 18) zeigen sich anschließend Signale für TRPV6 in den Ansätzen mit Antikörpern und in der Probe der TRPV6-transfizierten COS-Zellen. In den Ansätzen ohne Antikörper und in den Mikrosomen wird kein TRPV6-Protein detektiert. Cyclophilin B kann ausschließlich in der Positivkontrolle der Mikrosomen detektiert werden, nicht aber in einem der Ansätze mit TRPV6-Signal.

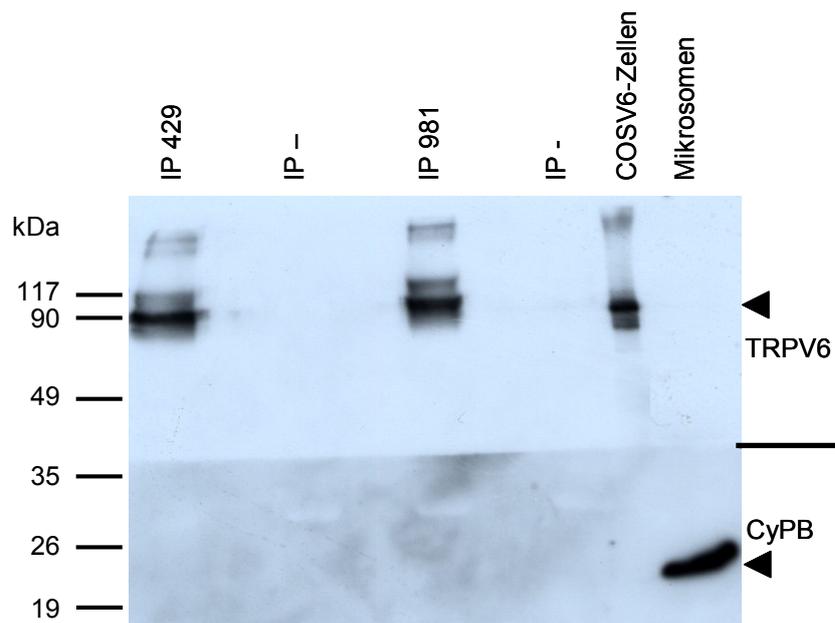


Abb. 18: Western Blot der Coimmunpräzipitation von TRPV6 und Cyclophilin B nach Solubilisierung mit EDTA-haltigem Puffer laut Bildl et al., 2004. TRPV6 wird in den Ansätzen mit TRPV6 Antikörper 429 und 981 vom monoklonalen Antikörper 26B3 ebenso wie in den COSV6-Zellen (20 μ g) detektiert. Cyclophilin B wird ausschließlich in den Mikrosomen (75 μ g) detektiert (anti-Cyclophilin B).

Unter diesen Solubilisierungsbedingungen ist nur eine Immunpräzipitation von TRPV6 mit Hilfe des TRPV6-Antikörpers 981 möglich. Die Interaktion zwischen dem TRPV6- und dem Cyclophilin B-Protein bleibt nicht bestehen bzw. ist nicht nachweisbar. Möglicherweise ist die Assoziation der Proteine kalziumabhängig. Der Pufferbestandteil EDTA ist ein Kalziumchelator, der zweiwertige Ionen, wie Kalzium und Magnesium, bindet und diese für eine Interaktion nicht mehr zur Verfügung stehen. Aus diesem Grund wird für einen weiteren Coimmunpräzipitationsversuch der Chelator EDTA durch 1 mM CaCl_2 ersetzt. Dadurch soll eine eventuell Ca^{2+} -abhängige TRPV6-CyPB-Interaktion erhalten bleiben.

Der Versuchsaufbau ist analog zur oben genannten Coimmunpräzipitation. Der Western Blot (Abb. 19) zeigt das gleiche Resultat wie beim vorherigen Versuch, bei dem EDTA im Solubilisierungspuffer enthalten ist. So wird wiederum TRPV6 in den IP-Ansätzen mit TRPV6-Antikörper und in den TRPV6-transfizierten COS-Zellen detektiert. Dagegen wird Cyclophilin B

nur in der Probe der Mikrosomen aus der Plazenta detektiert. In den IP-Ansätzen ohne spezifische TRPV6-Antikörper werden im Western Blot weder TRPV6 noch CyPB erkannt.

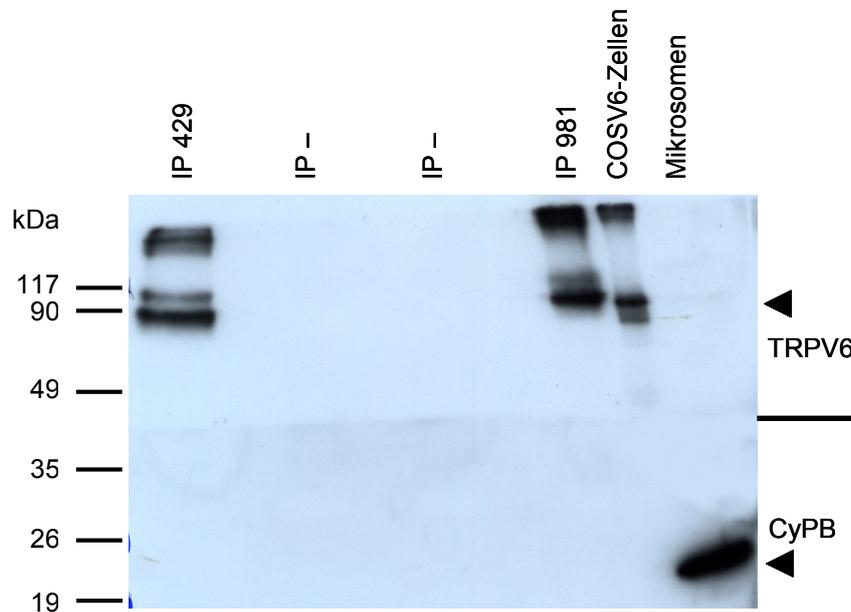


Abb. 19: Western Blot der Coimmunpräzipitation von TRPV6 und Cyclophilin B nach Solubilisierung mit Ca^{2+} -haltigem Puffer. TRPV6 wird in den Ansätzen mit TRPV6 Antikörper 429 und 981 vom monoklonalen Antikörper 26B3 ebenso wie in den COSV6-Zellen (20 μg) detektiert. Cyclophilin B wird ausschließlich in den Mikrosomen (75 μg) detektiert (anti-Cyclophilin B).

Da der Nachweis der Interaktion mittels Coimmunpräzipitation offensichtlich stark von der Zusammensetzung des Solubilisierungspuffers abhängt, soll die Assoziation von TRPV6 und Cyclophilin B mittels einer anderen Methode untersucht werden. Dazu wird die Dichtegradientenzentrifugation mit Saccharoselösungen verwendet.

4.1.4. Saccharosedichtegradientenzentrifugation

Mittels Saccharosedichtegradientenzentrifugation und anschließender Fraktionierung können Proteine gleicher Dichte und interagierende Proteine unterschiedlicher Dichte in einer entsprechenden Saccharosefraktion isoliert werden. Dieses Verfahren soll dem Nachweis der TRPV6-Cyclophilin B-Interaktion dienen. Die Proteine werden analog zur Coimmunpräzipitation mit dem Detergenz Natriumdeoxycholat aus Mikrosomen humaner Plazenta solubilisiert (4.1.3). Der Extrakt wird auf den hergestellten Saccharosegradienten (5% - 45%) gegeben und dieser, wie unter 3.2.15 beschrieben, ultrazentrifugiert. Anschließend werden 500 μl -Fraktionen gesammelt, die darin enthaltenen Proteine mittels TCA gefällt (3.2.25) und in einer SDS-PAGE aufgetrennt.

Die im SDS-Gel aufgetrennten Fraktionen werden im Western Blot mittels Antikörper auf die Anwesenheit der TRPV6- und Cyclophilin B-Proteine untersucht. Dabei wird TRPV6 in den Fraktionen 1-16 detektiert (Abb. 20 oben). Western Blot-Signale, die vermutlich TRPV6-

Monomeren entsprechen, sind bei ca. 100 kDa in den Fraktionen 1-13 erkennbar, ebenso wie Signale bei ca. 150 kDa bzw. >170 kDa, die vermutlich TRPV6-Di- und Multimeren entsprechen. Die Konzentration an TRPV6-Multimeren nimmt ab den Fraktionen 8 und 9 ab, die Konzentration an Dimeren ist erst ab Fraktion 13 deutlich reduziert. Im Vergleich zum ebenfalls im Saccharosegradienten aufgetrennten Proteinmix aus Ferritin (440 kDa), IgG (160 kDa) und BSA (65 kDa), dessen Fraktionen photometrisch auf Proteingehalt überprüft und dessen Werte in einem Diagramm dargestellt werden (Abb. 20 unten), befindet sich der Großteil der TRPV6-Signale in den Fraktionen mit einem Molekulargewicht von 440 - 160 kDa. Dieser MW-Bereich entspricht nicht der Dichte der TRPV6-Monomere, sondern der Di- und Multimere, was dafür spricht, dass die TRPV6-Monomere oligomerisieren.

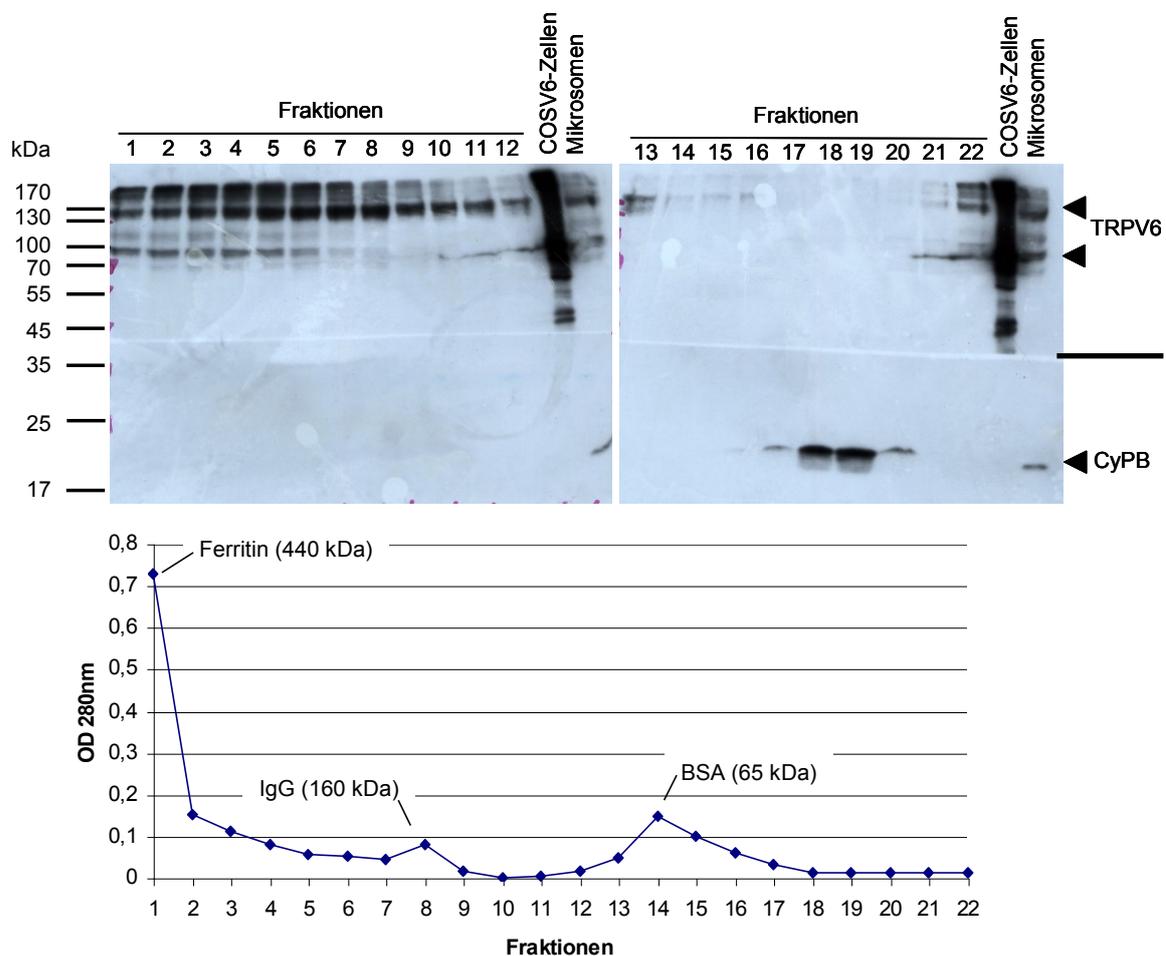


Abb. 20: Western Blot der Saccharosedichtgradientenzentrifugation von humanem Plazenta-mikrosomenextrakt mit Nachweis von TRPV6 und Cyclophilin B. oben: Western Blot auf TRPV6 (AK: 26B3) und Cyclophilin B (AK: anti-Cyclophilin B). TRPV6 wird in den Fraktionen 1-16 detektiert und liegt sowohl als Monomer (unterer Pfeil), als auch als Di- und Multimer (oberer Pfeil) vor. Cyclophilin B wird in den Fraktionen 17-20 detektiert. Unten: Diagramm des Kontrollproteinmixes aus der Saccharosedichtgradientenzentrifugation. Die Proteine in den einzelnen Fraktionen werden photometrisch detektiert und die Spitzen im Diagramm den drei Proteinen Ferritin, IgG und BSA zugeordnet.

Das Cyclophilin B-Protein wird in den Fraktionen 17-20 detektiert (Abb. 20 oben). Dies entspricht bei Vergleich mit dem Diagramm des als Referenz aufgetrennten Proteinmixes dem Molekulargewicht des ungebundenen CyPB-Proteins. Die CyPB-Signale liegen 3-6 Fraktionen von der Fraktion des 65 kDa großen BSA-Proteins entfernt (Abb. 20 unten), was bedeutet, dass CyPB in Fraktionen mit einer Dichte zu finden ist, bei der Proteine mit einem MW <65 kDa angereichert sind. Die Fraktionen mit CyPB überschneiden sich somit nicht mit den TRPV6-enthaltenden Fraktionen. Folglich sind die Proteine nicht in Fraktionen mit gleicher Dichte angereichert.

Die Saccharosegradientenzentrifugationen werden mit verschiedenen Kombinationen von Gradienten durchgeführt, welche aber alle zum gleichen negativen Ergebnis führen. Beide Proteine kommen nicht in einer der Fraktionen zusammen vor. Eine Interaktion beider Proteine kann somit mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation nicht bestätigt werden.

Um die Interaktion zwischen TRPV6 und Cyclophilin B weiter charakterisieren zu können, sind zusätzliche Informationen über die Bindung beider Proteine sehr hilfreich. Dabei ist die Interaktionsstelle oder die konkrete Bindungssequenz der Proteine von großem Interesse. Um die Bindungsstelle von CyPB im TRPV6-Protein auf gewisse Regionen bzw. Bereiche einengen zu können, wird ein so genannter Peptidblot, der TRPV6-Peptide enthält, mit Cyclophilin inkubiert und die positiven Peptidspots anschließend ausgewertet.

4.1.5. Einengen der Bindestelle von Cyclophilin B auf TRPV6 mittels TRPV6-Peptidblot

Beim TRPV6-Peptidblot ist die komplette Aminosäuresequenz des TRPV6-Proteins in Peptide mit 12 Aminosäuren aufgeteilt, wobei sich die Sequenzen benachbarter Peptidspots um 6 Aminosäuren überschneiden.

Dieser Peptidblot wird nach Inkubation mit *in vitro*-translatiertem Cyclophilin B, dessen Qualität bereits in 4.1.2 überprüft wurde, inkubiert und gebundenes Protein mit Hilfe von Streptavidin-HRPO durch eine Chemilumineszenzreaktion auf dem Röntgenfilm nachgewiesen. Anschließend wird der Blot von gebundenen Proteinen befreit (3.2.10) und die Negativkontrolle durchgeführt. Hierbei wird das zur *in vitro*-Translation verwendete Retikulozytenlysat eingesetzt, allerdings ohne entsprechendes Plasmid.

Der Film der Inkubation mit *in vitro*-translatiertem Cyclophilin B wird mit dem Film nach Inkubation mit Retikulozytenlysat (Negativkontrolle) verglichen und die positiven Signalepunkte ermittelt (Abb. 21). Daraus ergeben sich 11 positive Spots, deren Aminosäuresequenz und Lokalisation in Tabelle 16 wiedergegeben ist.

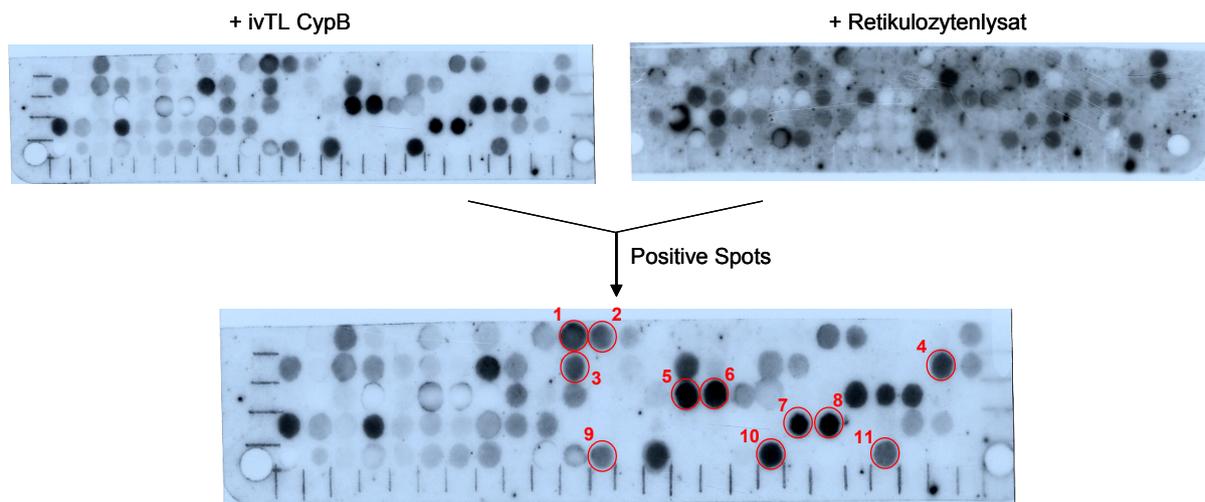


Abb. 21: Ermittlung möglicher Bindestellen für Cyclophilin B im TRPV6-Protein. Der Peptidblot wird nacheinander mit ivTL CypB und Retikulozytenlysat inkubiert und biotinylierte Proteine mit Streptavidin-HRPO detektiert. Positive Signalpunkte werden durch Subtrahieren des Films nach ivTL CypB-Inkubation mit dem Film nach Retikulozytenlysat-Inkubation ermittelt. Dadurch ergeben sich 11 positive Aminosäuresequenzen (rot umrandet). Details zu diesen Punkten gibt Tabelle 16 wieder.

Die positiven Signale sind über das gesamte TRPV6-Protein verteilt (Abb. 21 und Tabelle 16). Dabei bindet Cyclophilin B sowohl an Bereiche des zytoplasmatischen N- (4 Stück) bzw. C-Terminus (3 Stück) als auch an Bereiche die vermutlich transmembranär (4 Stück) liegen. Diese transmembranären Bereiche sollten üblicherweise von der Plasmamembran umgeben sein und sind somit für interagierende Proteine nicht gut zugänglich. Allerdings beruhen die Vorhersagen bezüglich der Membrantopologie bisher ausschließlich auf Hydropathieanalysen.

Tabelle 16: Sequenzen und proteininterne Lokalisation der positiven Signalpunkte aus Abb. 21.

<u>Spot-Nr.:</u>	<u>AS-Bereich</u>	<u>AS-Sequenz</u>	<u>Lokalisation</u>
1	61 – 72	LNKLLYEDCKV	Zytoplasmatisch (N-Terminus)
2	66 – 77	YEDCKVHQRGAM	Zytoplasmatisch (N-Terminus)
3	211 – 222	FACQMYNLLLSY	Zytoplasmatisch (N-Terminus)
4	289 – 300	EQSLELJTTK	Zytoplasmatisch (N-Terminus)
5	385 – 396	RLVGELVTVIGA	Transmembranär
6	391 – 402	VTVIGAIILLV	Transmembranär
7	559 – 570	YAAFAIIATLLM	Transmembranär
8	565 – 576	IATLLMLNLLIA	Transmembranär
9	661 – 672	KDSVEKLELGCP	Zytoplasmatisch (C-Terminus)
10	697 – 708	RLRQGTLRRDLR	Zytoplasmatisch (C-Terminus)
11		LGCPFSPHLS	Zytoplasmatisch (AK-Epitop 26B3)

Nebeneinander liegende Proteinspots zytoplasmatischer Bereiche deuten auf größere Interaktionsstellen hin, da sie auf Grund der Überlappung der Peptide gemeinsame Sequenzen haben, die für eine Bindung verantwortlich sein könnten. Dazu zählen die Spots Nummer 1 + 2. Eine weitere Übereinstimmung beinhalten die Spot 9 + 11. Bei Spot 11 handelt es sich um das Antikörperepitop für 26B3. Dieser Spot hat mit Spot 9 die AS-Sequenz LGCP gemeinsam. Dabei ist allerdings festzustellen, dass der Spot rechts zu Nr. 9 diese Sequenz

ebenfalls beinhaltet, aber kein positives Signal im Blot zeigt, was möglicherweise auf eine fehlerhafte Peptidsynthese auf dem Peptidblot hindeutet.

Durch das Ausschlussprinzip kommt in diesem Versuch somit die Aminosäuresequenz Y₆₆EDCKV₇₁ als minimale Interaktionssequenz für Cyclophilin B im TRPV6-Protein in Frage.

Alternativ wird der Peptidblot zur Bestimmung der Interaktionsstellen anstatt mit ivTL-CyPB mit gereinigtem Cyclophilin B (Reinigung siehe 4.1.6) inkubiert. Zuvor wird der Peptidblot von den gebundenen Proteinen befreit. Die Detektion des gebundenen Cyclophilin B erfolgt mit CyPB-Antikörpern im Western Blot. Der Röntgenfilm weist dabei starke Signale über die gesamte Membran auf, die auf starke unspezifische Interaktionen zurückzuführen sind. Als Negativkontrolle wird die Membran nach erneutem Abwaschen der Proteine nur mit den für den Western Blot verwendeten Antikörpern inkubiert und die Signale mittels Röntgenfilm ermittelt. Auch hier zeigt sich eine starke unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran. Im Folgenden ist es nicht möglich diese unspezifischen Bindungen zu lösen. Dabei werden neben der ursprünglichen Methode zum Abwaschen der Proteine von der Membran wesentlich stringendere Waschmethoden mit Ultraschallbehandlung in Gegenwart von Salzsäure und Natronlauge versucht, bleiben aber erfolglos. Der Peptidblot ist für weitere Versuche unbrauchbar.

Um die Interaktionsbereiche im TRPV6-Protein über eine andere Vorgehensweise näher bestimmen zu können, bietet sich auch die Methode der Pulldownanalyse mit TRPV6-GST-Fusionsproteinen an. Dabei werden längere DNS-Bereiche des TRPV6-Proteins mit der DNS der Glutathion-S-Transferase (GST) fusioniert, die gebildete DNS in *E. coli*-Bakterien transformiert und das daraus entstehende Fusionsprotein exprimiert. Diese Fusionsproteine sollen im Anschluss mit gereinigtem Cyclophilin B inkubiert und die von CyPB gebundenen TRPV6-Bereiche ermittelt werden.

4.1.6. Reinigung von endogen exprimiertem Cyclophilin B

Zur Reinigung von Cyclophilin stehen verschiedene Quellen zur Auswahl. Im Folgenden sollen Methoden zur Isolierung von endogen exprimiertem CyPB aus humaner Plazenta und aus Kuhmilch bzw. von rekombinantem CyPB aus Bakterien etabliert werden. Zur Reinigung des CyPB-Proteins wird eine Sulfopropyl (SP)-Kationenaustauschersäule verwendet, da Cyclophilin B mit einem pI von 9,33 bei neutralem pH als Kation vorliegt und dadurch an die negativ geladenen Sulfopropylgruppen der Säule bindet. Viele zytosolische Proteine haben einen niedrigeren pI und sind daher bei neutralem pH auch annähernd ungeladen, so dass sie nur schwach an die Kationenaustauschersäule binden. An die SP-Säule gebundene Proteine können mit Hilfe von Salzgradienten bzw. Salzlösungen (z.B. NaCl) von der Säule eluiert werden.

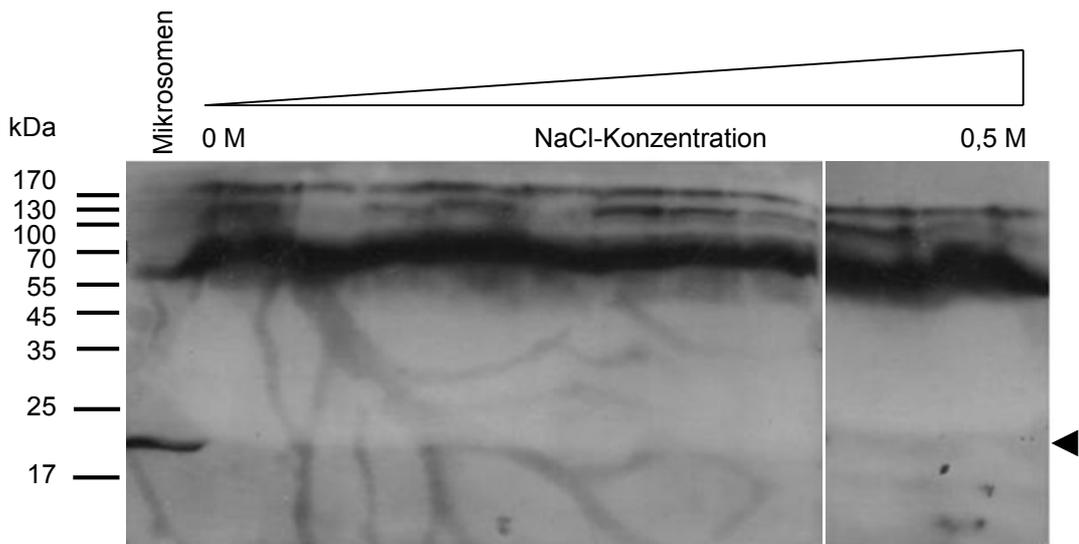


Abb. 23: Western Blot der Eluate nach der Kationenaustauscherchromatographie. Cyclophilin B wird in den humanen Plazentamikrosomen (75 μ g) detektiert (schwarzer Pfeil), aber in keiner Elutionsfraktion der Kuhmilch. Unspezifische Signale zeigen sich auf Höhe von ca. 70 kDa.

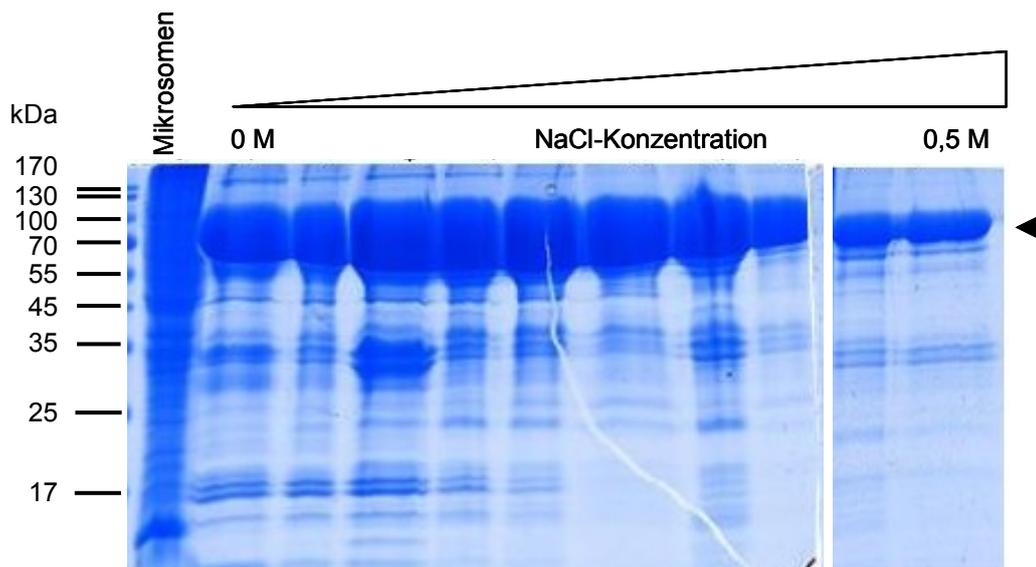


Abb. 24: SDS-PAGE zur Beurteilung der Qualität der Eluate mittels NaCl-Gradienten von der SP-Ionenaustauschersäule nach Inkubation mit Kuhmilch. Nach Coomassie-Färbung des 10%igen SDS-Gels sind starke Proteinbanden auf Höhe von ca. 70 kDa erkennbar. In diesem Bereich (Pfeil) werden ca. 1 mm hohe Gelstreifen pro Spur ausgeschnitten und mittels MALDI-ToF-MS analysiert.

Die massenspektrometrische Analyse führt zu dem Ergebnis, dass es sich bei dem stark angereicherten Protein um Lactotransferrin (pI 8,72, MW 78,12 kDa) handelt. Lactotransferrin ist ein hoch abundantes Protein, für das bisher keine Cyclophilin B-bindende Eigenschaft bekannt ist.

Als Detail der Massenspektrometrie wird exemplarisch das Ergebnis der Analyse einer Gelbande in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: Ergebnis der Massenspektrometrie der gekennzeichneten Bande des gefärbten SDS-Gel in Abb. 24. Bei dem Protein der Gelbande handelt es sich um das 78 kDa große Lactotransferrin aus *Bos taurus*.

<u>Score</u>	<u>Accession-Nr.</u>	<u>Masse (Da)</u>	<u>Protein</u>
196	gi 30794292	78056	Lactotransferrin [<i>Bos taurus</i>]

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Anreicherung und Reinigung von Cyclophilin B aus Kuhmilch nicht möglich ist, da das wesentlich abundantere Lactotransferrin stark über die SP-Kationenaustauschersäule gereinigt wird. Cyclophilin B kann in keinem der Eluate detektiert werden.

Darum wird im Folgenden versucht das rekombinante, humane Protein in *E. coli*-Bakterien zu exprimieren und Cyclophilin B im Anschluss aus dem Bakterienlysat zu isolieren.

4.1.6.2. Anreicherung von rekombinantem, humanem CyPB aus *E. coli*-Bakterien

Der Cyclophilin B enthaltende Vektor „hCyPB/pGEX2T“ (Dr. U. Wissenbach, Pharmakologie, Universität des Saarlandes) wird in kompetente Bakterien des (pLys)-BL21-*E. coli*-Stamms transformiert. Dieser Stamm hat die Eigenschaft, heterolog exprimierte Proteine nach ihrer Expression in den periplasmatischen Raum des Bakteriums zu transportieren. Die äußere Membran des Periplasmas kann mittels Frier-Tau-Lyse zerstört und die darin enthaltenen Proteine freigesetzt werden. Die innere Bakterienmembran bleibt erhalten und davon umschlossene Proteine unberührt.

Die Cyclophilin B-Expression wird nach IPTG-Zugabe induziert und die Bakterien werden für 3 Stunden kultiviert und anschließend geerntet. Zur Überprüfung, ob Cyclophilin B im Bakterium exprimiert, werden die Bakterien aus 1 ml Bakteriensuspension geerntet. Überstand und Sediment werden nach der Ernte getrennt weiterbehandelt. Der Überstand wird mit TCA gefällt (3.2.25) und die beiden Sedimente mit 2x Laemmli-Puffer denaturiert. Im Western Blot (Abb. 25 links) zeigt sich, dass sich Cyclophilin B (Pfeil) im Bakteriensediment befindet und nicht im Überstand. Das Protein verbleibt somit im Bakterium und wird nicht während der Kultivierung in das Medium abgegeben.

Um das Protein aus dem gewonnenen Sediment isolieren zu können, wird es nach Resuspension mit TBS und Einfrieren bei -20 °C wieder aufgetaut und die löslichen Bestandteile von den ungelösten Bestandteilen und den nicht aufgeschlossenen Bakterienzellen durch Ultrazentrifugation bei 20.000 xg getrennt. Im Western Blot wird überprüft, ob Cyclophilin B mittels Frier-Tau-Lyse aus dem Bakterium isoliert werden konnte. Dazu wird 1 ml des Überstands der Ultrazentrifugation gefällt und ebenso wie einige µg des Bakteriensediments mit 2x Laemmli-Puffer denaturiert. Im Western Blot (Abb. 25 rechts)

werden Signale für Cyclophilin B im Sediment (Pfeil) und in den als Kontrolle dienenden Mikrosomen detektiert. Der Überstand, in dem Cyclophilin B erwartet wird, enthält dagegen keine nachweisbare Menge des CyPB-Proteins. Die Frier-Tau-Lyse ist folglich für die Freisetzung von Cyclophilin B aus dem *E. coli* pLys-Stamm nicht geeignet.

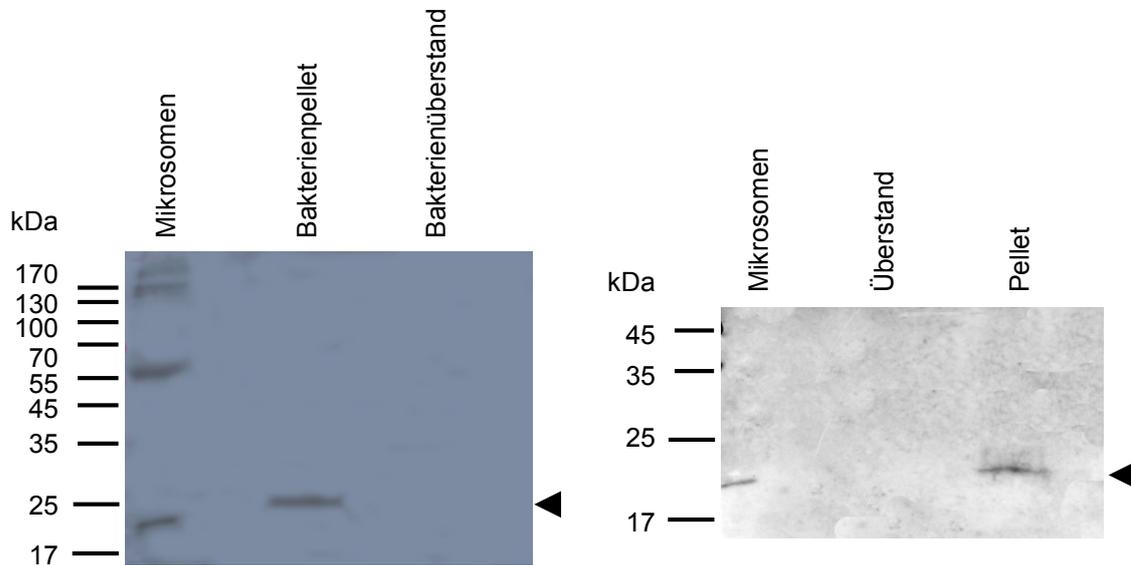


Abb. 25: Immundetektion von CyPB nach Expression in BL21(pLys)-*E. coli* und anschließender Niederzentrifugation (links) und Frier-Tau-Lyse mit anschließender Ultrazentrifugation (rechts) der Bakterien. Links: Nach der Kultivierung befindet sich Cyclophilin B in den Bakterien und wird nicht ins umgebende Medium abgegeben. Rechts: nach der Frier-Tau-Lyse befindet sich Cyclophilin B weiterhin im Bakteriensediment und wird nicht freigesetzt. AK: anti-Cyclophilin B

Alternativ werden die Bakterienproteine mittels Ultraschall/Triton-X-100-Lyse freigesetzt. Die Bakterien werden nach ihrer Ernte und Resuspension in TBS mit Ultraschall aufgeschlossen und mit Triton-X-100 inkubiert. Die gelösten Proteine werden im Anschluss durch Ultrazentrifugation bei 20.000 xg von den unlöslichen Organellen und von Zellschrott getrennt. Der mit TBS verdünnte Überstand wird über eine SP-Ionenaustauschersäule gegeben und das 0,5 M NaCl enthaltende Eluat zweimal ultrafiltriert (siehe Schema Abb. 26).

Das CyPB-Protein wird bei der Verwendung von Ultrafiltrationsröhrchen mit einem Ausschlussvolumen von 10 kDa in der Lösung oberhalb der Ultrafiltrationsmembran erwartet. Dies wird im Western Blot überprüft. Hier lässt sich eindeutig zeigen, dass das Cyclophilin B-Protein in der Fraktion mit MW 10-30 kDa vorhanden ist und dieses Signal ebenfalls mit dem Western Blot-Signal bei einem MW von 20 kDa korreliert, welches in mikrosomalen Plazentafraktionen vorhanden ist (Abb. 27).

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass es mit der hier verwendeten Vorgehensweise bestehend aus einer Kationenaustauschersäule und anschließender Ultrafiltration möglich ist, das heterolog exprimierte, humane Cyclophilin B-Protein aus Bakterien zu isolieren. Eine Aussage über die Reinheit des gereinigten Proteins kann auf Grund des gezeigten Western Blots nicht getroffen werden.

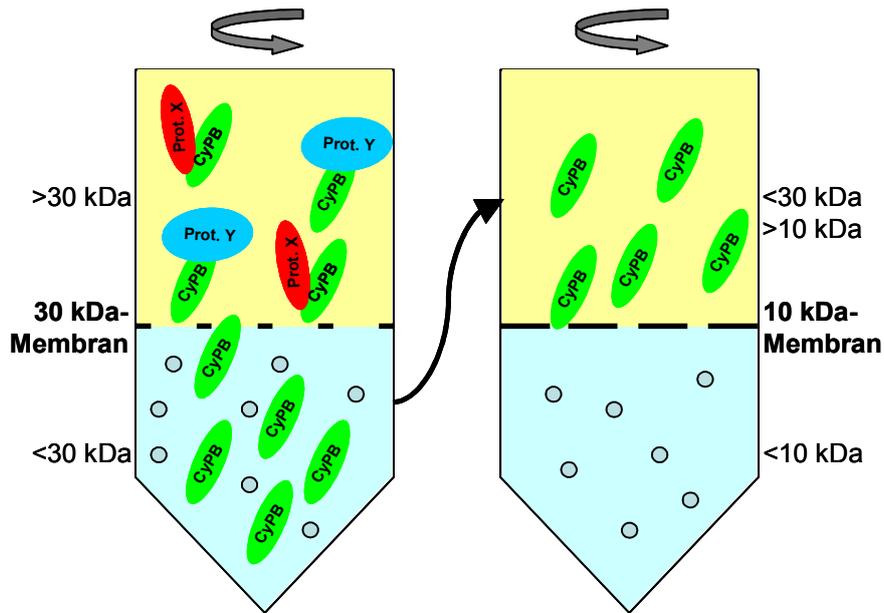


Abb. 26: Schema der Fraktionierung der Eluate der SP-Kationenaustauschersäule durch Zentrifugation in Konzentrationsröhrchen am Beispiel Cyclophilin B. Das Eluat wird zunächst durch eine Membran der Porengröße 30 kDa zentrifugiert. Die obere Fraktion enthält Proteine >30 kDa, z.B. an andere Proteine (Prot. X/Y) gebundenes Cyclophilin B (CypB). Proteine kleiner 30 kDa gelangen durch die Membran, z.B. freies Cyclophilin B. Diese Fraktion wird anschließend durch eine Membran der Porengröße 10 kDa zentrifugiert. Die obere Fraktion enthält Proteine <30 kDa und >10 kDa, z.B. freies Cyclophilin B (CypB). Proteine kleiner 10 kDa gelangen durch die Membran.

Die heterologe Expression von humanen Proteinen führt in Bakterien nicht zu den gleichen Proteinmodifikationen wie in einer eukaryontischen Zelle. Da diese Modifikationen aber für Proteininteraktionen notwendig sein können, habe ich parallel versucht Cyclophilin B aus humanem Plazentagewebe zu isolieren.

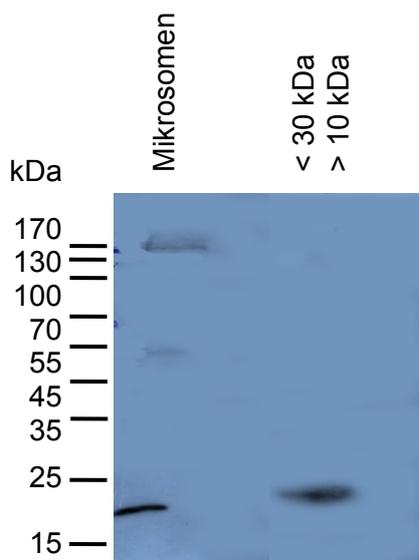


Abb. 27: Western Blot von Cyclophilin B nach Ultraschall/Triton-X-100-Lyse, Reinigung über SP-Ionenaustauschersäule und anschließende Konzentration durch Ultrafiltration. Cyclophilin B wird in der Fraktion 30 kDa > x >10 kDa, ebenso wie in den Mikrosomen (75 µg) detektiert (AK: anti-Cyclophilin B).

4.1.6.3. Anreicherung von humanem CyPB aus Plazentagewebe

Cyclophilin B ist in vielen verschiedenen Geweben des menschlichen Organismus beschrieben. Ein kommerziell erhältlicher Protein-Blot, auf den 16 verschiedene humane Gewebelysate aufgetragen wurden, soll auf die Expression von Cyclophilin B in den verschiedenen Geweben überprüft werden.

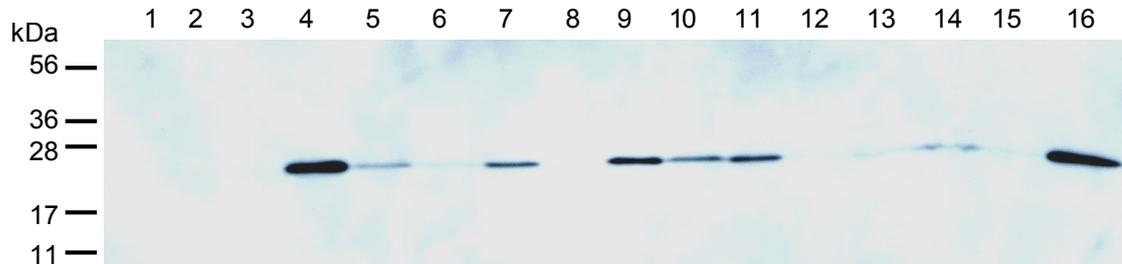


Abb. 28: Immundetektion von Cyclophilin B in verschiedenen humanen Gewebelysaten (je 50 µg Protein) auf einem Multitissueblot (Firma BioChain, Hayward, CA). 1 Herz, 2 Gehirn, 3 Niere, 4 Leber, 5 Lunge, 6 Bauchspeicheldrüse, 7 Milz, 8 Skelettmuskel, 9 Magen, 10 Dünndarm, 11 Dickdarm, 12 Rektum, 13 Uterus, 14 Prostata, 15 Hoden, 16 Plazenta. AK: anti-Cyclophilin B.

Der Western Blot zeigt unterschiedliche Signale in den verschiedenen Gewebelysaten (Abb. 28). Starke Signale bei ca. 20-23 kDa sind in den Geweben Leber (Spur 4), Milz (Spur 7), Magen (Spur 9), Dünndarm (Spur 10), Dickdarm (Spur 11) und Plazenta (Spur 16) detektierbar. Eine schwächere Expression von Cyclophilin B findet man in Lunge (Spur 5), Bauchspeicheldrüse (Spur 6), Uterus (Spur 13), Prostata (Spur 14) und Hoden (Spur 15). Die anderen untersuchten Gewebeproben enthalten keine detektierbare Menge an Cyclophilin B. Dieses Ergebnis bestätigt unsere Vermutung, dass CyPB in humaner Plazenta stark exprimiert wird.

Aus dem Plazentagewebe werden die Proteine mithilfe des ionischen Detergenz Natriumdeoxycholat solubilisiert und durch differentielle Zentrifugation ein Extrakt hergestellt (3.2.11.3). Nach der Inkubation der SP-Ionenaustauschersäule mit dem Plazentaextrakt und anschließendem Waschen der Säule werden die gebundenen Proteine mit Hilfe eines NaCl-Gradienten von 0-0,3 M eluiert.

Nach der Fällung der Eluatfraktionen, der Auftrennung der Proteine im SDS-Gel und der anschließenden Western Blot-Analyse sind starke CyPB-Signale in den ersten 15 Eluatfraktionen detektierbar. Ab einer NaCl-Konzentration von ca. 0,22 M werden die Signale deutlich schwächer (Abb. 29).



Abb. 29: Western Blot des Elutionsprofils von Cyclophilin B bei Elution mittels NaCl-Gradienten von der SP-Ionenaustauschersäule nach Inkubation mit humanem Plazentaextrakt. Die Signale für Cyclophilin B werden im Verlauf des Gradienten ab einer Konzentration von ca. 0,22 M NaCl deutlich schwächer. AK: anti-Cyclophilin B.

Da die SP-Kationenaustauschersäule auch zur Isolierung von solubilisiertem Cyclophilin B aus humanem Plazentagewebe geeignet ist und das Protein im NaCl-Gradienten bei 0,2 M bereits fast vollständig von der Säule eluiert ist, werden in der nächsten Aufreinigung die gebundenen Proteine direkt mit 0,2 M NaCl eluiert. Das Eluat wird anschließend durch Zentrifugation in Ultrafiltrationsröhrchen verschiedener Ausschlussgrößen in die Größenfraktionen >30 kDa, >10 kDa und <10 kDa aufgetrennt (siehe Schema Abb. 26).

Die Fraktionen werden im gefärbten SDS-Gel (Abb. 30, links) und im Western Blot (Abb. 30, rechts) auf Verunreinigungen und Quantität der CyPB-Aufreinigung untersucht. Im SDS-Gel erkennt man deutlich eine prominente Bande auf Höhe von ~20 kDa in der Fraktion >30 kDa, die sich in ihrer Intensität im Gegensatz zur Spur der Mikrosomen deutlich von den umgebenden Proteinbanden abhebt (Abb. 30, links Pfeil). Diese Bande ist auch in der Fraktion >10 kDa zu finden, allerdings sehr viel schwächer. Vermutlich handelt es sich in der Fraktion >10 kDa um das freie Cyclophilin B Protein. In der Fraktion >30 kDa dagegen ist Cyclophilin B an andere Proteine gebunden, deren Komplex ein höheres Molekulargewicht als 30 kDa hat. Proteine mit einem MW größer 30 kDa sind auch schwach in der Fraktion >10 kDa zu sehen. Diese können zum Teil als linearisierte Proteine während der Zentrifugation ebenfalls durch die Poren des 30 kDa-Membranfilters hindurch diffundieren.

Das SDS-Gel und der dazugehörige Western Blot zeigen, dass CyPB sowohl in der Fraktion >10 kDa als auch in der Fraktion >30 kDa angereichert wird, wobei das Signal bei >30 kDa das stärkere von beiden ist (Abb. 30, rechts, Pfeil). In der Spur, in der die mikrosomalen Plazentaproteine aufgetrennt wurden, ist das CyPB-Signal dagegen relativ schwach. Die Probe der Fraktion <10 kDa enthält kein entsprechendes CyPB-Protein.

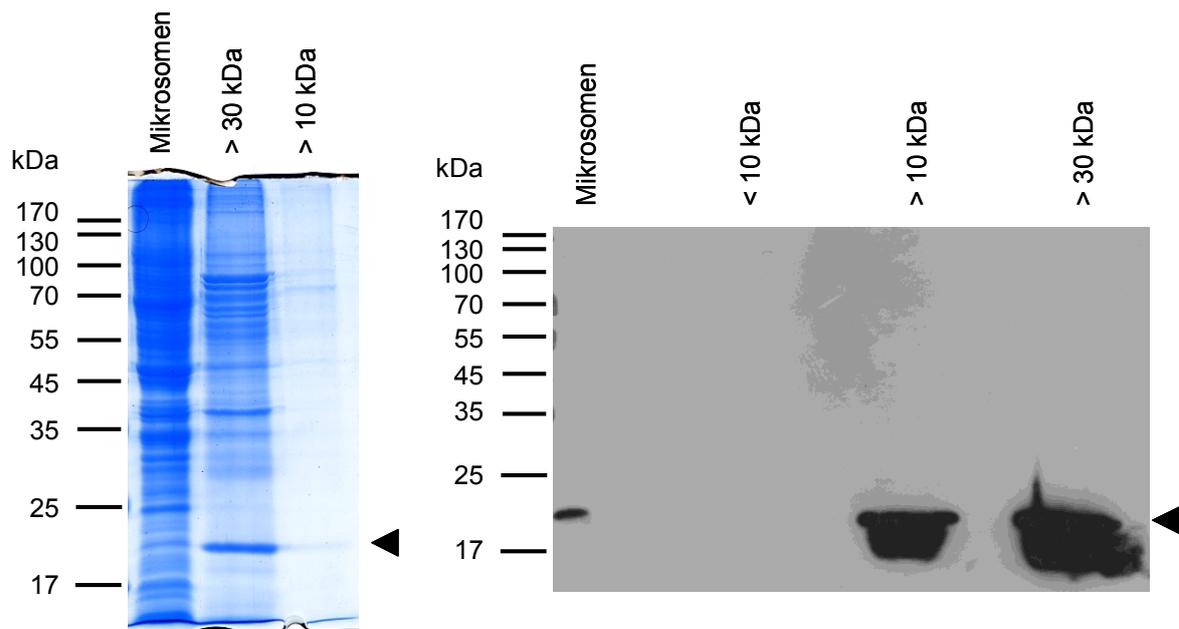


Abb. 30: SDS-PAGE (links) und Western Blot (rechts) zur Beurteilung der Qualität und Quantität der Cyclophilin B-Aufreinigung aus humaner Plazenta. Links: colloidal Coomassie-gefärbte SDS-PAGE (10 % Polyacrylamid). Neben zahlreichen angefärbten Proteinbanden findet sich eine prominente Bande bei ca. 20 kDa in der Fraktion >30 kDa und schwach in >10 kDa. Die Bande in >10 kDa (Pfeil) wird mittels MALDI-ToF-MS analysiert. Rechts: Cyclophilin B (AK: anti-Cyclophilin B) wird in den Fraktionen >30 kDa und >10 kDa detektiert, nicht aber in der Fraktion <10 kDa. Positivkontrolle: Mikrosomen (75 µg).

Die in Abb. 30 gekennzeichnete Bande der >10 kDa-Fraktion (Pfeil) wird aus dem Gel herausgeschnitten und mittels MALDI-Massenspektrometrie analysiert. Dabei wird Cyclophilin B signifikant im Spektrum der Peptidmassenfingerprint-Analyse (PMF) identifiziert (Tabelle 18) und damit bestätigt, dass es sich bei der gekennzeichneten Bande des gefärbten SDS-Gels um das gereinigte Cyclophilin B-Protein handelt. Zusätzlich kann über die Fragmentierung eines Peptids die Aminosäureabfolge DFMIQGGDFTR ermittelt und diese eindeutig dem Cyclophilin B-Protein (AS 91-101) zugeordnet werden (Tabelle 18). Das Spektrum der Sequenzierungsanalyse ist in Abb. 31 abgebildet.

Tabelle 18: Ergebnis der Massenspektrometrie der gekennzeichneten Bande des gefärbten SDS-Gels in Abb. 30. PMF = Peptidmassenfingerprint; LIFT = Peptidsequenzanalyse.

	<u>Score</u>	<u>Accession-Nr.</u>	<u>Masse (Da)</u>	<u>Protein</u>	<u>Sequenz</u>
<u>PMF</u>	129	gi 1310882	19705	Chain A, Cyclophilin B Complexed With d-(Cholinylester)ser8-Cyclosporin	
<u>LIFT</u>	69	gi 1310882	1286	Chain A, Cyclophilin B Complexed With d-(Cholinylester)ser8-Cyclosporin	DFMIQGGDFTR (AS 91-101)

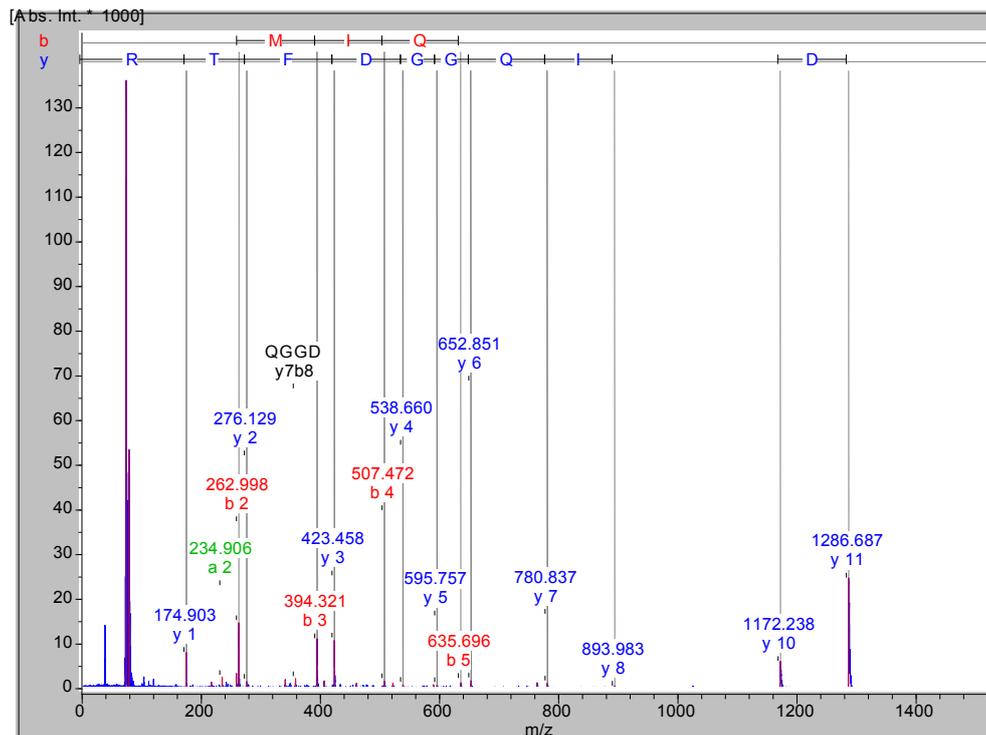


Abb. 31: Spektrum der Sequenzanalyse des fragmentierten Peptids der Cyclophilin B enthaltenden Probe. Das Spektrum der MS-Fragmentierung des CyPB-Peptids führt durch die Massenunterschiede der b- (rot) und y- (blau) Ionenserie zur Ermittlung der Aminosäuresequenz.

Die Aktivität des gereinigten Enzyms wird im folgenden Versuch mit einem Aktivitätsassay untersucht.

4.1.7. Aktivitätstest von gereinigtem Cyclophilin B

Da es sich bei Cyclophilin B um ein Protein mit einer enzymatischen Funktion handelt, ist es denkbar, dass die Interaktion mit dem Ionenkanal nur erfolgt, wenn das Enzym aktiv ist.

Für den Aktivitätstest wird das Substrat Succinyl-Alanyl-Alanyl-Prolyl-Phenylalanin-4-Nitroanilid (Suc-AAPF-pNA) mit der Protease Chymotrypsin verdaut. Die Entstehung der Produkte wird photometrisch verfolgt. Dabei kann Chymotrypsin nur die 4-Nitroanilid-Gruppe des Substrats abspalten, wenn diese in der *trans*-Konformation vorliegt. Da das Substrat aber sowohl in *trans*- als auch in *cis*-Konformation vorhanden ist, ist zur Abspaltung der 4-Nitroanilid-Gruppen aller Substratmoleküle eine *cis/trans*-Isomerisierung notwendig, die von dem aktiven Enzym Cyclophilin B, das eine Isomeraseaktivität besitzt, beschleunigt wird. In Anwesenheit von aktivem Cyclophilin B sollte daher die komplette Abspaltung aller 4-Nitroanilid-Gruppen schneller erfolgen.

Das Ergebnis des Aktivitätstests der >10 kDa-Fraktion aus Abb. 30 zeigt dagegen, dass die Kurve des Ansatzes mit gereinigtem Cyclophilin B unter der Kurve des Ansatzes ohne das

gereinigtes Protein liegt (Abb. 32), d.h. die messbare Aktivität des Chymotrypsins verringert sich durch Zugabe des gereinigten CyPB-Proteins.

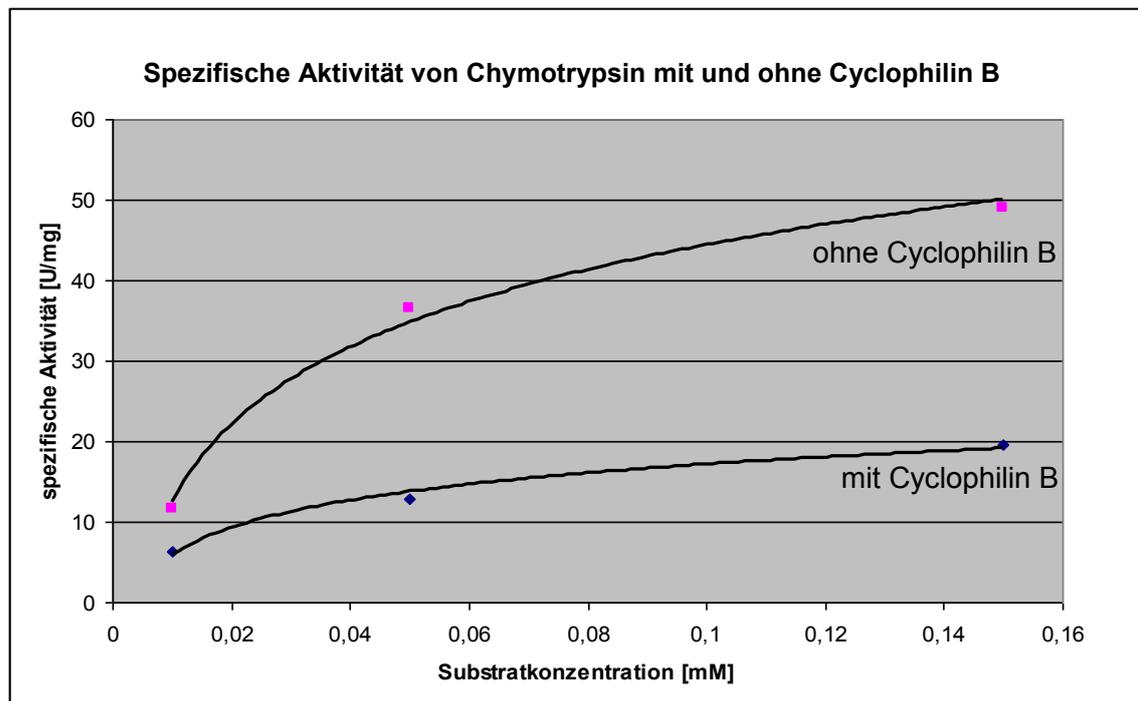


Abb. 32: Diagramm des Aktivitätstest von Chymotrypsin mit und ohne Cyclophilin B. Die Aktivität des Chymotrypsins wird durch Zugabe von Cyclophilin B nicht gesteigert. Sie liegt ohne Zugabe von Cyclophilin B höher. Die spezifische Aktivität wird nach folgender Formel berechnet: $A = ((\Delta E * V) / (\Delta t * \epsilon * d * m)) * 10^6$.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass das CyPB-Protein während der Anreicherung seine Enzymaktivität verloren hat. Dies kann zum einen an der Zusammensetzung der verwendeten Lösungen liegen oder andere mit CyPB assoziierte und mitgereinigte Proteine blockieren die Aktivität von Cyclophilin B oder des Chymotrypsins während des Aktivitätstestes.

Auf Grund dieses Aktivitätsverlusts wird der geplante GST-Pulldownversuch anstatt mit aus humaner Plazenta gereinigtem Cyclophilin B mit einem Proteinextrakt aus humaner Plazenta durchgeführt (3.2.9.1).

4.1.8. GST-Pulldownanalyse mit Plazentagewebeextrakt

Nach der Expression und Affinitätsreinigung verschiedener N- und C-terminaler TRPV6-GST-Fusionsproteine aus *E. coli*-Bakterien wird deren Konzentration und Reinheit anhand von Coomassie-gefärbten Proteingelen bewertet.

Für den Pulldownversuch werden 20 µg des jeweiligen TRPV6-Fusionsproteins mit 10 ml Plazentaextrakt (Herstellung siehe 3.2.9.1) und 75 µg GSH-Agarose gemischt. Die Affinität von GST zu Glutathion (GSH) ermöglicht es neben den Fusionsproteinen auch an diese

bindende Proteine zu isolieren. Die nach dem Pulldown-Versuch gebundenen Proteine werden mit 2x Laemmli denaturiert und ein Western Blot durchgeführt. Mit Hilfe eines GSH-Antikörpers werden im Western Blot die jeweils eingesetzten Mengen an Fusionsprotein miteinander verglichen (Abb. 33). Daraus ergibt sich, dass in allen Ansätzen, bis auf C1, annähernd gleiche Mengen des Fusionsproteins für den Versuch eingesetzt wurden. Der Bereich des C1 Fusionsproteins (AS 584-725) wird allerdings ebenfalls von den Fusionsproteinen C1D, C1E, C1H, C2 und C3 gemeinsam abgedeckt (siehe Abb. 12).

Der Western Blot mit GSH-Antikörper zeigt neben den Fusionsproteinen (Abb. 33, Pfeile) weitere Banden mit jeweils geringerem Molekulargewicht (zwischen 25-27 kDa). Dabei handelt es sich um Abbauprodukte des jeweiligen Fusionsproteins, die ebenfalls vom GSH-Antikörper erkannt werden. Nach Inkubation mit dem GSH-Antikörper wurde der gebundene erste und zweite Antikörper von der Membran entfernt und erneut mit dem Cyclophilin B-Antikörper inkubiert. Hierbei konnte in keinem Versuchsansatz das CyPB-Protein detektiert werden (Blot nicht gezeigt). Dieses Ergebnis bedeutet, dass eine Ermittlung der Bindungsregion von Cyclophilin B im TRPV6-Protein auch auf diese Art nicht möglich ist.

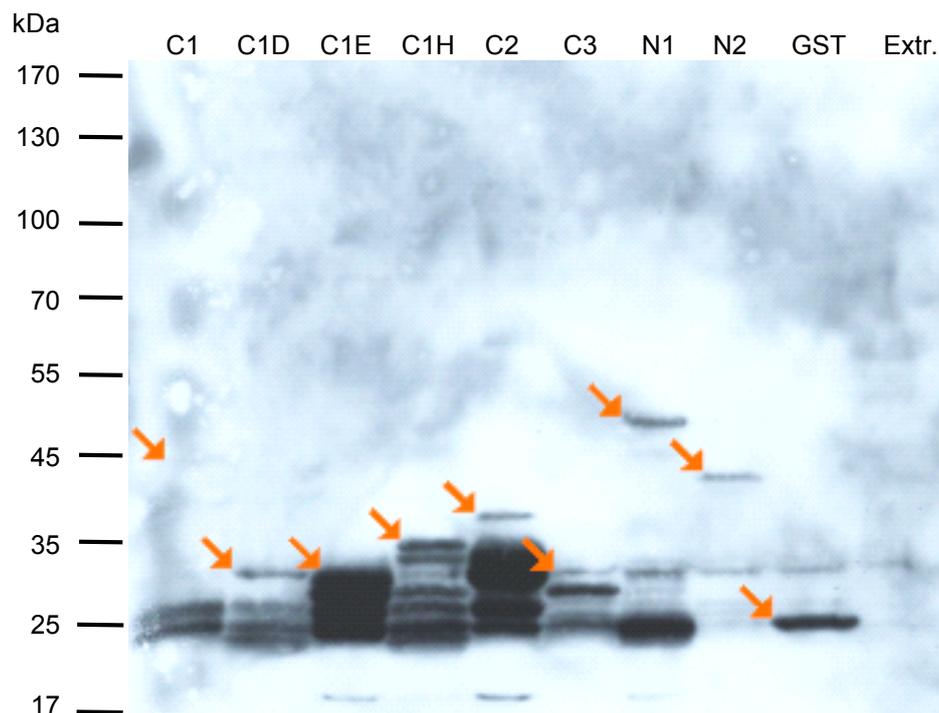


Abb. 33: Western Blot der für den Pulldownversuch eingesetzten TRPV6-GST-Fusionsproteine. Die detektierten GST-Fusionsproteine (rote Pfeile) zeigen bis auf C1 jeweils die annähernd gleiche Konzentration. Bei den detektierten Proteinen unterhalb der markierten Fusionsproteine, handelt es sich um deren Abbauprodukte. Einsatz: 20 µg Fusionsprotein, AK: anti-GST.

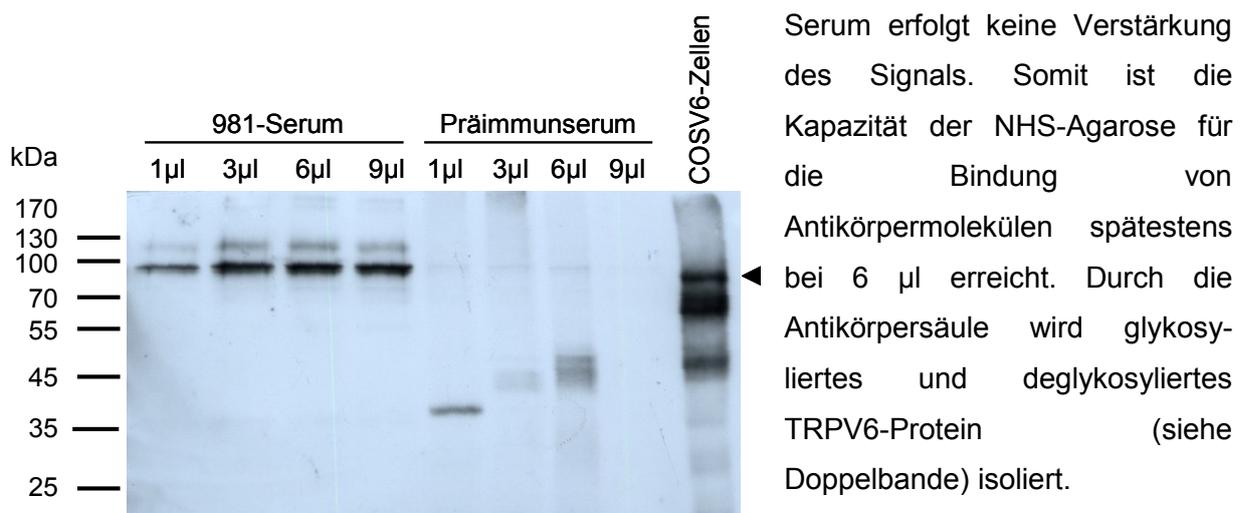
Als anschließendes Projekt soll die während der Diplomarbeit etablierte Affinitätschromatographie modifiziert werden. Bisher wurde die Reinigung des TRPV6-Kanalkomplexes in zwei Stufen über eine Calmodulin- und eine Antikörpersäule durchgeführt. Die Elution der Proteine von der CaM-Säule erfolgte mit einem EGTA-haltigen Puffer. EGTA

ist wie EDTA ein Chelator für zweiwertige Ionen und hat, wie bereits in 4.1.3 beschrieben, zur Folge, dass dadurch eventuell kalziumabhängige Bindungen zerstört werden. Folglich soll die Methode dahingehend modifiziert werden, dass auf die Verwendung der CaM-Säule verzichtet werden kann und dadurch kalziumabhängige TRPV6-Proteinkomplexe erhalten bleiben.

4.2. Herstellung und Überprüfung neuer polyklonaler TRPV6-Antikörper-Affinitätschromatographiesäulen

Für die nachfolgende Affinitätsreinigung wird eine weitere TRPV6-Antikörpersäule hergestellt. Dazu wird das Serum des Tieres 981, das zuvor in Immunpräzipitationen und Western Blot-Analysen als geeignet getestet wurde, sich allerdings nicht über das immunogene Peptid affinitätsreinigen lässt (Diplomarbeit Simone Kalinke 2009), an NHS-Sepharosematerial gekoppelt.

In einem Vorversuch wird zunächst das Serum- zu Säulenvolumenverhältnis optimiert. Hierbei werden alternativ 1, 3, 6 und 9 μ l Kaninchenserum (981) an 30 μ l NHS-Agarose gekoppelt und damit eine Affinitätschromatographie mit Dodecyl- β -D-maltosid hergestellten Extrakt aus der mikrosomalen Plazentafraktion (siehe Methode 3.2.7.2) durchgeführt. Als Negativkontrolle dienen die gleichen Mengen des Kaninchensersums vor der Immunisierung (Präimmunsersum), die ebenfalls an NHS-Agarosematerial gekoppelt werden. An die Säule gebundene Proteine werden mit 2x Laemmli-Puffer eluiert, denaturiert und anschließend nach Auftrennung im SDS-Gel im Western Blot detektiert. TRPV6 wird bereits bei 1 μ l gekoppeltem 981-Serum detektiert (Abb. 34). Die TRPV6-Signale nehmen bis zu einem Volumen von 6 μ l zu, bei 9 μ l

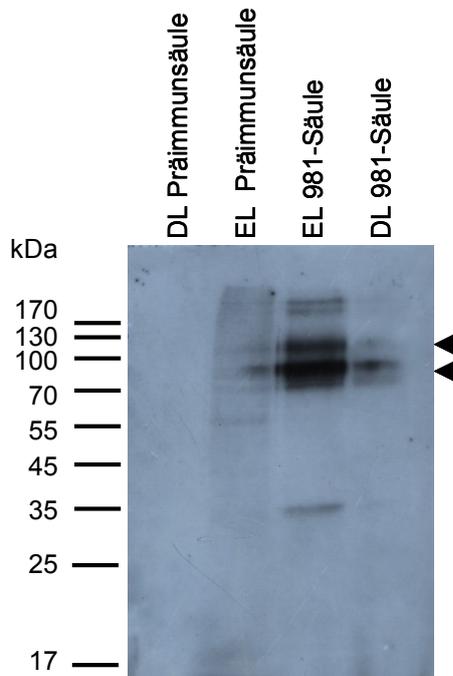


Serum erfolgt keine Verstärkung des Signals. Somit ist die Kapazität der NHS-Agarose für die Bindung von Antikörpermolekülen spätestens bei 6 μ l erreicht. Durch die Antikörpersäule wird glykosyliertes und deglykosyliertes TRPV6-Protein (siehe Doppelbande) isoliert.

Abb. 34: Western Blot der Affinitätschromatographie mittels Antikörperseren-gekoppelter NHS-Agarose unterschiedlicher Serenvolumina (981-Serum bzw. Präimmunsersum). Test der Kapazität und Qualität der hergestellten Säulen zur Aufreinigung der TRPV6-Proteinkomplexe. Die Signale von TRPV6 (AK: 26B3) nehmen bis zu 6 μ l 981-Serum zu, danach tritt die Sättigung ein. In den Ansätzen mit Präimmunsersum kann TRPV6 nicht detektiert werden. Positivkontrolle: COSV6-Zellen (20 μ g).

Das Präimmunsereum eignet sich sehr gut zur Herstellung der Kontrollsäule. In keinem Ansatz kann das TRPV6-Protein nachgewiesen werden (Abb. 34).

Zur Herstellung einer präparativen TRPV6-Affinitätschromatographiesäule werden 600 µl des 3. Serums (Tier 981) und des Präimmunsereums an jeweils 3 ml NHS-Sepharose gekoppelt. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgt diesmal mit dem antikörperspezifischen Peptid 981. Die Eluate werden in Ultrafiltrationsröhrchen konzentriert, umgepuffert, nach der



Denaturierung im SDS-Gel aufgetrennt und ein Western Blot durchgeführt (Abb. 35). Die intensivsten TRPV6-Signale befinden sich im konzentrierten Eluat (EL) der 981-Säule. Schwache Signale sind im Durchlauf (DL) der Säule nachweisbar. Dies bedeutet, dass die maximale Bindungskapazität der Säule während der Affinitätschromatographie erreicht wird und nur geringe Mengen an nichtgebundenen TRPV6-Molekülen im Durchlauf (DL) vorliegen. Im Eluat und im Durchlauf der Präimmunsereum-Kontrollsäule sind keine TRPV6-Proteine enthalten. Folglich sind beide hergestellten Säulen für eine weitere TRPV6-Affinitätschromatographie geeignet.

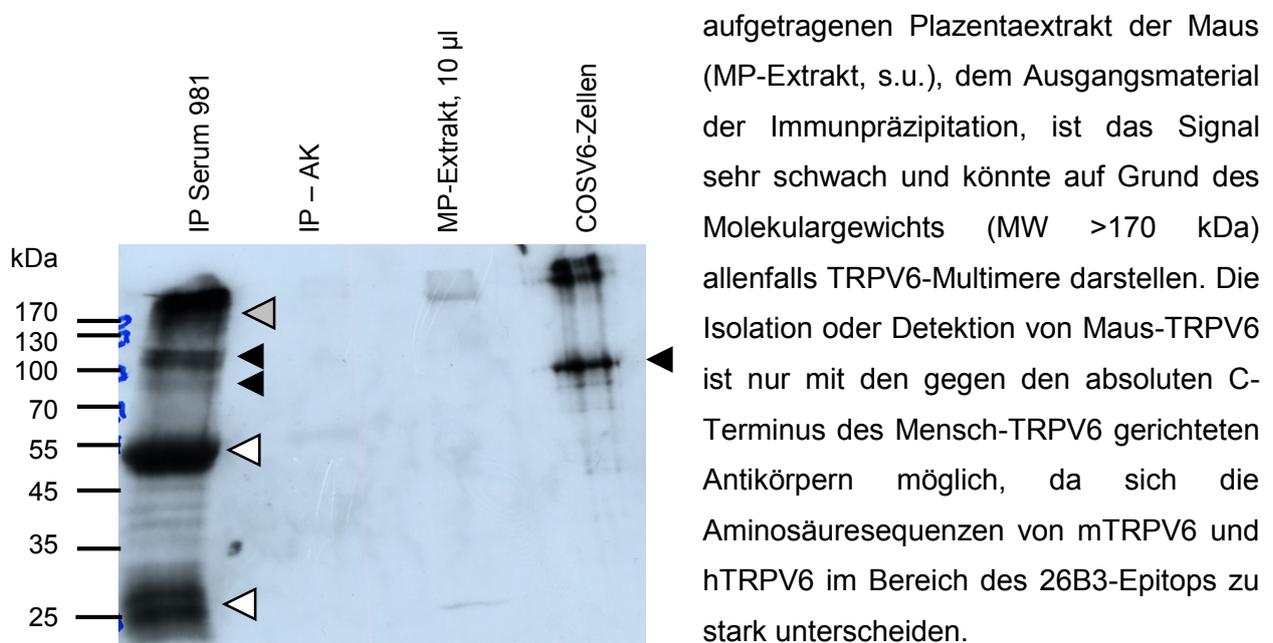
Abb. 35: Western Blot der konzentrierten Lösungen der Eluate und Durchläufe der Affinitäts-säulenchromatographie über 981- und Präimmunsäule nach Solubilisierung mit DDM. TRPV6 wird am stärksten im Eluat (EL) der 981-Säule detektiert (AK:26B3) und schwach im Durchlauf (DL) der Säule. Im Eluat und Durchlauf der Präimmunsäule wird TRPV6 nicht detektiert.

Zur Aufreinigung von Proteinen und Antikörpern stehen in unserem Labor zwei verschiedenen Methoden unter Verwendung von selbst hergestellten Affinitäts-Niederdrucksäulen zur Verfügung: die Aufreinigung erfolgte entweder mit Hilfe des computergesteuerten DuoFlow-Geräts (Bio-Rad, München), einer FPLC-Anlage inklusive Fraktionierer oder manuell mit Hilfe einer Peristaltikpumpe. Beim in Abb. 35 dargestellten Versuch wird die Affinitätschromatographie und Elution der an die Säule gebundenen Proteine mit dem DuoFlow-Gerät durchgeführt, die Behandlung der Präimmunsäule dagegen manuell. Wie bereits beschrieben, wird TRPV6 stark über die 981-Säule angereichert. Die Reinigung mit Hilfe des DuoFlow-Gerätes ist somit ebenso erfolgreich wie die bisher für beide Säulen durchgeführte manuelle Methode. Der Nachteil des DuoFlow-Gerätes ist, dass nur eine Säule pro Durchlauf bearbeitet werden kann. Dadurch steigt die Gefahr, dass es mit zunehmender Zeit vermehrt zum proteolytischen Abbau der Proteine kommt. Aus diesem Grund werden alle folgenden Affinitätschromatographien weiterhin manuell mit zwei parallel inkubierten Säulen durchgeführt.

4.3. Isolation von TRPV6 aus muriner Plazenta

Das TRPV6-Protein wurde bisher aus humaner Plazenta isoliert und es ist anzunehmen, dass es auch bei anderen Säugern, wie z.B. der Maus exprimiert wird. Die Plazenta der Maus ist ca. 5.000fach kleiner als die menschliche. So wiegt eine menschliche Plazenta ca. 500 g, eine Mausplazenta dagegen nur 50-200 mg. Im Folgenden soll versucht werden, das TRPV6-Protein aus der murinen Plazenta zu isolieren. Das TRPV6-Antikörperserum 981 wurde gegen ein Peptid des absoluten C-Terminus von TRPV6 generiert. Dieser Aminosäurenbereich ist für TRPV6 von Mensch und Maus identisch. Eine Immunpräzipitation sollte somit auch mit dem TRPV6-Protein aus Mausplazenta möglich sein.

Dazu wird ein Extrakt mit vier murinen Plazenten hergestellt, mit antikörpergebundener Protein A-Agarose inkubiert und die gebundenen Proteine mit 2x Laemmli-Puffer eluiert und denaturiert. In der SDS-PAGE werden die Proteine aufgetrennt und für den Western Blot auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Das Eluat der Immunpräzipitationen zeigt im Western Blot lediglich Signale für TRPV6 in der Spur der mit Antikörper gekoppelten Matrix und ebenso in der Positivkontrolle der TRPV6-transfizierten COS-Zellen. Im Ansatz mit Antikörper ist deutlich eine Doppelbande auf Monomerhöhe (MW 80-110 kDa) zu erkennen (Abb. 36, schwarze Pfeile), ebenso wie das deutliche Signal der Multimere (MW >170 kDa) (Abb. 36, grauer Pfeil). Im Ansatz ohne Antikörper ist kein TRPV6-Signal nachweisbar. In dem mit



aufgetragenen Plazentaextrakt der Maus (MP-Extrakt, s.u.), dem Ausgangsmaterial der Immunpräzipitation, ist das Signal sehr schwach und könnte auf Grund des Molekulargewichts (MW >170 kDa) allenfalls TRPV6-Multimere darstellen. Die Isolation oder Detektion von Maus-TRPV6 ist nur mit den gegen den absoluten C-Terminus des Mensch-TRPV6 gerichteten Antikörpern möglich, da sich die Aminosäuresequenzen von mTRPV6 und hTRPV6 im Bereich des 26B3-Epitops zu stark unterscheiden.

Abb. 36: Western Blot der Immunpräzipitation (IP) von TRPV6 aus muriner Plazenta. TRPV6 wird in der IP mit 981-Serum in glykosylierter (schwarzer Pfeil bei ~100 kDa) und deglykosylierter (schwarzer Pfeil bei ~80 kDa) Form und auf Höhe von Multimeren (grauer Pfeil) detektiert (AK: 429). Die starken Signale bei 55 kDa und 25 kDa (weiße Pfeile) stammen von den Antikörpern des 981-Serums in der IP, die durch den 2. Antikörper im Western Blot nachgewiesen werden. TRPV6 wird im Extrakt der Plazenta der Maus (MP) auf Höhe der Positivkontrolle (20 µg COSV6-Zellen) detektiert (schwarzer Pfeil). Der Ansatz ohne Antikörper (IP -AK) ist signalfrei.

Die starken Signale bei 55 kDa und 25 kDa (Abb. 36, weiße Pfeile) stellen die schweren und leichten IgG-Ketten des zur Immunpräzipitation verwendeten Antikörpers (981) dar. Dieser wird durch die Verwendung des polyklonalen Antikörpers 429 zum TRPV6-Nachweis ebenfalls im Western Blot detektiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Immunpräzipitation von TRPV6 aus der sehr kleinen Mausplazenta mit Hilfe des Antikörpers 981 gelingt. Allerdings ist die Menge des immunpräzipitierten TRPV6-Proteins zu gering, so dass von einer massenspektrometrischen Analyse abgesehen wird.

4.4. Solubilisierung und Affinitätschromatographie von TRPV6 aus humanem Plazentagewebe

Obwohl es möglich ist, das TRPV6-Protein aus murinen Plazenten anzureichern, ist die Gesamtmenge an Protein zu gering um weiterführende Versuche und Analysen bezüglich des TRPV6-Kanalproteins und daran assoziierter Proteine durchführen zu können. Aus diesem Grund wird im Folgenden humane Plazenta als Ausgangsmaterial für die einstufige Antikörperaffinitätschromatographie des TRPV6-Proteins verwendet.

Zur Solubilisierung der Proteine aus der mikrosomalen Fraktion der humanen Plazenta werden verschiedene Detergenzien getestet.

Im Anschluss soll eine einstufige Antikörper-Affinitätschromatographie etabliert werden, die auf die Verwendung der Vorreinigung über die Calmodulinsäule verzichten kann und dadurch den Erhalt Ca^{2+} -abhängiger Proteinbindungen ermöglicht.

Die hierbei gewonnen Proteine werden danach in einer zweidimensionalen Blue Native-Gelelektrophorese aufgetrennt und massenspektrometrisch analysiert.

4.4.1. Testung der Eignung von Natriumdeoxychololat, CHAPS und Nonidet P-40 für die mehrstufige Affinitätschromatographie

Anstelle des Detergenz Natriumdeoxychololat, das, wie bereits von mir gezeigt, zur Isolierung von TRPV6-Proteinen geeignet ist, werden alternativ die Detergenzien CHAPS und Nonidet P-40 zur Solubilisierung der TRPV6-Proteinkomplexe aus mikrosomalen Fraktionen der humanen Plazenta und die anschließende mehrstufige Affinitätschromatographie überprüft. Die Ergebnisse der Solubilisierungen und Affinitätschromatographien unter der Verwendung der verschiedenen Detergenzien fast Tabelle 19 zusammen.

Tabelle 19: Zusammenfassung der Affinitätschromatographien über Calmodulin- und TRPV6-Antikörpersäule nach Solubilisierung mit verschiedenen Detergenzien.

<u>Detergenz (Konzentration)</u>	<u>CaM- Säule</u>	<u>AK-/Negativ- Säulen</u>	<u>Ergebnis</u>	<u>Abbildung</u>
Natriumdeoxy- chololat (0,5 %)	ja	-	Die CaM-Säule ist gut zur Isolierung von TRPV6 und Cyclophilin B geeignet. TRPV6 wird in Fraktion 2-7 (am stärksten in 3 und 4) detektiert; CyPB wird in den Fraktionen 1-7 (am stärksten in 1 und 2) detektiert	Abb. 13
CHAPS (0,5 %)	ja	20C6 / Maus - IgG	Isolierung von TRPV6 gut möglich; kein Signal in der Negativkontrolle; CyPB wird nicht mitgereinigt	Abb. 37
Nonidet P-40 (1,25 %)	ja	20C6 / Maus - IgG	Das Detergenz verursacht ein schlechtes Laufverhalten der eluierten Proteine. Im gefärbten Gel sind keine definierten Banden erkennbar	Abb. 38

Natriumdeoxychololat (NaDox):

Die Eignung des ionischen Detergenz Natriumdeoxychololat (0,5 %) zur Solubilisierung der TRPV6-Proteine aus den Mikrosomen der Plazenta und der anschließenden Affinitätschromatographie über Calmodulin- und Antikörpersäule wurde bereits in meiner Diplomarbeit gezeigt (Stumpf, 2006).

CHAPS:

Die Solubilisierung der Proteine aus der mikrosomalen Plazentafraktion erfolgt mit 0,5 % des zwitterionischen Detergenz CHAPS. Zur Affinitätschromatographie wird das Solubilisat mit der CaM-Säule vorgereinigt und die gebundenen Proteine anschließend über 20C6- bzw. Maus-IgG-Säule mit anschließender Peptidelution (1,3 mg/ml) gereinigt. Nach Konzentration mittels Ultrafiltration werden die Proben im Western Blot (Abb. 37 links) auf TRPV6 (Abb. 37 links oben) und Cyclophilin B (Abb. 37 links unten) getestet.

Der Western Blot zeigt für TRPV6 schwache Signale in der Probe der TRPV6-Antikörpersäule sowie in den Positivkontrollen der COSV6-Zellen und der Mikrosomen des Plazentagewebes, aber nicht in der Probe der Kontrollsäule. Das als Interaktionsprotein von TRPV6 vermutete Cyclophilin B (CyPB) wird nur in den Mikrosomen der Plazenta detektiert.

Im colloidal Coomassie gefärbten Gel der gereinigten Proben (Abb. 37 rechts) lassen sich im Eluat der Antikörpersäule wesentlich mehr und zum Teil auch stärkere Proteinbanden anfärben, als in der Spur der Kontrollsäule.

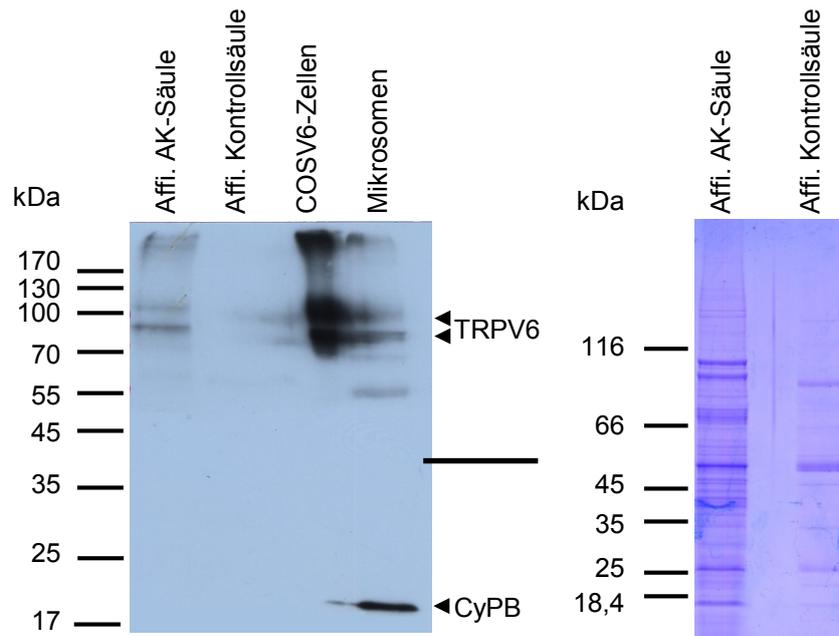


Abb. 37: Western Blot und SDS-PAGE der durch Ultrafiltration konzentrierten Eluate der AK-Affinitätschromatographie nach Solubilisaten von Mikrosomen der Plazenta mit dem Detergenz CHAPS. Links: Western Blot zur Detektion von TRPV6 (AK: 26B3) und Cyclophilin B (AK: anti-Cyclophilin B) in den Eluaten der Affinitätschromatographie. Das TRPV6-Protein wird in der Probe der Antikörpersäule (AK-Säule) und den Positivkontrollen der COSV6-Zellen (20 µg) und der Mikrosomen aus Plazenta (75 µg) detektiert, nicht aber in der Probe der Kontrollsäule. Rechts: kolloidal Coomassie gefärbte SDS-PAGE der Eluate der Affinitätschromatographie. In der Spur der Antikörpersäule (AK-Säule) sind wesentlich mehr Proteine angefärbt als in der Spur der Kontrollsäule.

Schlussfolgernd ergibt sich daraus, dass CHAPS ebenfalls gut zur Solubilisierung und Isolierung von TRPV6 und damit assoziierten Proteinen mittels Affinitätschromatographie geeignet ist. Allerdings bleibt die Interaktion zwischen TRPV6 und Cyclophilin B unter diesen Bedingungen nicht erhalten.

Nonidet P-40 (NP-40):

Die Solubilisierung der Proteine der mikrosomalen Plazentafraktion erfolgt mit 1,25 % des Detergenz Nonidet P-40. Zur darauf folgenden Affinitätschromatographie wird nur eine Hälfte des Solubilisats mit der CaM-Säule vorgereinigt und anschließend beide Hälften getrennt über 20C6- bzw. Maus-IgG-Säule geleitet. Die Eluate der einzelnen Säulen werden nach der Ultrafiltration in einer SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mit kolloidalem Coomassie angefärbt.

Man erkennt im Gel, dass alle Proben der Affinitätschromatographie ein schlechtes Laufverhalten zeigen, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass das Detergenz während der Ultrafiltration mit abgetrennt werden konnte (Abb. 38). Vergleicht man die Ansätze der Affinitätsreinigungen mit und ohne Voranreicherung über die CaM-Säule, so erkennt jeweils mehr Protein in den Eluaten ohne Antikörper. Auch enthält das Eluat der Antikörpersäule ohne Vorreinigung deutlich mehr Proteine als das Eluat der dazugehörigen Kontrollsäule.

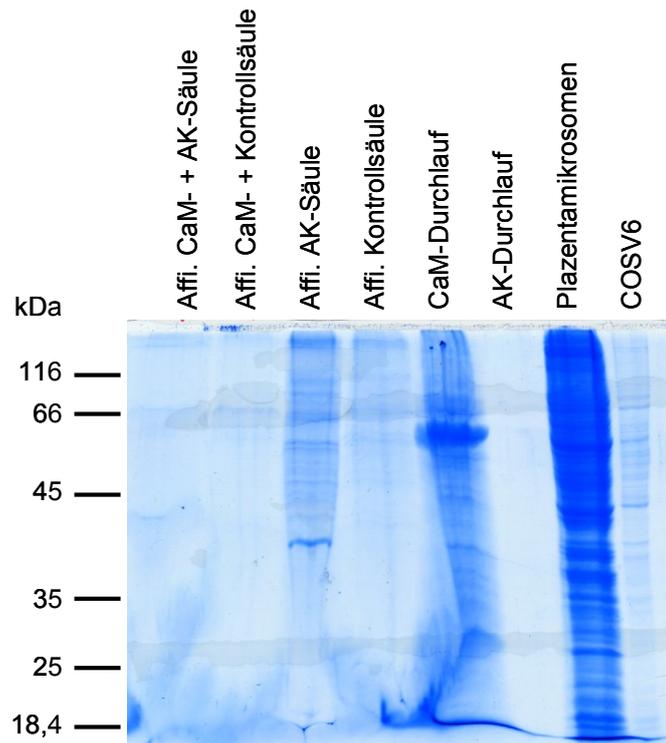


Abb. 38: Colloidal Coomassie gefärbte SDS-PAGE (10 %) der durch Ultrafiltration konzentrierten Eluate der Antikörper - Affinitätschromatographie (Detergenz Nonidet P-40). In den Nonidet P-40 beinhalteten Proben der Affinitätsreinigung (Affi.) und der Säulendurchläufe kommt es zur negativen Beeinträchtigung des Laufverhaltens und dadurch zu einer schlechten Auftrennung der Proteine.

4.4.2. Vergleich verschiedener Färbemethoden von Proteingelen

Nach der Blue Native-Gelelektrophorese werden die aufgetrennten Proteine angefärbt, aus dem Gel ausgestochen und die Proteine für ihre Analyse im Massenspektrometer vorbereitet. Daher ist es wichtig eine Färbemethode zu verwenden, die sowohl sehr geringe Mengen Protein anfärben kann, als auch mit der Massenspektrometrie vereinbar ist.

Die Silberfärbung hat laut Rehm (Rehm, 2006) die besten Eigenschaften zur Färbung von Proteinen im SDS-Gel. Allerdings können die an die Proteine haftenden Silbermoleküle in der späteren Massenspektrometrie für Probleme bei der Durchführung der Analyse sorgen. Auch wenn für die Silberfärbung nach Blum (Blum et al., 1987) eine Kompatibilität für die Massenspektrometrie vorausgesagt wird, sollen auf dem Farbstoff Coomassie basierenden Färbemethoden bezüglich ihrer Proteinnachweisgrenze untersucht werden. Coomassie ist bei der Analyse im Massenspektrometer unproblematisch. Für den Vergleich der Färbemethoden von Proteinen in Polyacrylamidgelen werden dazu die Methoden kolloidal Coomassie (siehe 3.2.20), „Blue Silver“ (siehe 3.2.21) und kommerziell erhältliches RapidStain (G-Biosciences, St. Louis, USA) auf ihre Nachweisbarkeit verschiedener BSA-Mengen in einem SDS-Gel hin untersucht und mit der Silberfärbung (siehe 3.2.18) verglichen.

Im Vergleich der Nachweisbarkeiten der Färbemethoden werden folgende BSA-Mengen noch mit dem Auge erkennbar angefärbt (siehe auch Abb. 39):

Silberfärbung: 1 μg

Blue Silver: 1 μg

Colloidal Coomassie: 2 μg

RapidStain: 4 μg

Die Blue Silver-Methode ist wie in der Publikation (Candiano et al., 2004) postuliert eine Coomassie-Färbemethode (\rightarrow „Blue“) die der Nachweisgrenze der Silberfärbung nach Blum sehr nahe kommt (\rightarrow „Silver). Die Blue Silver-Färbung ist die sensitivste der getesteten Coomassie-Färbemethoden und wird bei den anschließenden Versuchen der Blue Native-Gelelektrophorese zusätzlich als Alternative zur Silberfärbung verwendet.

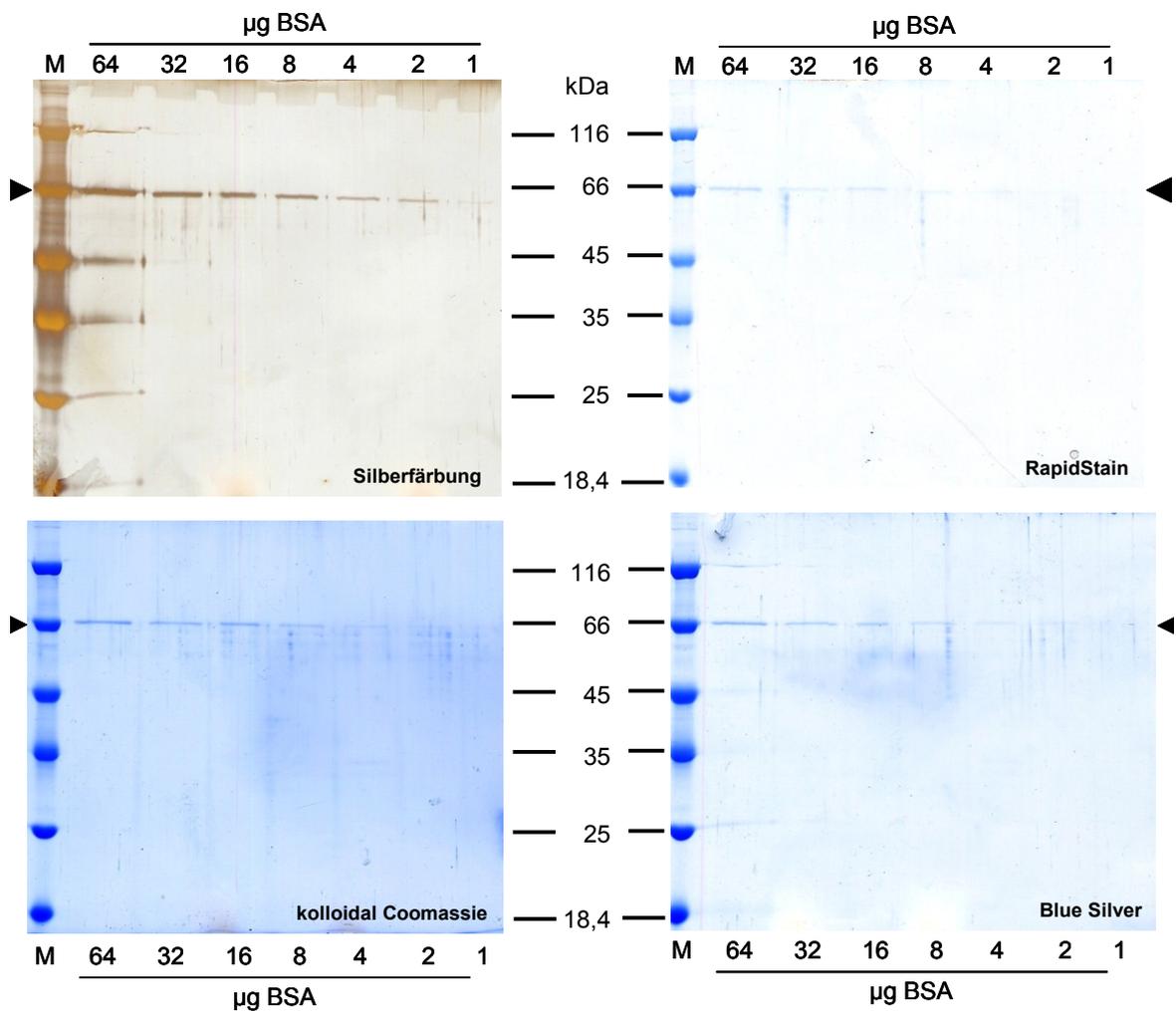


Abb. 39: Vergleich von Färbemethoden für SDS-Gele. Pro SDS-Gel (10 %) werden 64, 32, 16, 8, 4, 2 und 1 μg BSA im Gel aufgetrennt und die Proteine mit den verschiedenen Färbemethoden angefärbt. Oben links: Silberfärbung: Nachweisgrenze 1 μg ; oben rechts: RapidStain: Nachweisgrenze 4 μg ; unten links: kolloidal Coomassie: Nachweisgrenze 2 μg ; unten rechts: Blue Silver: Nachweisgrenze 1 μg . BSA siehe Pfeil. Kontrolle: BSA ist Bestandteil des Proteinmarkers.

4.4.3. Eignung von Natriumdeoxycholat, Nonidet P-40, Thesit und Dodecyl- β -D-maltosid für die einstufige Affinitätschromatographie

Die einstufige Affinitätschromatographie wird verwendet, um auf die Elution der Calmodulinsäule mit dem Chelator EGTA zu verzichten und damit kalziumabhängige TRPV6-Interaktionen zu erhalten. Für diese veränderte Vorgehensweise muss zunächst ein verwendbares Detergenz gefunden werden, das sich sowohl zur Solubilisierung des TRPV6-Proteinkomplexes, als auch zur Affinitätschromatographie über die Antikörpersäule und zur Konzentrierung des Eluats eignet.

Dazu werden die Proteine aus mikrosomalen Fraktionen der humanen Plazenta in verschiedenen Ansätzen mit den zu testenden Detergenzien und unterschiedlichen Puffern solubilisiert und anschließend der TRPV6-Proteinkomplex über die Antikörpersäulen gereinigt. Die isolierten Proteine werden im Coomassie-gefärbten SDS-Gel und im Western Blot überprüft.

Tabelle 20 fasst die Ergebnisse der Solubilisierungen und Affinitätschromatographien zusammen, die aus der Verwendung der genannten Antikörpersäulen und den Detergenzien Natriumdeoxycholat, Nonidet P-40, Thesit und Dodecyl- β -D-maltosid resultieren.

Tabelle 20: Zusammenfassung der Ergebnisse der verschiedenen Solubilisierungsansätze.

<u>Detergenz (Konzentration)</u>	<u>CaM- Säule</u>	<u>AK-/Negativ- Säulen</u>	<u>Ergebnis</u>	<u>Abbildung</u>
Natriumdeoxycholat (0,5 %)	nein	20C6 / Maus - IgG	Extrakt wird nach Säuleninkubation über Nacht zähflüssig; Bedingungen für diese Vorgehensweise ungeeignet	-
Nonidet P-40 (1,25 %)	nein	20C6 / Maus - IgG	Schlechtes Laufverhalten im Gel; Bedingungen für dieses Verfahren ungeeignet	Abb. 38
Thesit (2,5 %)	nein	26B3+24C3 / Maus-IgG	Isolierung von TRPV6 gut möglich; schwache Signal in der Negativkontrolle; CyPB wird stark in der Negativkontrolle detektiert; Gefahr unspezifischer Bindungen an die Kontrollsäule, deshalb für Affinitätschromatographie weniger geeignet	Abb. 40
Dodecyl- β -D-maltosid (1,25 %)	nein	981 / Präimmun	Isolierung von TRPV6 gut möglich; kein Signal in der Negativkontrolle; für Affinitätschromatographie gut geeignet; anschließende Verwendung für BN-PAGE mit dazugehörigem WB möglich	Abb. 35 Abb. 42

Natriumdeoxychololat (NaDox):

Die Solubilisierung der Proteine aus den Mikrosomenmembranen wird mit 0,5 % des ionischen Detergenz Natriumdeoxychololat durchgeführt. Dieses Detergenz wurde bereits erfolgreich bei der Solubilisierung von TRPV6 und der daraus folgenden Identifizierung der TRPV6-Cyclophilin-B-Interaktion eingesetzt (Stumpf, 2006). Bei der Inkubation des Proteinextraktes mit den Affinitätsäulen über Nacht bei 4 °C kam es zu dem Problem, dass die Viskosität des anfangs flüssigen Solubilisats zunahm. Dieser auf das Detergenz Natriumdeoxychololat zurückzuführende Effekt (Rehm, 2006) erschwert das Fördern des Extraktes und die nachfolgenden Waschschrte über die Säule. Dadurch wird die Probe unbrauchbar, da die Proteine wegen der klebenden Eigenschaften der zähflüssigen Lösung und nicht aufgrund ihrer Affinität zu den Antikörpern bzw. TRPV6 an der Säule hängen bleiben.

Bei der in meiner Diplomarbeit verwendeten zweistufigen Affinitätschromatographie wurde das Natriumdeoxychololat vor der Inkubation der Calmodulinsäule (GE Healthcare, München) durch die Zugabe von Triton-X-100 in einem Ca^{2+} -Puffer (20 mM Hepes, pH 7,4; 100 mM NaCl; 0,1% (v/v) Triton-X-100; 1 mM Ca^{2+} , *ad* 1000 ml) bis zu einem Probenvolumen von 1,5 l maskiert und dieser Effekt dadurch verhindert. Da die einstufige Affinitätschromatographie ausschließlich kleine Antikörpersäulen mit einem Bettvolumen von 2-3 ml verwendet, würde eine ausreichende Inkubation der Säulen mit solch einem großen Probenvolumen mindestens 12 Std. dauern. Die Dauer der Affinitätschromatographie sollte aber möglichst gering gehalten werden, um die Denaturierung von Proteinen und Proteininteraktionen weitgehend zu vermeiden. Aus diesem Grund muss ein alternatives Detergenz mit ähnlich guten Solubilisierungseigenschaften für TRPV6 gefunden werden.

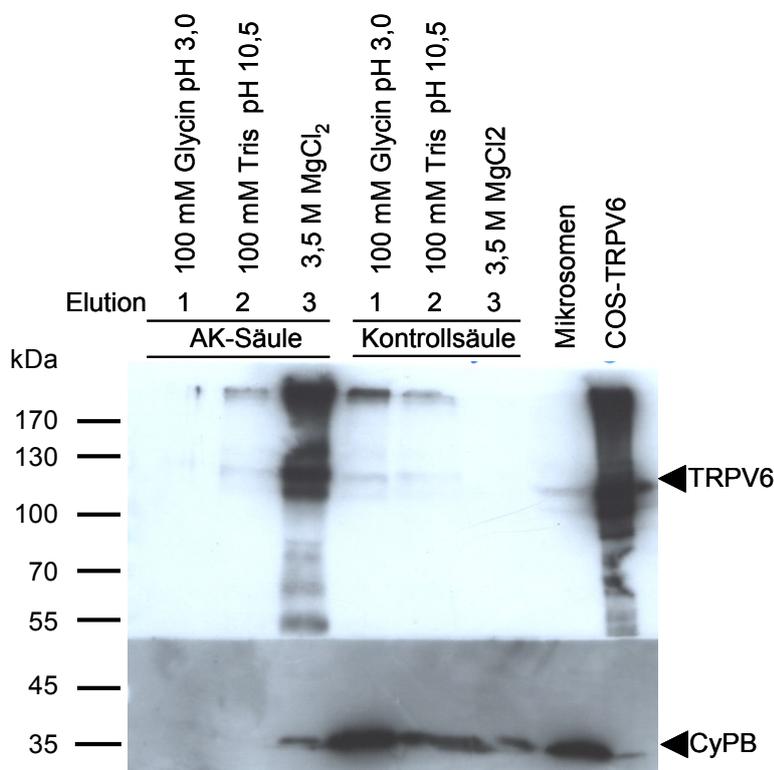
Daher werden im Folgenden die Detergenzien Thesit und Dodecyl- β -D-maltosid getestet.

Thesit:

Die Solubilisierung der Membranproteine wird ebenfalls mit 2,5 % des nichtionischen Detergenz Thesit (Synonym: Lubrol PX) durchgeführt. Da im Anschluss eine Affinitätsreinigung mit einer Mischung der Antikörper 26B3 und 24C3-Chromatographiesäulen verwendet wird, und somit unterschiedliche Epitope vorliegen, erfolgt die Elution der Proteine von der Antikörper- und der Kontrollsäule (Maus-IgG) durch einen pH-Sprung mit jeweils 10 ml 100 mM Glycin (pH 3,0) und 100 mM Tris (pH 10,5) und abschließend mit 10 ml einer Hochsalzlösung von 3,5 M MgCl_2 (MgCl_2 -Eluat mit 40 ml TBS verdünnt).

Laut Harlow & Lane (Tabelle 13.4) ist die Anwendung der genannten Elutionsmittel unschädlich für die Säulen. Die mit TCA gefällten und anschließend denaturierten Proteine der Eluate werden im SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot auf TRPV6 und CyPB untersucht. TRPV6 wird dabei am stärksten in der Probe des MgCl_2 -Eluats der Antikörpersäule detektiert,

sowie schwach in den pH 3,0- und pH 10,5-Eluaten der TRPV6-Antikörper- und IgG-Kontrollsäule (Abb. 40). TRPV6 bleibt somit nur in geringen Mengen an der Kontrollsäule hängen, wird aber stark über die Antikörpersäule angereichert. Für Cyclophilin B dagegen



zeigen sich nur Signale im $MgCl_2$ -Eluat der TRPV6-Antikörpersäule dafür aber in allen drei Eluaten der Kontrollsäule.

TRPV6 kann unter diesen Bedingungen gut über die Antikörpersäule isoliert werden. Zusätzlich wird der TRPV6-Interaktionspartner Cyclophilin B in der gleichen Fraktion eluiert wie TRPV6. Allerdings scheint CyPB unter diesen Umständen auch unspezifisch an die IgG-Kontrollsäule zu binden.

Abb. 40: Western Blot der Affinitätschromatographie mit Thesit solubilisierter Proteine und anschließende Elution mit verschiedenen Elutionsmitteln. TRPV6 (AK: 26B3) wird am stärksten mit 3,5 M $MgCl_2$ von der AK-Säule eluiert, sonst wird TRPV6 schwach in den restlichen Proben der AK-Säule und den Proben der Kontrollsäule gefunden. Cyclophilin B (AK: anti-Cyclophilin B) wird im $MgCl_2$ -Eluat der AK-Säule und in allen Eluaten der Kontrollsäule detektiert. AK-Säule = 26B3+24C3; Kontrollsäule = Maus-IgG, Positivkontrollen: Mikrosomen (75 μ g), COSV6-Zellen (20 μ g).

Dodecyl- β -D-maltosid (DDM):

Das nichtionische Detergenz Dodecyl- β -D-maltosid wird als Solubilisierungsmittel bei der von Schagger (Schagger und von Jagow G., 1991) entwickelten Blue Native-PAGE-Methode zur Auftrennung ganzer Proteinkomplexe verwendet. Das Detergenz wird in einer Konzentration von 1,25 % und unter Verwendung eines speziellen Extraktionspuffers (siehe 3.2.7.2) eingesetzt. Zur Affinitätschromatographie werden die eigens angefertigten Antikörpersäulen mit gekoppeltem 981-Serum bzw. Präimmenserum genutzt. Das Eluat der Antikörper-Affinitätschromatographie zeigt nach Ultrafiltration im Western Blot Signale für das TRPV6-Protein auf Höhe der Signale der Positivkontrolle (Abb. 41, Pfeil). Das Eluat der Präimmunsäule dagegen enthält kein TRPV6-Protein. Das Detergenz DDM scheint demnach zur Solubilisierung und Anreicherung des TRPV6-Proteins über die einstufige Affinitätschromatographie geeignet zu sein.

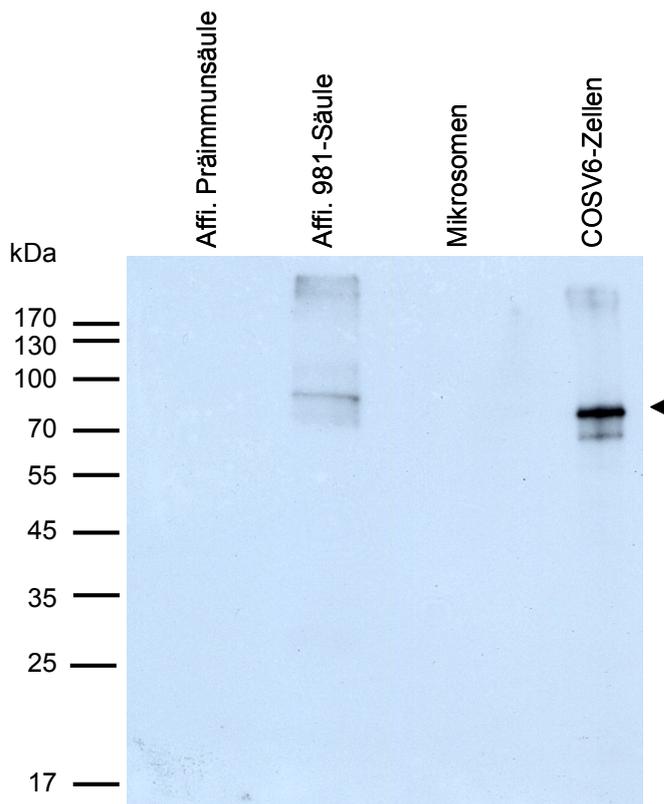


Abb. 41: Western Blot der affinitätsgereinigten TRPV6-Proteinkomplexe nach Solubilisierung mit 1,25 % Dodecyl- β -D-maltosid. TRPV6 (AK: 26B3) wird nur in der Probe der Affinitätsreinigung über die 981-Säule und in der Positivkontrolle der COSV6-Zellen detektiert. Die Negativkontrolle der Präimmunsäule zeigt kein Signal. Positivkontrollen: Mikrosomen (75 μ g), COSV6-Zellen (20 μ g).

4.4.4. Optimierung der Blue Native-Gelelektrophorese-Methode

Zur Durchführung der Blue Native-Gelelektrophorese (Schägger und von Jagow G., 1991) werden nichtionische Detergenzien zur Solubilisierung eingesetzt. In der 1. Dimension dient der Farbstoff Coomassie als Ladungsträger. In Anwesenheit von Ionen kann es zur Präzipitation des Coomassie und daran gebundener Proteine kommen. Daher dürfen die Puffer möglichst keine Ionen enthalten. Aus diesem Grund wird für die Solubilisierung der Proben der BN-PAGE eine ionenfreier Extraktionspuffer (siehe 3.2.7.2) verwendet. Als nichtionische Detergenzien mit guten Solubilisierungseigenschaften für Proteinkomplexe kommen Dodecyl- β -D-maltosid, Digitonin und Triton-X-100 in Frage.

Die Eluate der Affinitätschromatographien werden nach ihrer Konzentrierung in Ultrafiltrationsröhrchen für eine Blue Native-PAGE verwendet. Die Resultate der einzelnen Ansätze findet sich im nachfolgenden Abschnitt (siehe 4.5).

Tabelle 21 zeigt eine Zusammenfassung der dargestellten Ergebnisse aus den verschiedenen Ansätzen zur Solubilisierung von Proteinen aus Mikrosomen der Plazenta mit anschließender Affinitätschromatographie für die Blue Native-Gelelektrophorese.

Tabelle 21: Zusammenfassung der Ergebnisse der verschiedenen Solubilisierungsansätze für die Blue Native-Gelelektrophorese mit anschließendem Western Blot.

<u>Detergenz (Konzentration)</u>	<u>CaM-Säule</u>	<u>AK-/Negativ-Säulen</u>	<u>Ergebnis</u>	<u>Abbildung</u>
Dodecyl-β-D-maltosid (1,25 %)	nein	981 / Präimmun	Isolierung von TRPV6 gut möglich; kein Signal in der Negativkontrolle;	Abb. 35
			anschließende Verwendung für BN-PAGE mit dazugehörigem WB	Abb. 42
Digitonin (1 %)	nein	981 / Präimmun	Eluate der Affinitätschromatographie werden komplett für die Blue Native – PAGE verwendet	Abb. 43
Triton-X-100 (1,25 %)	nein	20C6 + 429 / Maus IgG	Eluate der Affinitätschromatographie werden komplett für die Blue Native – PAGE verwendet.	Abb. 44

Dodecyl-β-D-maltosid:

Die Eignung von Dodecyl-β-D-maltosid für die Solubilisierung TRPV6-haltiger Proteinkomplexe, wie auch von Schägger und von Jagow publiziert, wurde bereits im vorhergehenden Abschnitt gezeigt (siehe 4.4.2). Hier wurde schon der auf die BN-PAGE abgestimmte Extraktionspuffer verwendet. Die Ansätze können somit auch für eine Blue Native-Gelelektrophorese verwendet werden (siehe 4.5.1).

Digitonin:

Digitonin ist ein weiteres nicht ionisches Detergenz. Es wird aus den Wurzeln der Fingerhutpflanze gewonnen und ist wegen seiner sehr schonenden Solubilisierungseigenschaften sehr gut für das Herauslösen größerer, intakter Proteinkomplexe geeignet. Das Detergenz wird als Alternative zu DDM in der Blue Native-PAGE verwendet (Schägger et al., 1994), hat aber den Nachteil, dass es sehr giftig ist, sich nur bei Hitze löst und im Kalten (<6 °C) ausfallen kann.

Die in Ultrafiltrationsröhrchen konzentrierten Peptideluatate der 981-Antikörper- und Präimmunsäule werden direkt für die Separierung in der Blue Native-PAGE und für den entsprechenden Western Blot verwendet (siehe 4.5.2).

Triton-X-100:

Das nicht ionische Detergenz Triton-X-100 ist theoretisch auch für die Durchführung der Blue Native Gelelektrophorese geeignet. Zur Reinigung der TRPV6-Proteinkomplexe, werden diese mit 1,25 % Triton-X-100 solubilisiert und die solubilisierten Proteine dann nacheinander über zwei mit 20C6- bzw. 429-Antikörper gekoppelte Säulen geleitet. Als Negativkontrolle dient die Maus-IgG-Säule. Nach der Elution der Proteine mit dem antigenen Peptid und der Konzentrierung in Ultrafiltrationsröhrchen werden die Eluate der Antikörpersäulen vereinigt und die Ansätze auf die 1. Dimension der Blue Native-PAGE aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine anschließend im Western Blot detektiert (siehe 4.5.3).

4.5. Blue Native-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) mit affinitätsgereinigten TRPV6-Multiproteinkomplexen

4.5.1. Anreicherung des TRPV6-Proteinkomplexes nach DDM-Solubilisierung mittels Antikörper-Affinitätsreinigung und anschließende Blue Native-PAGE

Für die Blue Native-Gelelektrophorese werden 500 mg Protein der mikrosomalen Plazentafraktion mit 1,25 % DDM-haltigem Puffer solubilisiert und die TRPV6-Proteinkomplexe mittels Affinitätschromatographie isoliert. Nach Konzentrierung der Eluate werden diese mit Ponceaurot versetzt, auf die 1. Dimension des nativen Gels aufgetragen und die in den Proben enthaltenen Komplexe ihrer Größe nach aufgetrennt. Die danach ausgeschnittenen Spuren werden nach denaturierender Vorbehandlung auf ein SDS-Gel aufgelegt, die enthaltenen Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt und die Proteine mittels Silberfärbung detektiert (Abb. 42 A). Parallel dazu wird ein Western Blot mit TRPV6-Antikörpern durchgeführt, um die Lokalisation des TRPV6-Proteins im Gel zu überprüfen (Abb. 42 B).

Das silbergefärbte Gel der Blue Native-PAGE (nach Solubilisierung mit DDM) zeigt einen stark gefärbten senkrechten Streifen von Proteinen auf Höhe von 5 % (> 700 kDa) der 1. Dimension (Abb. 42 A, schwarzer Pfeil). Zusätzlich findet sich ein ähnlich prägnanter Streifen auf Höhe von ca. 13 % (ca. 400 kDa) der 1. Dimension (Abb. 42 A, grauer Pfeil). Bei beiden Streifen kann es sich um Proteine jeweils eines Proteinkomplexes oder mehrere Proteinkomplexe gleicher Größe handeln. Die Migration von TRPV6 (MW 83 kDa) zwischen 440 kDa und 669 kDa zeigt, dass das Membranprotein Bestandteil eines größeren Proteinkomplexes ist.

Auf dem Western Blot sind TRPV6-Signale auf entsprechender Höhe von links (Abb. 42 B, schwarzer Pfeil) bis zur Mitte des Blots erkennbar (Abb. 42 B, roter Pfeil). Dabei erscheint das Signal ganz links stärker, wird zur Mitte hin schwächer und ist dann im Bereich des roten Pfeils am stärksten. Außerdem liegen die Signale im Western Blot durchgehend als Doppelbande vor, die dem glykosylierten und deglykosylierten Monomer des TRPV6-Proteins entsprechen. Zusätzlich sind zwei Signale bei ca. 170 kDa und größerem MW zu erkennen, bei denen es sich um Di- bzw. Multimere des TRPV6-Ionenkanals handeln kann. Das stärkste TRPV6-Signal erscheint bei ca. 500 kDa der 1. Dimension. An der vergleichbaren Position im SDS-Gel wird allerdings kein Protein angefärbt. Übereinstimmungen zwischen dem Signal im Western Blot und den angefärbten Proteinen im SDS-Gel befinden sich nur im Bereich des schwarzen Pfeils, also bei einem Proteinkomplex mit sehr hohem Molekulargewicht (>700 kDa).

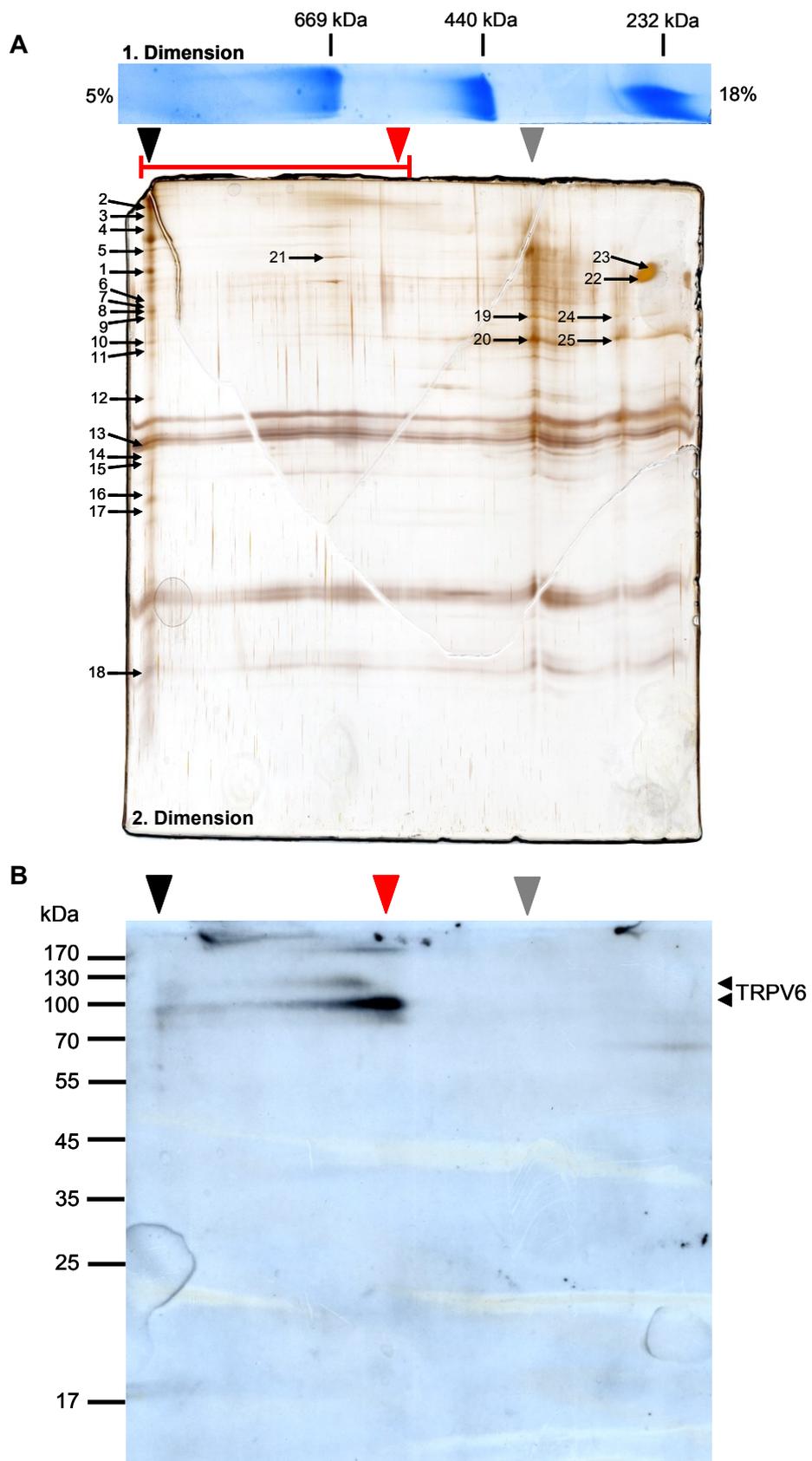


Abb. 42: Silbergefärbtes SDS-PAGE-Gel (A) und Western Blot (B) der 2. Dimension nach der Blue Native PAGE (nach DDM-Solubilisierung und Antikörper-Affinitätschromatographie). A, oben: Proteinstandard der 1. Dimension der BN-PAGE („Blue Silver“-gefärbtes Gradientengel 5-18% mit Proteinkomplexen mit MW von 669 kDa, 440 kDa und 232 kDa). In gleicher Orientierung wurde der Gelstreifen der 1. Dimension, auf dem zuvor das Eluat der Antikörper-Affinitätschromatographie

aufgetrennt wurde, auf das SDS-Gel (12%) aufgelegt. (A), unten: Silbergefärbtes SDS-Gel der 2. Dimension. Man erkennt zwei vertikale Streifen auf Höhe von >700 kDa (schwarzer Pfeil) und ca. 400 kDa (grauer Pfeil) der 1. Dimension. Die enthaltenen Proteine können jeweils einem Proteinkomplex entstammen. Im Bereich des TRPV6-Signals (rote Linie) des dazugehörenden Western Blots (B) werden nur Proteine im Bereich des linken vertikalen Streifens angefärbt. Auch im Bereich des stärksten TRPV6-Signals im Western Blot (B, roter Pfeil) sind im SDS-Gel keine Proteine angefärbt (roter Pfeil). B: TRPV6 (AK: 26B3) wird im Bereich zwischen ca. 5% und 13% der 1. Dimension (Marker siehe Abb. 42 A) detektiert (zwischen schwarzem und roten Pfeil). Das Signal ist dabei im Bereich des schwarzen Pfeils etwas stärker wird anschließend schwächer und erreicht die höchste Signalstärke im Bereich des roten Pfeils. Die Signale liegen durchgehend als Doppelbande vor. Teilweise sind auch Di- und Multimer-Signale zu erkennen. Das Signal im Bereich des schwarzen Pfeils stimmt mit dem linken vertikalen Streifen des SDS-Gels überein (Abb. 42 A, schwarzer Pfeil), im Bereich des rechten vertikalen Streifens des SDS-Gels (Abb. 42 A, grauer Pfeil) befindet sich im Western Blot kein TRPV6-Signal (grauer Pfeil).

Die angefärbten Proteinspots des SDS-Gels werden anschließend massenspektrometrisch analysiert und die enthaltenen Proteine identifiziert. Bei dieser Untersuchung wird das TRPV6-Protein allerdings nicht identifiziert. Möglicherweise liegt das Protein nur in sehr geringer Konzentration vor, die unterhalb der Nachweisgrenze des MALDI-ToF-Massenspektrometers liegt. Dafür sprechen auch die größtenteils schwachen Signale im Western Blot (Abb. 42 B). Ein weiterer Grund könnte der störende Einfluss der durch die Färbung ins Gel gebrachten Silberionen sein, auch wenn die hier verwendete Methode (siehe 3.2.18) als kompatibel für die Massenspektrometrie beschrieben ist.

Die mittels MALDI-Massenspektrometrie signifikant identifizierten Proteine sind in Tabelle 22 aufgelistet.

Die Ergebnisse des Western Blots zeigen, dass die Anreicherung und Auftrennung der TRPV6-Proteine und daran assoziierter Proteine mittels zweidimensionaler Blue Native-Gelelektrophorese möglich ist. Allerdings ist die Menge an TRPV6-Protein so gering, dass das Protein nur mittels Antikörper aber nicht durch MALDI-ToF-Massenspektrometrie detektiert werden kann. Als Ursache kommt das zweistufige Verfahren der BN-PAGE in Betracht, da hier evtl. hohe Proteinverluste beim Transfer von der 1. zur 2. Dimension erfolgen. An sich sollte, wie ich in meiner Diplomarbeit zeigen konnte, die Menge an gewonnenem TRPV6-Protein aus einer Affinitätschromatographie ausreichen, um das Protein sicher massenspektrometrisch aus einer Bande nach einer eindimensionalen (1D) SDS-Gelelektrophorese zu identifizieren.

Tabelle 22: Liste der signifikant mittels MALDI-ToF-MS identifizierten Proteine der jeweiligen in Abb. 42 A nummerierten Spots. Die ausführliche Liste befindet sich im Anhang (7.1, Tabelle 24).

Spot	Accession-Nr.	MW [Da]	Score	Protein
1	gi 71042280	52997	219	Chain A, X-Ray Structure Of Alkaline Phosphatase From Human Placenta [Homo sapiens]
2	gi 119614803	193703	104	Clathrin, heavy polypeptide (Hc), isoform CRA_c [Homo sapiens]
3	gi 71042280	52997	132	Chain A, X-Ray Structure Of Alkaline Phosphatase From Human Placenta [Homo sapiens]
4	gi 4507021	102013	80	Solute carrier family 4, anion exchanger, member 1 [Homo sapiens]
5	gi 10716563	67982	82	Calnexin precursor [Homo sapiens]
6	gi 71296885	60216	70	Monoamine oxidase A [Homo sapiens]
7	gi 62087952	48955	78	Ankyrin repeat domain 11 variant [Homo sapiens]
8	gi 181213	58362	75	Cytochrome P-450-Aromatase [Homo sapiens]
9	gi 11935049	66198	72	Keratin 1 [Homo sapiens]
	gi 119605949	141497	65	CASK interacting protein 1, isoform CRA_a [Homo sapiens]
10	gi 4501885	42052	111	Beta actin [Homo sapiens]
11	gi 386780	40303	96	3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene [Homo sapiens]
12	gi 119597993	32600	78	Annexin A2, isoform CRA_c [Homo sapiens]
13	gi 27923959	374544	68	Bullous pemphigoid antigen 1 [Homo sapiens]
14	gi 38492827	15141	99	Chain B, Globular Head Of The Complement System Protein C1q [Homo sapiens]
15	gi 4506743	24475	70	Ribosomal protein S8 [Homo sapiens]
16	gi 38114878	23417	68	RPL13A protein [Homo sapiens]
17	gi 16076266	8712	68	Immunoglobulin heavy chain variable region [Homo sapiens]
18	gi 40354192	59020	79	Keratin 10 [Homo sapiens]
19	gi 763111	60144	153	Desmolase [Homo sapiens]
20	gi 4501887	42108	88	Actin, gamma 1 propeptide [Homo sapiens]
	gi 4501885	42052	88	Beta actin [Homo sapiens]
21	gi 862457	83648	69	Enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase alpha-subunit of trifunctional protein [Homo sapiens]
22	gi 55669910	67174	100	Chain A, Crystal Structure Of The Ga Module Complexed With Human Serum Albumin [Homo sapiens]
23	gi 55669910	67174	67	Chain A, Crystal Structure Of The Ga Module Complexed With Human Serum Albumin [Homo sapiens]
24	gi 763111	60144	150	Desmolase [Homo sapiens]
25	gi 4501885	42052	142	Beta actin [Homo sapiens]

4.5.2. Anreicherung des TRPV6-Proteinkomplexes nach Digitonin-Solubilisierung mittels Antikörper-Affinitätsreinigung und anschließende Blue Native-PAGE

In einem weiteren Versuch soll das nichtionische Detergenz Digitonin verwendet werden. Es wurde bereits auf Grund seiner schonenden Solubilisierungseigenschaften erfolgreich zur Isolierung von Proteinkomplexen eingesetzt und ist in der Literatur beschrieben (Schägger und von Jagow G., 1991). Für diesen Versuch wird die doppelte Menge mikrosomaler Proteine für die Solubilisierung und Affinitätschromatographie eingesetzt und zur Färbung die Blue Silver-Methode (siehe 3.2.21) verwendet.

Für die Affinitätschromatographie werden 1 g mikrosomale Proteine der Plazenta mit digitoninhaltigem Puffer (1 %) solubilisiert, die TRPV6-Proteinkomplexe über die Antikörpersäule (981) isoliert und die Eluate konzentriert. Die gewonnenen Proteinproben werden für die BN-PAGE vorbereitet und in 1. und 2. Dimension aufgetrennt.

Das Blue Silver-gefärbte Gel der 2. Dimension zeigt einen vertikalen, das gesamte Gel von oben bis unten durchziehenden Streifen auf Höhe von 5 % der 1. Dimension (Abb. 43 A, schwarzer Pfeil). Dieser ähnelt dem Proteinstreifen bei der Blue Native-PAGE nach DDM-Solubilisierung aus Abb. 42 A. Eine weitere Spur bei höherer Konzentration ist allerdings nicht sichtbar.

Die Detektion des TRPV6-Proteins im Western Blot zeigt Signale bei verschiedenen Molekulargewichten (Abb. 43 B). Das TRPV6-Protein ist Bestandteil verschieden großer Proteinkomplexe. Dabei erstreckt sich das Signal in drei Bereichen im Konzentrationsbereich der 1. Dimension von 5 % bis ca. 13 %. Die Signale sind dabei am Anfang konzentriert werden zur Mitte hin zunächst schwächer und sind bei ca. 12 % wieder so intensiv wie im Bereich von 5 %. Das intensive Signal bei 5 % deckt sich dabei mit der vertikalen Spur des gefärbten Gels in Abb. 43 A. Auch hier ist das Ergebnis ähnlich wie beim Versuch nach DDM-Solubilisierung (siehe Abb. 42 A). Die TRPV6-Proteinsignale sind in beiden Western Blots in Bezug auf ihre räumliche Ausdehnung und den Verlauf der Signalstärke fast gleich. Die Signale sind im Western Blot nach Solubilisierung mit Digitonin (Abb. 43 B) im Vergleich zum Western Blot nach Solubilisierung mit DDM (Abb. 42 B) aber insgesamt etwas stärker, was wahrscheinlich auf die erhöhte Menge der eingesetzten Mikrosomen zurückzuführen ist.

Die angefärbten Proteinspots des SDS-Gels (Abb. 43 A) werden anschließend massenspektrometrisch im MALDI-ToF-Gerät analysiert und die enthaltenen Proteine identifiziert. Bei dieser Untersuchung wird das TRPV6-Protein ebenfalls wie im Versuch zuvor, bei dem mit DDM solubilisiert wurde, nicht nachgewiesen. Möglicherweise liegt das Protein auch hier in zu geringer Konzentration vor. Die Ursache liegt nicht bei der „Blue Silver“-Färbemethode. Diese wurde bereits im Rahmen anderer Versuche erfolgreich eingesetzt und auf ihre Kompatibilität mit der Massenspektrometrie getestet (Zhang, 2008; Kalinke, 2009).

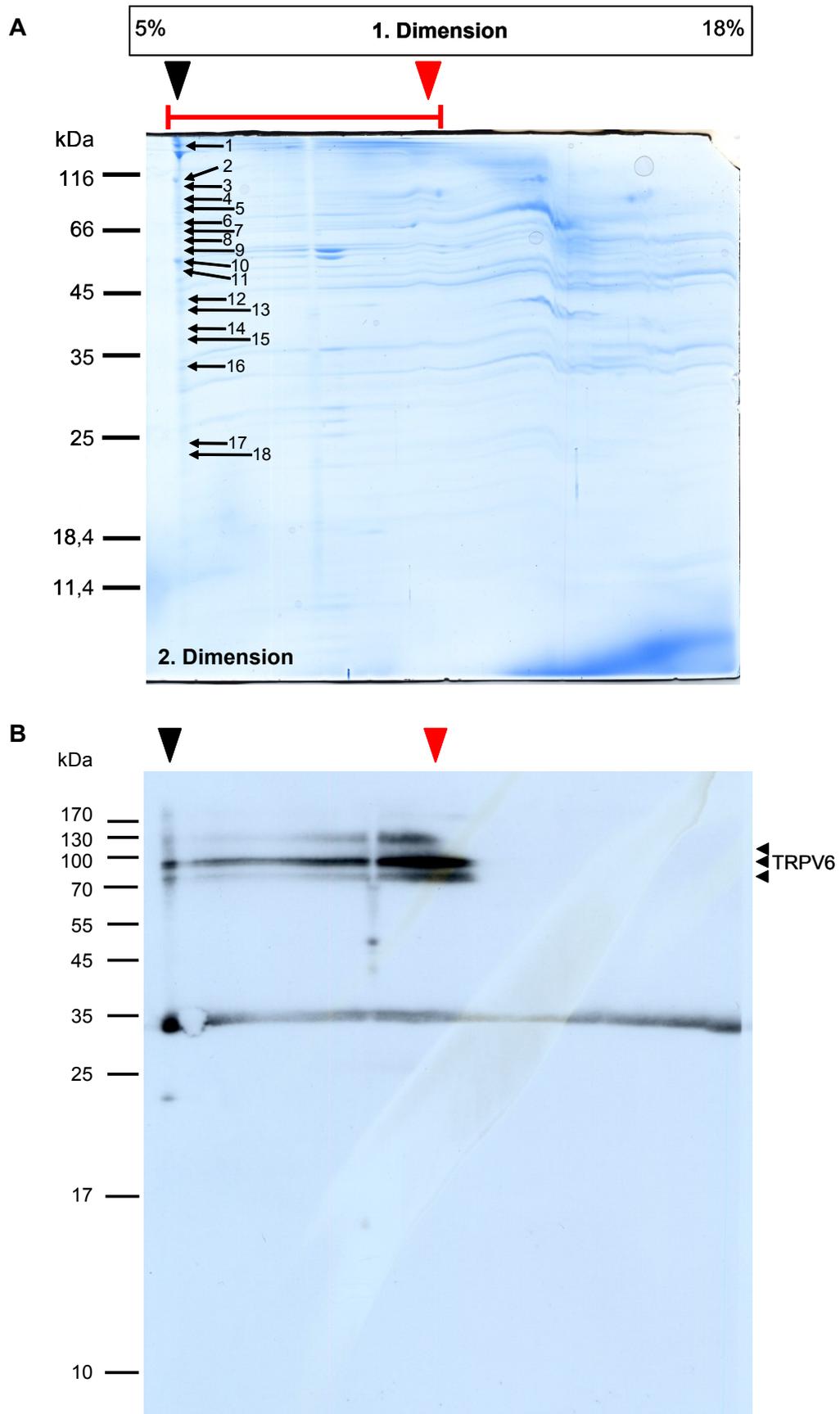


Abb. 43: Coomassie-gefärbte SDS-PAGE-Gel (A) und Western Blot (B) der 2. Dimension der Blue Native PAGE (nach Digitonin-Solubilisierung und Antikörper-Affinitätschromatographie). A: Man erkennt im „Blue Silver“-gefärbten SDS-Gel der 2. Dimension einen vertikalen Streifen auf Höhe von 5% Polyacrylamidkonzentration (schwarzer Pfeil) der 1. Dimension. Die enthaltenen Proteine können zu einem Proteinkomplex gehören. Im Bereich des TRPV6-Signals (rote Linie) des dazugehörigen

Western Blots (B) werden nur Proteine im Bereich des linken vertikalen Streifens sichtbar angefärbt. Auch im Bereich des stärksten TRPV6-Signals im Western Blot (B, roter Pfeil) sind im SDS-Gel keine Proteine auf Höhe von TRPV6 angefärbt (roter Pfeil). B: TRPV6 (1. AK: 26B3) wird im Bereich zwischen ca. 5% und 13% der 1. Dimension detektiert (zwischen schwarzem und roten Pfeil). Das Signal ist dabei im Bereich des schwarzen Pfeils etwas stärker wird anschließend schwächer bevor es die höchste Signalstärke im Bereich des roten Pfeils erreicht. Die Signale liegen durchgehend als Doppelbande vor. Teilweise sind auch Di- und Multimer-Signale zu erkennen. Das Signal im Bereich des schwarzen Pfeils stimmt mit dem vertikalen Streifen des SDS-Gels überein (Abb. 43 A, schwarzer Pfeil).

Die mittels MALDI-Massenspektrometrie signifikant identifizierten Proteine sind in Tabelle 23 aufgelistet.

Tabelle 23: Liste der signifikant mittels MALDI-ToF-MS identifizierten Proteine der jeweiligen in Abb. 43 A nummerierten Spots. Die ausführliche Liste befindet sich im Anhang (7.1,

Tabelle 25).

Spot	Accession-Nr.	MW [Da]	Score	Protein
1	gi 186629	39834	74	Keratin 10
2	gi 8569502	23766	68	Chain A, Fc Fragment Of Human IgG1
3	gi 6005942	89962	145	Valosin-containing protein [Homo sapiens]
4	gi 6005942	89962	315	Valosin-containing protein [Homo sapiens]
5	gi 68563322	70108	130	EPB42 protein [Homo sapiens] = erythrocyte membrane protein band 4.2
6	gi 194385794	49080	102	Mitochondrial trifunctional protein [Homo sapiens]
7	gi 166362737	77831	110	Erythrocyte membrane protein band 4.2 isoform 2 [Homo sapiens]
8	gi 31645	36205	125	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Homo sapiens]
9	gi 551547	25951	89	Prosome beta-subunit; HSBpros26 [Homo sapiens]
10	gi 20147503	411935	131	Laminin alpha5 chain precursor [Homo sapiens]
11	gi 126366	205178	105	Laminin subunit beta-1 [Homo sapiens]
12	gi 194385772	116680	68	2-oxoglutarate dehydrogenase
13	gi 9857753	36585	78	Recombinant IgG1 heavy chain [Homo sapiens]
14	gi 41388180	65126	98	Monoclonal IgM antibody heavy chain [Homo sapiens]
15	gi 20127408	83688	116	Mitochondrial trifunctional protein, alpha subunit precursor [Homo sapiens]
16	gi 119610656	62941	104	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain, isoform CRA_e [Homo sapiens]
17	gi 499719	49000	86	Mitochondrial dihydroliipoamide succinyltransferase [Homo sapiens]
18	gi 194376310	38950	95	Actin, beta [Homo sapiens]

Die Ergebnisse zeigen, dass die Anreicherung und Auftrennung der TRPV6-Proteine und daran assoziierter Proteine mittels zweidimensionaler Blue Native-Gelelektrophorese auch nach Solubilisierung mit Digitonin möglich ist. Allerdings ist auch hier die Menge des TRPV6-Proteins nach der BN-PAGE so gering, dass das Protein zwar mittels Antikörper, nicht aber durch MALDI-Massenspektrometrie detektiert werden kann.

Um eine größere Ausbeute an TRPV6-Protein zu erhalten wird ein abschließender Versuch mit einem stärkeren nicht ionischen Detergenz durchgeführt. In diesem Falle wird TRPV6 mit Triton-X-100 aus der mikrosomalen Fraktion der Plazenta isoliert.

4.5.3. Anreicherung des TRPV6-Proteinkomplexes nach Triton-X-100-Solubilisierung mittels Antikörper-Affinitätsreinigung und anschließende Blue Native-PAGE

Für die Affinitätschromatographie werden 500 mg mikrosomale Proteine mit Triton-X-100 (1 %)-Puffer solubilisiert. Nach der Reinigung über eine TRPV6-Antikörpersäule werden die konzentrierten Eluate anschließend in der Blue Native-PAGE aufgetrennt.

Das silbergefärbte SDS-Gel nach der 2. Dimension der BN-PAGE (Abb. 44 A) zeigt im Gegensatz zu den SDS-Gelen nach Solubilisierung mit DDM (Abb. 42 A) und Digitonin (Abb. 43 A) nur eine sehr geringe Proteinfärbung. Nach Inkubation mit einem TRPV6-spezifischen Antikörper zeigen sich lediglich sehr schwache Signale in Form einer Doppelbande auf Höhe von 5 % der 1. Dimension (Abb. 44 B, schwarzer Pfeil). Im SDS-Gel wird in diesem Bereich (Abb. 44 A, schwarzer Pfeil) auf der TRPV6-Höhe kein Protein angefärbt. Andere Bereiche der Western Blot-Membran enthalten keine TRPV6-Signale.

Auf Grund der sehr gering gereinigten Proteinmengen bzw. der schwachen Detektion des TRPV6-Proteins im Western Blot wird auf die massenspektrometrische Analyse der Proteinspots verzichtet.

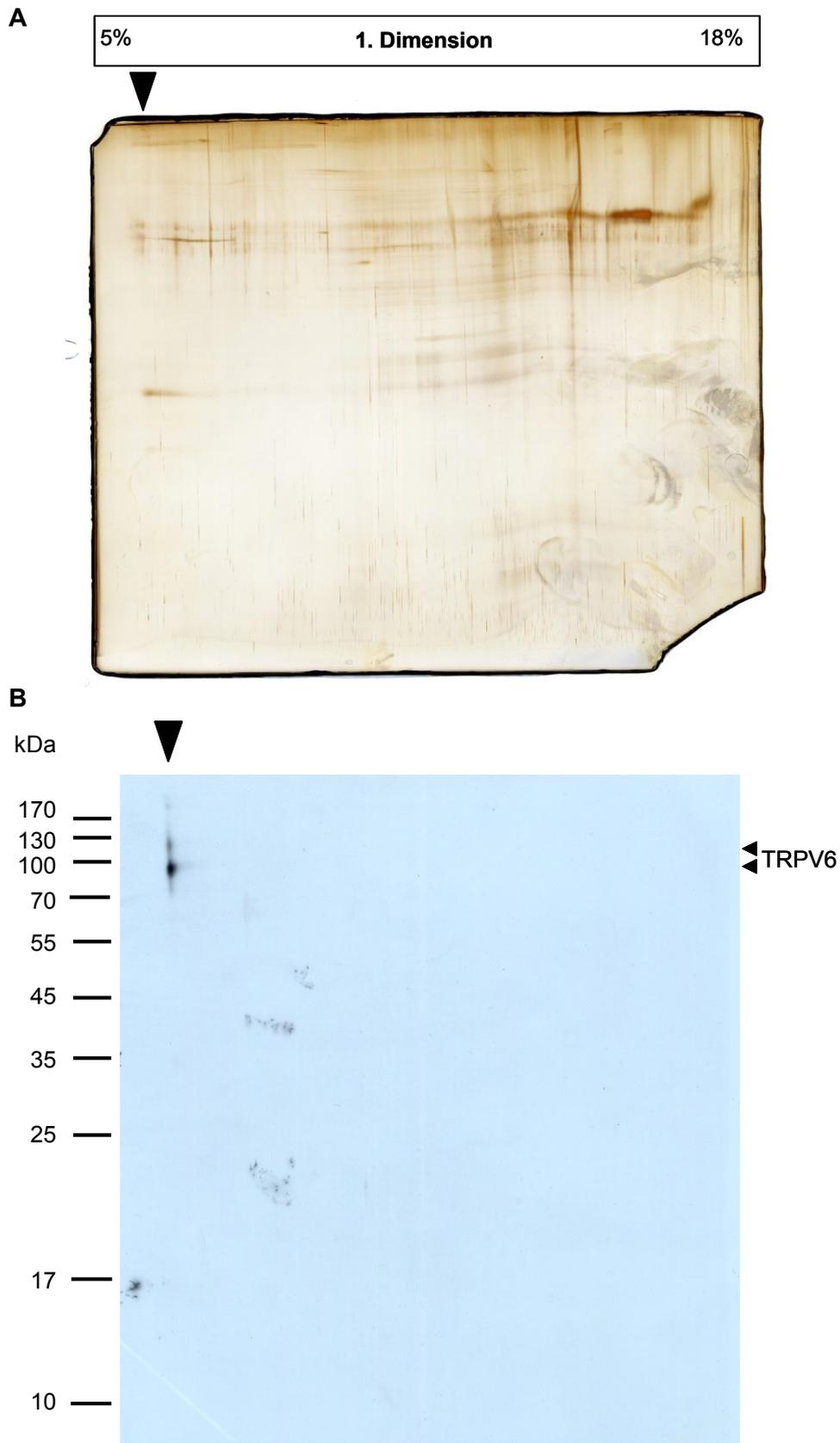


Abb. 44: Silbergefärbtes SDS-PAGE-Gel (A) und Western Blot (B) der 2. Dimension der Blue Native PAGE (nach Triton-X-100-Solubilisierung und Antikörper-Affinitätschromatographie). A: Im silbergefärbten Gel erkennt man kaum angefärbte Proteine. Im Bereich des schwachen TRPV6-Signals des Western Blots (B) sind keine gefärbten Proteine auf Höhe von TRPV6 zu finden (schwarzer Pfeil). B: TRPV6 (AK: 26B3) wird nur schwach als Doppelbande am linken Rand detektiert (schwarzer Pfeil). Dies entspricht der Konzentration von 5% in der 1. Dimension.

4.6. Nachweis und Anreicherung des TRPC6-Proteins in murinen Mastzellen und murinem Lungengewebe

Die bisherigen Ergebnisse der einstufigen Antikörper-Affinitätschromatographie und der SDS- bzw. Blue Native-PAGE haben gezeigt, dass die Kombination von Dodecyl- β -D-maltosid und dem verwendeten Extraktionspuffer (siehe 3.2.7.2) sehr gut geeignet ist, um integrale TRPV6-Membranproteine und daran assoziierte Proteine zu solubilisieren und mittels Antikörper-Affinitätschromatographie zu isolieren. Diese Vorgehensweise soll nun auf ihre Übertragbarkeit zur Isolierung anderer Membranproteinkomplexe getestet werden. Außerdem soll überprüft werden, ob eine Isolierung des Proteins auch mit kleiner dimensionierten Säulen (Bettvolumen: 100-150 μ l) durchführbar ist. Dazu wird mit dem TRPC6-Kanalprotein ein weiterer Vertreter der TRP-Proteinfamilie ausgewählt, der u.a. bereits in Mastzellen und Lungengewebe exprimiert und mittels spezifischer Antikörper detektiert wurde. Für die Isolation aus beiden Gewebetypen, werden zuerst Immunpräzipitationen und anschließend Affinitätschromatographien mit Antikörpersäulen mit geringerem Bettvolumen durchgeführt.

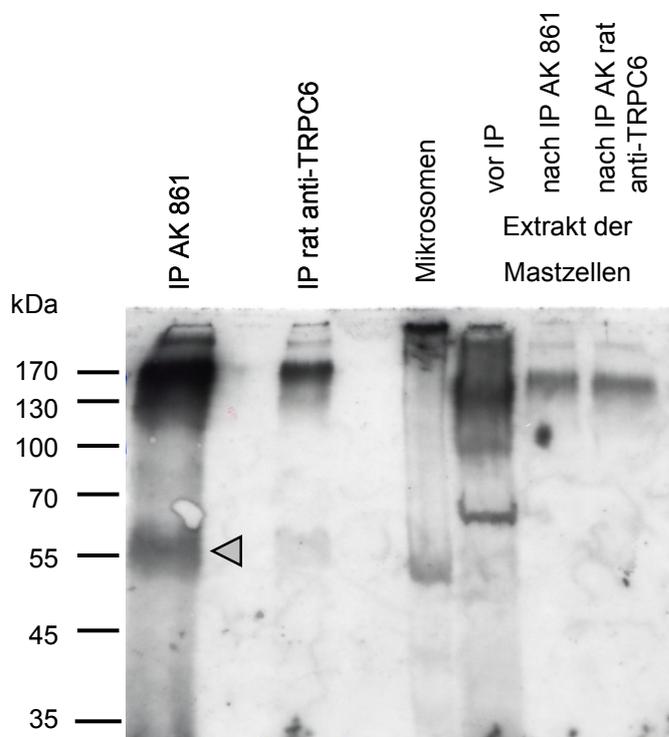
4.6.1. Immunpräzipitation von TRPC6 aus Mastzellen

Der mit DDM hergestellte Extrakt aus Mastzellen wird zur Immunpräzipitation mit TRPC6-Antikörper-gekoppelter Protein A- bzw. L-Agarose isoliert. Als Antikörper dienen dazu gereinigter Kaninchen 861-Antikörper (\rightarrow Protein A-Agarose) und ein monoklonaler TRPC6-Antikörper-enthaltender Rattenhybridomaüberstand (\rightarrow Protein L-Agarose). Die danach an die Chromatographiematrix gebundenen Proteine werden mit 2x Laemmli-Puffer eluiert, denaturiert und im SDS-Gel aufgetrennt. Im anschließenden Western Blot werden die TRPC6-Proteine detektiert.

Mit den zur Verfügung gestellten TRPC6-Antikörpern (AG Prof. Flockerzi, Pharmakologie, Universität des Saarlandes) lässt sich ein Protein (MW \sim 170 kDa) aus einem Proteinextrakt, der aus Mastzellen hergestellt wurde, immunpräzipitieren und im Western Blot mit TRPC6-Antikörpern detektieren. Das Signal von TRPC6 liegt über seinem berechneten Molekulargewicht von 106 kDa (Pedersen et al., 2005). Zu diesem schlechteren Laufverhalten im Proteingel können u.a. Proteinmodifikationen, wie Glykosylierungen beitragen (Rehm, 2006). TRPC6 besitzt zwei Glykosylierungsstellen (Dietrich et al., 2003; Dietrich und Gudermann, 2007), sodass dieser Effekt ähnlich wie dem zu TRPV6 (Hirnet et al., 2003) sein könnte. Da nur eine Bande in den Western Blots erkennbar ist, müsste das TRPC6-Protein in diesem Falle nur in einer Glykosylierungsform in den getesteten Geweben vorliegen.

Sowohl die IP mit polyklonalem TRPC6-Antikörper 861 als auch mit dem monoklonalen anti-TRPC6-Rattenhybridomaüberstand zeigt ein deutliches Signal für TRPC6, welches sich auch im Ausgangsmaterial, dem Extrakt aus Mastzellen befindet (Abb. 45). Mikrosomale Proteine der humanen Plazenta wurden ebenfalls aufgetragen, um das Vorkommen von TRPC6 in diesem Gewebe zu kontrollieren. In dieser Spur wird zwar ein Protein detektiert, allerdings bei einer Größe von mehr als 200 kDa, welches somit weit über der von TRPC6 liegt (theoretische Größe von TRPC6: 107 kDa). Auf dieser Höhe ist in keiner Probe ein Signal zu sehen, was möglicherweise auf posttranslationale Modifikationen zurückzuführen ist.

Der Extrakt der Mastzellen zeigt nach den Immunpräzipitationen mit den TRPC6-Antikörpern in beiden Ansätzen noch Signale für TRPC6. Diese Signale nach der IP sind allerdings schwächer als davor und deuten auf eine Sättigung des Immunpräzipitationsmaterials hin.



Dies bedeutet, dass die eingesetzte Menge an Antikörper in der IP nicht ausreicht, um alle TRPC6-Proteine des Extrakts immunpräzipitieren zu können.

Diese Versuche zeigen, dass mit den vorhandenen TRPC6-Antikörpern eine Anreicherung von TRPC6 aus Mastzellen möglich ist. Dies soll nun auch in einer Affinitätschromatographie überprüft werden, bei der die Antikörper (AK 861) bzw. die Antikörper aus dem Ratten-Hybridomaüberstand an NHS-Agarose kovalent gekoppelt werden.

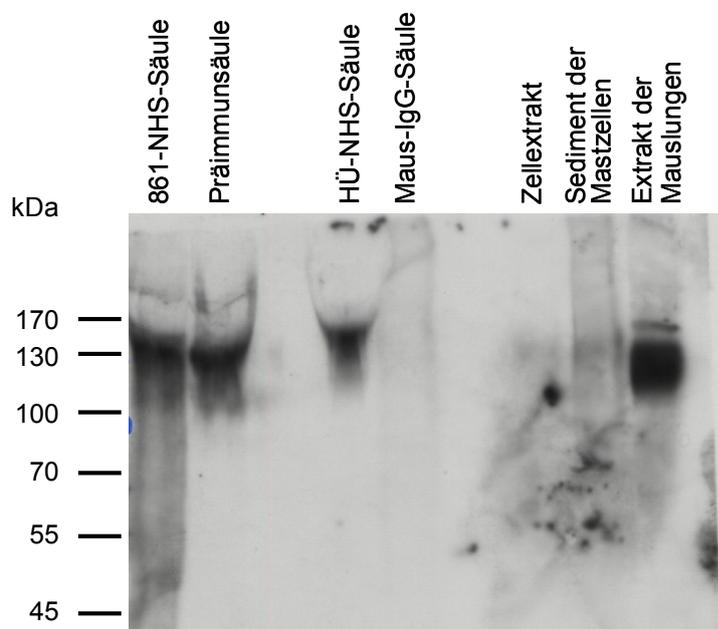
Abb. 45: Western Blot der Immunpräzipitation von TRPC6 aus dem Extrakt aus Mastzellen. Das TRPC6-Protein wird in beiden Immunpräzipitationen (IP) auf einer Höhe von ca. 160 kDa detektiert (AK: 861), ebenso wie in dem Extrakt der Mastzellen vor und nach der IP (schwarzer Pfeil). Das Signal ist nach der IP allerdings schwächer als davor. Die Mikrosomen der humanen Plazenta zeigen kein TRPC6-Signal auf der entsprechenden Höhe. Der Sekundärantikörper des Western Blots (anti-Kaninchen HRPO) erkennt auch die Kaninchenantikörper, die zur Immunpräzipitation verwendet wurden (grauer Pfeil).

4.6.2. Antikörper-Affinitätschromatographie des TRPC6-Proteins aus Mastzellen

Das TRPC6-Kanalprotein soll im Folgenden mithilfe von kovalent gekoppelten TRPC6-Antikörpersäulen aus einem Extrakt von Mastzellen isoliert werden. Der TRPC6-Antikörper 861 und der TRPC6-Antikörper-enthaltende Rattenhybridomaüberstand (HÜ) werden an NHS-Agarose gekoppelt. Zusätzlich werden als Negativkontrollen die in der Arbeitsgruppe bereits vorhandenen Säulen mit gekoppeltem Präimmuserum und Immunglobulinen aus der Maus verwendet. Das Bettvolumen pro Säule beträgt 150 μ l.

Nach der Inkubation des Extrakts der Mastzellen mit den Säulen, werden die Proteine mit 2x Laemmli-Puffer ohne β -Mercaptoethanol von der Säule eluiert. Dadurch werden die Antikörper zwar denaturiert, die Disulfidbrücken zwischen den schweren und leichten Ketten bleiben aber bestehen. Die Probe wird dadurch nicht mit einzelnen schweren und leichten Antikörperketten verunreinigt. Die Reduktion der eluierten Proteine erfolgt im Anschluss an die denaturierende Elution durch Zugabe von DDT.

Im Western Blot ist TRPC6 sowohl in den Eluaten der Affinitätschromatographien mit TRPC6-spezifischen Antikörpern (861 und Hybridomaüberstand), als auch im Ansatz, bei dem die Säule mit Kaninchen-Präimmuserum gekoppelt wurde, nachweisbar (Abb. 46, Pfeil). Im



Sediment (vor der Solubilisierung) und dem Extrakt der Mastzellen ist das TRPC6-Signal sehr schwach. Der Extrakt der Mauslungen, der analog mit DDM und dem gleichen Extraktionspuffer hergestellt wurde, wurde als zusätzliche Positivkontrolle und zur Überprüfung des TRPC6-Proteingehalts des Mauslungengewebes aufgetragen und zeigt ein sehr starkes TRPC6-Signal.

Abb. 46: Western Blot der Affinitätschromatographie von TRPC6 aus dem Extrakt der Mastzellen. Das TRPC6-Protein wird in den Proben mit TRPC6-Antikörper und in der Probe der Negativkontrolle mit der Präimmunsäule detektiert (Pfeil, AK: 861). Die Probe der Maus-IgG-Säule enthält kein TRPC6. Die als Kontrolle aufgetragenen Proben des Extrakts und des Sediment der Mastzellen enthalten ein schwaches TRPC6-Signal, die Kontrolle aus dem Extrakt der Mauslung (75 μ g) zeigt dagegen ein starkes Signal für TRPC6.

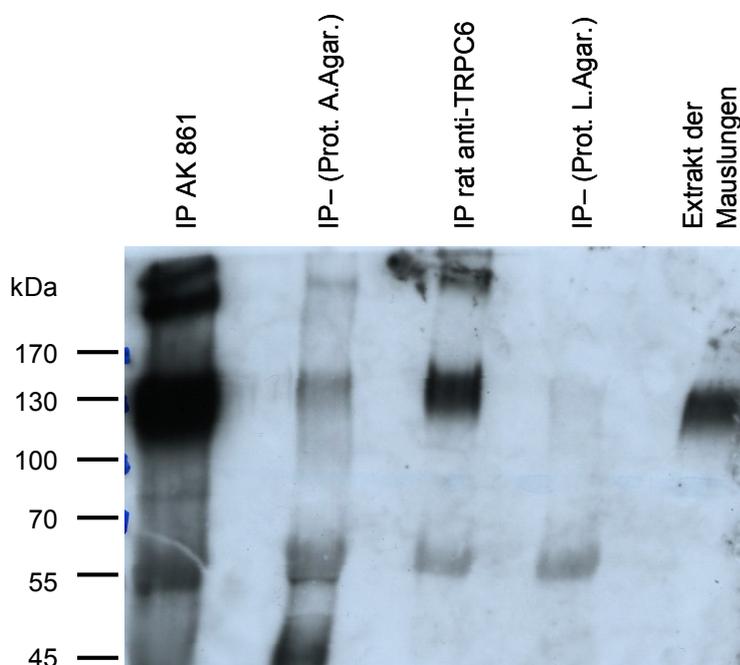
Die Anreicherung des TRPC6-Proteins ist auch unter Verwendung eines geringen Bettvolumens der antikörper-gekoppelten Matrix möglich. Allerdings scheint das Protein auch unspezifisch an die Präimmunsäule zu binden. Aus diesem Grund kommt nur die Maus-IgG-Säule als Kontrollsäule in Frage.

Das Mauslungengewebe hat offensichtlich einen hohen TRPC6-Proteingehalt. Im Folgenden werden nun Immunpräzipitationen und Antikörper-Affinitätschromatographien zur Anreicherung des TRPC6-Proteins mit einem Proteinextrakt des Mauslungengewebes durchgeführt.

4.6.3. Immunpräzipitation des TRPC6-Proteins aus Mauslunge

Eine TRPC6-Immunpräzipitation wird analog zum Versuch in 4.6.1 mit einem Proteinextrakt aus zwei Mauslungen durchgeführt. Zusätzlich werden ungekoppelte Protein A- und L-Agarose als Negativkontrolle mit dem Extrakt inkubiert. Die gebundenen Proteine werden nach Elution und Denaturierung in der SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot detektiert.

Der Western Blot zeigt starke Banden im Extrakt und in den Ansätzen mit Antikörper (Abb. 47, schwarzer Pfeil). In den Ansätzen ohne Antikörper enthält die Negativkontrolle der Protein A-Agarose eine sehr geringe Menge des TRPC6-Proteins, die Negativkontrolle der Protein L-Agarose ist frei von TRPC6. Außerdem werden die schweren Ketten des für die



Immunpräzipitation verwendeten Antikörpers auf Höhe von 55 kDa detektiert (Abb. 47, grauer Pfeil). In der Probe IP AK861 wurde ein Kaninchenantikörper verwendet. In den anderen drei Proben scheinen Immunglobuline aus der Mauslunge unspezifisch an die Matrix zu binden. Der im Western Blot verwendete Zweitantikörper detektiert Kaninchen-IgGs, besitzt aber auch eine Kreuzreaktivität für Immunglobuline der Maus.

Abb. 47: Western Blot der Immunpräzipitationen von TRPC6 aus Mauslunge. TRPC6 wird in den IPs mit TRPC6-Antikörper, ebenso wie im Extrakt der Mauslungen (5 µl) sehr stark detektiert (schwarzer Pfeil, AK: 861). Rechts von der IP mit Antikörper befindet sich jeweils die entsprechende Negativkontrolle ohne Antikörper. Zusätzlich werden in den IP-Proben schwere Antikörperketten (55 kDa, grauer Pfeil) detektiert.

Dieses Ergebnis spricht dafür, dass sich das TRPC6-Protein ebenfalls gut aus dem Extrakt der Mauslungen anreichern lässt. Die gewonnene Menge des TRPC6-Proteins übersteigt dabei die der Immunpräzipitation aus dem Extrakt der Mastzellen (siehe 4.6.1).

In einem weiteren Immunpräzipitationsversuch wird untersucht, mit welcher Methode am meisten TRPC6-Protein von der Antikörpersäule eluiert werden kann. Dazu werden die an die Säule mit Antikörpern aus Rattenhybridomaüberstand gebundenen Proteine nacheinander mit Peptidlösung, 2 mM Natriumthiocyanat und 2x Laemmli-Puffer eluiert. Nach Denaturierung aller Proben werden sie im Western Blot auf TRPC6 überprüft (Abb. 48). Hier zeigt sich das stärkste TRPC6-Signal bei der Elution mit 2x Laemmli-Puffer. Schwächer ist das Signal bei der Elution mit Thiocyanat und nur schwach ist das Signal bei der Elution mit dem antikörperspezifischen Peptid (Abb. 48, schwarzer Pfeil). In der Negativkontrolle wird ebenfalls kein TRPC6-Protein detektiert. Auch hier sind die unspezifischen Antikörpersignale bei 55 kDa

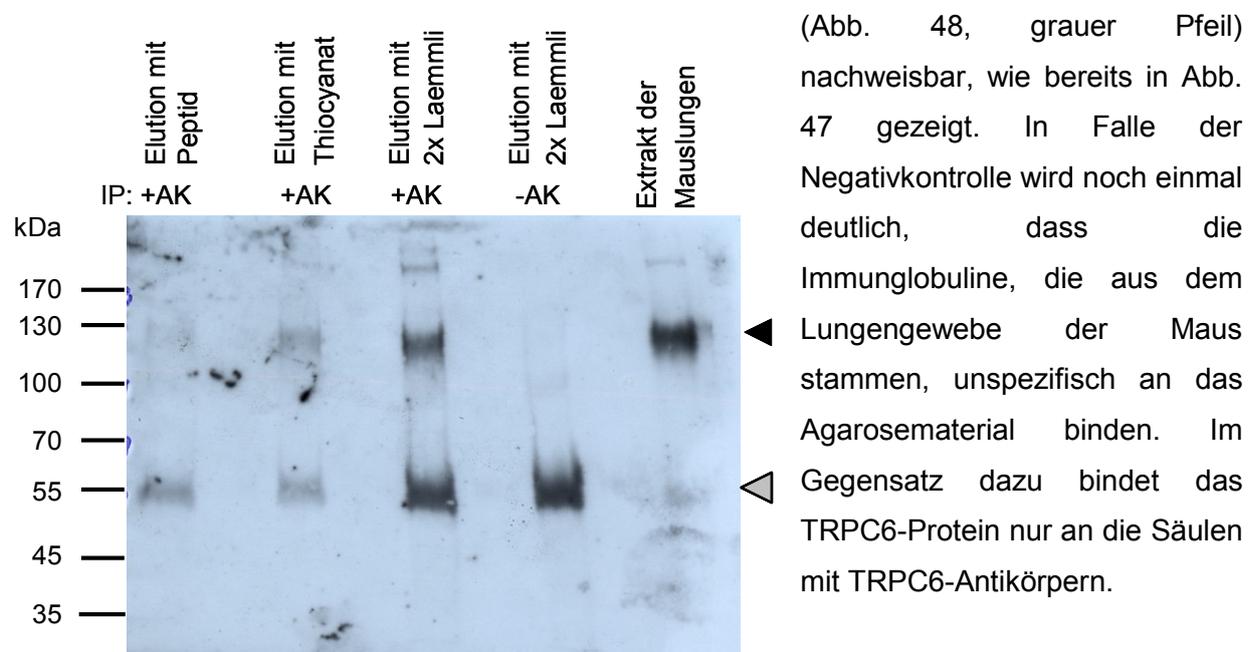


Abb. 48: Western Blot zum Vergleich verschiedener Elutionsverfahren von TRPC6 nach der Immunpräzipitation aus Extrakt von Mauslungen. TRPC6 (schwarzer Pfeil) wird bei den Immunpräzipitationen (IP) mit TRPC6-Antikörpern aus Rattenhybridomaüberstand (+AK) am stärksten nach der Elution mit Laemmli-Puffer detektiert (AK: 861). Ein schwaches TRPC6-Signal erscheint nach der Elution mit 2 mM Natriumthiocyanat. Mit Peptidlösung wird kaum TRPC6 eluiert. In der Kontrolle ohne Antikörper (-AK) kann kein TRPC6 detektiert werden. Als Positivkontrolle dient der Extrakt aus Mauslungen (5 µl). Außerdem werden schwere Antikörperketten (55 kDa, grauer Pfeil) detektiert.

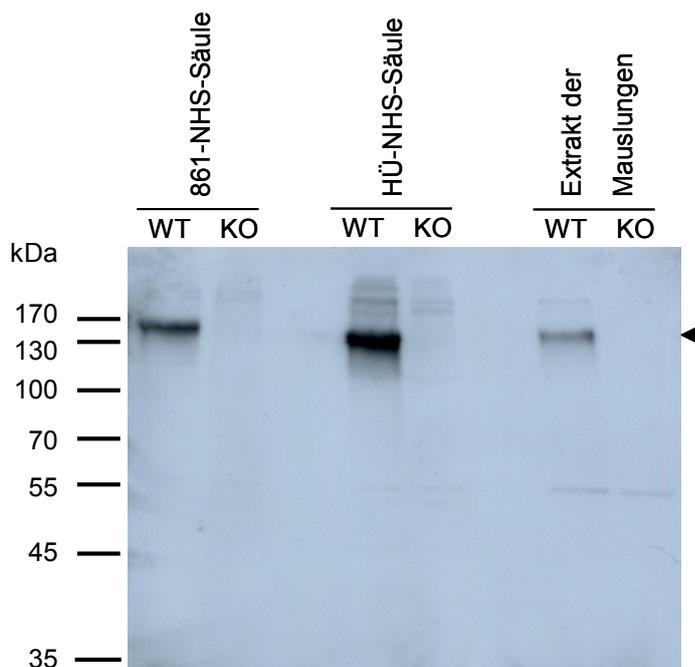
Eine Elution der Proteine vom TRPC6-Antikörper des Hybridomaüberstands ist mittels Peptidlösung überhaupt nicht und mit Thiocyanatlösung nur bedingt möglich. Der Antikörper scheint mit hoher Affinität an das Epitop zu binden, sodass die Bindung nur schwer zu lösen ist. Die Elution des Proteins ist nur unter den denaturierenden Bedingungen des Laemmli-Puffers möglich. Aus diesem Grund kann im Anschluss keine native Gelelektrophorese (Blue Native-PAGE) durchgeführt werden, um die Zusammensetzung des TRPC6-Komplexes zu untersuchen.

In den folgenden Versuchen werden daher die Proteine von der Antikörpersäule mit Laemmli-Puffer eluiert.

Neben den bisher verwendeten Wildtypmäusen wurden uns von der Arbeitsgruppe von Prof. Flockerzi (Pharmakologie, Universität des Saarlandes) Mäuse zur Verfügung gestellt, die kein TRPC6-Protein exprimieren, so genannte Knockout-Mäuse (TRPC6-KO-Mäuse), die als Negativkontrolle dienen. Aus Lungen von WT und TRPC6-/- Tieren werden nun Affinitätschromatographien mit TRPC6-Antikörper gekoppelten Säulen durchgeführt.

4.6.4. Affinitätschromatographie aus muriner Lunge von Wildtyp- und TRPC6-KnockOut-Mäusen

Zur Isolierung des TRPC6-Kanals aus Wildtyp- (WT) und Knockout-Mäusen (KO) mittels Affinitätschromatographie werden die beiden in 4.6.2 genannten anti-TRPC6-NHS-Säulen mit 150 µl Bettvolumen zur Inkubation mit den beiden Extrakten aus Mauslungen verwendet. Nach



Elution und Denaturierung der gebundenen Proteine erfolgt die Detektion des TRPC6-Proteins mittels Antikörpern im Western Blot. Hier kann das TRPC6-Protein in den Wildtyp-Geweben nach beiden Antikörper-Affinitätschromatographien und auch im Extrakt des Gewebes detektiert werden (Abb. 49, schwarzer Pfeil). In den Ansätzen, bei denen die Gewebe der Knockout-Tiere verwendet wurden, sind wie erwartet keine Signale für das TRPC6-Protein detektierbar.

Abb. 49: Western Blot der Affinitätschromatographie von TRPC6 aus Extrakt von Mastzellen von Wildtyp- und TRPC6-Knockout-Mäusen. TRPC6 (AK: 861) wird in allen Ansätzen mit Extrakt von Lungen von Wildtypmäusen (WT) detektiert. Die Ansätze mit Extrakt von Lungen von Knockout-Mäusen (KO) enthalten keine detektierbare Menge an TRPC6.

Daraus lässt sich schließen, dass die Antikörper-Affinitätschromatographie auch unter Verwendung geringer Mengen Antikörpersäule (150 µl = ~150 µg AK) möglich ist.

Mit verschiedenen Proben von TRPC6-Immünpräzipitationen und –Antikörper-Affinitätschromatographien wurden nach ihrer Auftrennung im SDS-Gel und Anfärben der Proteine mit „Blue-Silver“-Lösung auch massenspektrometrische Analysen der Proteinbanden im MW-Bereich von TRPC6 mittels ESI-MS durchgeführt. Die Detektion von TRPC6 war beim

ersten Versuch allerdings negativ. Die Ursache liegt vermutlich in einer zu geringen Sensitivität des ESI-Massenspektrometers bzw. technischen Problemen. Aus zeitlichen Gründen konnte der Versuch jedoch nicht noch einmal wiederholt werden.

5. Diskussion

Das integrale Membranprotein TRPV6 wird in Darm, Plazenta, Pankreas und Speicheldrüse exprimiert und ist dort vermutlich an der Kalziumhomöostase beteiligt. Ebenso konnte eine Beteiligung des TRPV6-Proteins an verschiedenen Krebserkrankungen gezeigt werden (Wissenbach et al., 2001; Zhuang et al., 2002; Nilius et al., 2005; Bolanz et al., 2008). Neuere Untersuchungen belegen sogar das Vorkommen von TRPV6 auf mRNA- und Proteinebene in den Pigmentepithelzellen des Auges, in denen der Kanal vermutlich den Kalziumeinstrom aus dem subretinalen Raum reguliert (Kennedy et al., 2010). Bis dato ist wenig über die Funktion des TRPV6-Proteins und seiner Interaktionspartner bekannt bzw. sind noch nicht alle Einzelheiten der Regulationsmechanismen aufgeklärt.

Die vorliegende Doktorarbeit teilt sich in drei Teilprojekte. Zu Beginn soll die durch meine Diplomarbeit postulierte TRPV6-Cyclophilin B-Interaktion bestätigt und die Interaktion zusätzlich durch Einengen der Bindestellen näher charakterisiert werden. Anschließend soll die bisher bestehende mehrstufige TRPV6-Affinitätschromatographie durch eine einstufige Affinitätschromatographie ersetzt werden, sodass auch Ca^{2+} -abhängige Proteinbindungen erhalten bleiben. Die dadurch isolierten TRPV6-enthaltenden Proteinkomplexe sollen in einer Blue Native-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Proteine massenspektrometrisch analysiert werden. Im dritten Teilprojekt wurde untersucht, inwiefern die für das TRPV6 Protein etablierte Methode auf andere endogen exprimierte TRP-Kanalproteine übertragbar ist.

Die Ergebnisse der mehrstufigen Affinitätschromatographie mit anschließender massenspektrometrischer Analyse der gewonnenen Proteine (Stumpf et al., 2008) zeigen, dass diese Methode es ermöglicht, das niedrig exprimierte TRPV6-Kanalproteine mit Hilfe einer kombinierten Calmodulin- und TRPV6-Antikörper-Säulenaffinitätschromatographie aus humanem Plazentagewebe zu isolieren. Neben dem immunologischen Nachweis des TRPV6-Proteins mit TRPV6-spezifischen Antikörpern, wird das Protein auch massenspektrometrisch mit Hilfe von PMF- und LIFT-Spektren aus Proteinbanden der dazugehörigen SDS-Gele nachgewiesen (Abb. 14). Zusätzlich werden die Proteine Cyclophilin B und Annexin A2 als potentielle Interaktionspartner durch PMF-Spektren detektiert (Abb. 14).

TRPV6 und CyPB kommen teilweise in den gleichen Eluaten der CaM-Säule vor (Abb. 13). Dies lässt darauf schließen, dass zumindest ein Teil des CyPBs mit einem Teil des TRPV6 interagiert. Dabei scheint TRPV6 der limitierende Faktor der Assoziation zu sein (Stumpf et al., 2008). CyPB kommt in wesentlich höheren Konzentrationen als TRPV6 vor und nur ein geringer Teil davon scheint mit TRPV6 zu interagieren. Anscheinend existieren weitere CyPB-

assoziierte Proteine, die an die CaM-Säule binden können, da eine kalziumabhängige Bindung von Cyclophilin B an Calmodulin bisher noch nicht beobachtet wurde.

Das Cyclophilin B-Protein (Synonyme: Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B (PPIase B), Rotamase, S-cyclophilin (SCYLP) und CYP-S1) ist ein multifunktionales Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 20 kDa. Das humane CyPB-Protein wurde 1991 erstmals in zwei Veröffentlichungen als ER-ständiges Protein (Price et al., 1991) und als in Milch sekretiertes Protein (Spik et al., 1991) beschrieben. Für die Lokalisation im ER ist eine 33 Aminosäuren lange ER-Retentionssequenz verantwortlich, um die das sekretierte Protein verkürzt ist (Arber et al., 1992). Im ER beschleunigt das Enzym die Faltung von Proteinen an der Aminosäure Prolin auf Grund seiner Peptidyl-prolyl-cis-trans-Isomerase-(PPIase)-Aktivität (Galat, 2003). Zusätzlich unterstützt Cyclophilin B die korrekte Integrierung von Membranproteinen in die Plasmamembran, induziert im Zellkern Transskriptionsschritte (Rycyzyn und Clevenger, 2002) und sorgt, sekretiert in die Blutgefäße, für die Chemotaxis und Adhäsion von T-Zellen an die extrazelluläre Matrix (Bukrinsky, 2002; Allain et al., 2002). Neben dem Abspalten der ER-Sequenz führt auch der immunsuppressive Wirkstoff Cyclosporin A zur Freigabe von Cyclophilin B aus dem ER (Price et al., 1994). Die Cyclosporin A-Affinität ist namensgebend für die Familie der Cyclophiline (Siekierka et al., 1989; Rahfeld et al., 1994; Galat, 2003). Cyclophilin A (CyPA), das eine 64%ige Homologie zu CyPB besitzt, wurde 1984 entdeckt (Handschumacher et al., 1984). Bei beiden Proteinen handelt es sich um eine Peptidyl-prolyl-cis-trans-Isomerase (Fischer et al., 1984; Fischer et al., 1989; Takahashi et al., 1989). Die Cyclophiline werden mit zwei anderen Familien Immunsuppressiva-bindender Proteine zu den Immunophilinen zusammengefasst. Diese sind die FK506 (Tacrolimus)-bindenden Proteine (FKBPs) und die Parvuline (Wang und Heitman, 2005). Die Bindung der immunsuppressiven Wirkstoffe führt zur Aufhebung der Peptidyl-prolyl-cis-trans-Isomerase-Aktivität.

Neben CyPB wurde in allen Positivkontrollen das Protein Annexin A2 gemeinsam mit dem TRPV6-Protein identifiziert. Annexin A2 ist bereits als Interaktionspartner von TRPV6 bekannt (van de Graaf et al., 2003; Borthwick et al., 2008) (siehe auch Tabelle 2). Zusammen mit S100A10 (Synonyme: p11, Calpactin I light chain, Annexin II light chain) bildet es ein Heterotetramer, das den TRPV6-Proteinkomplex zur Stabilisierung mit dem Zytoskelett verbindet. S100A10 bindet dabei an die c-terminale Sequenz VATTV des TRPV6 und an den N-Terminus von Annexin A2. Der so gebildete Komplex ist notwendig für den Kanaltransport zur Plasmamembran und die Funktionalität des Kanals. Die Expression von S100A10 und Annexin A2 ist, wie die von TRPV6, Vitamin D-abhängig (van de Graaf et al., 2003).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass es mit der im Rahmen meiner Arbeit etablierten Vorgehensweise möglich ist, neben dem Ionenkanal, daran assoziierte Proteine zu isolieren, deren Funktion im Zusammenhang mit der Funktionsweise des Ionenkanals bisher nicht bekannt ist. Denkbar wäre, dass diese Proteine, z.B. das CyPB, zur Stabilisierung des

TRPV6 Proteins, dessen Transport oder Einbau in die Plasmamembran notwendig sind bzw. diese Proteine den Ionenkanal in seinem Öffnungs- und Schließverhalten beeinflussen.

5.1. Nachweis und Charakterisierung der TRPV6 – Cyclophilin B-Interaktion

Die bereits aus Ergebnissen meiner Diplomarbeit abgeleitete Hypothese einer Interaktion zwischen den Proteinen TRPV6 und Cyclophilin B sollte mit Hilfe weiterer biochemischer Methoden, wie Coimmunpräzipitation, Dichtegradientenzentrifugation und GST-Pulldown-Analysen weiter untersucht werden.

5.1.1. Die Cyclophilin B-TRPV6-Interaktion ist unter definierten Bedingungen nachweisbar

Die Interaktion von TRPV6 und Cyclophilin B kann mit Hilfe einer Coimmunpräzipitation aus dem Extrakt der mikrosomalen Fraktion humaner Plazenta bestätigt werden. Beide Proteine werden zusammen nach einer CoIP mit dem TRPV6 spezifischen Antikörper 429 Western Blot detektiert (Abb. 17). Zur Herstellung des Extrakts wurde der NaDox-Hepes-Puffer verwendet. Die Interaktion zwischen beiden Proteinen konnte kürzlich ebenfalls von der Arbeitsgruppe um M.A. Hediger bei Coimmunpräzipitationsversuchen aus Lysaten von TRPV6 und Cyclophilin B transfizierten Oozyten gezeigt werden (Bergeron et al., 2011).

Eine Interaktion zwischen TRPV6 und Cyclophilin B bildet sich dagegen nicht bei der Verwendung von *in vitro*-translatierten Proteinen aus (Abb. 15, Abb. 16). Das Cyclophilin B-Protein kann in keinem CoIP-Ansatz zusammen mit dem TRPV6-Protein isoliert und entsprechend detektiert werden (Abb. 16), wohingegen die Immunpräzipitation des *in vitro*-translatierten TRPV6-Proteins im gleichen Ansatz gelingt (Abb. 16, Spur 1 und 4).

Offensichtlich sind einige Faktoren zur Ausbildung und Aufrechterhaltung der Interaktion wichtig, die nur im Gewebe vorkommen, nicht aber in den Versuchsansätzen mit *in vitro*-translatierten Proteinen. Zum anderen ist der Nachweis der Interaktion nur unter Verwendung des NaDox-Hepes-Puffers positiv. Verwendet man einen Solubilisierungspuffers mit geringerer Stringenz (Bildl et al., 2004; Berkefeld et al., 2006), d.h. mit schwächeren Protein-Lösungseigenschaften in Anwesenheit (Abb. 19) und in Abwesenheit (Abb. 18) von Ca^{2+} so wird nur TRPV6 detektiert und somit die Interaktion nicht nachgewiesen. Dieser Solubilisierungspuffer beinhaltet u.a. neben dem Detergenz Dodecyl- β -D-maltosid (DDM) noch die Salze Natriumchlorid (NaCl) und Kaliumchlorid (KCl). Auch wenn der

Solubilisierungspuffer ein mildes nicht ionisches Detergenz (DDM) beinhaltet, scheint hier der höhere Salzgehalt des Solubilisierungspuffers, im Gegensatz zum NaDox-Hepes-Puffer, die mögliche Ursache für die Auflösung der TRPV6-CyPB-Bindung zu sein. Bei höheren Ionenkonzentrationen können Proteininteraktionen instabil bzw. gelöst werden (Adams et al., 2002). Die Salzionen führen dabei zu einer Schwächung der Proteinwechselwirkungen und können zusätzlich die Bindung durch Konformationsänderungen im Protein negativ beeinflussen.

Ionen können aber auch essentiell für Proteinwechselwirkungen sein, wie z.B. Ca^{2+} bei Calmodulin (Stevens, 1983; Lehninger et al., 2005). Weitere Faktoren, die für eine Interaktion zweier Proteine wichtig sein können, sind z.B. Proteinmodifikationen (z.B. Phosphorylierungen (Karp, 2009) und Hilfsproteine (z.B. Gerüstproteine wie INAD im TRP-Proteinkomplex (Phillips et al., 1992; Goel et al., 2001)). Im Fall von TRPV6 konnte bereits gezeigt werden, dass der Ionenkanal am N-Terminus glykosyliert wird und auch einem CaM/ Ca^{2+} /PKC-Rückkopplungsmechanismus unterliegt, der über die Phosphorylierung der CaM-Bindestelle am C-Terminus erfolgt (Niemeyer et al., 2001; Hirnet et al., 2003). Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass die Bindung *in vivo* bereits bei der Proteinsynthese im Endoplasmatischen Retikulum (ER) durch die Chaperonfunktion von Cyclophilin B (Price et al., 1994) geknüpft wird. Diese definierten Zellstrukturen und -kompartimente fehlen im „künstlichen“ *in vitro*-Translationsansatz, der unter Verwendung von Retikulozytenlysat durchgeführt wird.

Diese Resultate lassen vermuten, dass weitere Komponenten an der TRPV6-CyPB-Interaktion beteiligt sind. Diese konnten im Rahmen meiner Arbeit nicht identifiziert werden.

Die Ergebnisse der Coimmunpräzipitation zeigen, dass mit der Auswahl des NaDox-Hepes-Puffers und der Vorgehensweise bei der Extrakterstellung und der Immunpräzipitation Bedingungen gewählt wurden, bei denen die Interaktion zwischen dem TRPV6-Protein und dem Cyclophilin B-Protein bestehen bleibt. Hierbei ist neben einer ausreichenden Solubilisierung der Proteine aus der mikrosomalen Fraktion der Plazenta auch eine Bindung an den TRPV6-Antikörper erfolgt. Mindestens eine Bedingung scheint dabei der verwendete Solubilisierungspuffer mit schwächeren Protein-Lösungseigenschaften in diesem Ansatz nicht zu erfüllen, obwohl dieser Puffer zur Affinitätsreinigung eines Proteinkomplexes der Proteinkinase CK2 mit Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanälen, sog. SK Kanälen (Bildl et al., 2004), und eines Proteinkomplexes mit dem Kaliumkanal BKCa und dem Kalziumkanal Cav1.2 (Berkefeld et al., 2006) geeignet ist.

Meine Ergebnisse zeigen, dass die Solubilisierungsbedingungen, die zur Isolierung eines Membranproteinkomplexes geeignet sind, nicht zwangsläufig zur Isolierung von anderen Membranproteinen tauglich sind. Die Zusammensetzung solcher Multiproteinkomplexe ist sehr

stark von der Art des Detergenz, dem Protein-Seife-Verhältnis, dem Puffer, der Ionenstärke und der Anwesenheit von Ionen bzw. Kofaktoren abhängig.

5.1.2. Das TRPV6-Protein bildet Multimere

Bei Saccharosedichtegradientenzentrifugation verteilen sich Proteine gleicher Dichte und interagierende Proteine in einer ihrer gemeinsamen Dichte entsprechenden Fraktion (Richter, 2003). Hierzu werden die Membranproteine unter nichtdenaturierenden Bedingungen solubilisiert, so dass Proteinkomplexe erhalten bleiben und das Ausmaß der Sedimentation im Gradienten Hinweise auf die relative Größe des nativen Proteinkomplexes gibt. Im Falle einer Interaktion zwischen TRPV6 und Cyclophilin B müssten daher beide Proteine zusammen in einer Fraktion detektiert werden. Da parallel ein Größenstandard, der Proteinkomplexe bekannter Größe enthält, ebenfalls zentrifugiert wird, kann man die Größe des TRPV6-Proteinkomplexes abschätzen.

Beide Proteine kommen jedoch in keiner Fraktion gemeinsam vor (Abb. 20). Beim Vergleich mit dem Diagramm der Kontrollproteine ist erkennbar, dass Cyclophilin B nur in den Fraktionen vorkommt, die seinem Molekulargewicht (MW 20 kDa) entsprechen. Bei bestehender Interaktion mit anderen Proteinen während der Saccharosedichtegradientenzentrifugation müsste CyPB in Fraktionen höheren Molekulargewichts (>20 kDa) auftauchen.

Anhand des Nachweises von TRPV6 im Western Blot (Abb. 20) zeigt sich, dass das Protein auch in Fraktionen höheren Molekulargewichts bis zu 440 kDa vorkommt. Mit hoher Wahrscheinlichkeit handelt es sich in diesen Fraktionen um Multimere bzw. bei Fraktionen geringeren Molekulargewichts um Dimere des TRPV6-Proteins. Dafür sprechen auch die Signale für TRPV6 im Western Blot, die bei Molekulargewichten größer als bzw. gleich 170 kDa auftreten und damit den Multimeren bzw. Dimeren von TRPV6 entsprechen. Dies korreliert auch mit den publizierten Größen für Dimere (~170 kDa) und Multimere (>250 kDa) von TRPV6 (Hoenderop et al., 2003).

Die Interaktion zwischen den TRPV6-Untereinheiten, die zur Ausbildung und Stabilisierung der Di- und Multimere führt, ist möglicherweise stabiler als die Bindung zwischen dem TRPV6- und dem Cyclophilin B-Protein unter den Bedingungen der Saccharosedichtegradientenzentrifugation. Dies beruht möglicherweise darauf, dass die Interaktion der TRPV6-Kanal-Untereinheiten auf mehreren Bindungen besteht. Wie in der Einleitung schon erwähnt führt die Interaktion von mehreren Ankyrinbindedomänen zur Ausbildung des TRPV6-Tetramers (Erler et al., 2004; Niemeyer, 2005; Schindl und Romanin, 2007). Außerdem ist auch eine Beteiligung der Transmembranregionen an Di- bzw. Tetramerisierung möglich (Erler, 2006).

Durch diesen Versuchsansatz konnte indirekt die Existenz von Di- und -Multimeren des TRPV6-Proteins in Extrakten aus Plazentagewebe gezeigt werden. Auf Grund der verschiedenen Wechselwirkungen zwischen den TRPV6-Kanaluntereinheiten, die zur Tetramerstruktur des Kanals beitragen, sind die Di- und Multimerstrukturen stabiler gegenüber äußeren Einflüssen, wie Detergenzien, Puffersubstanzen und denaturierende Agenzien als die Bindung zwischen TRPV6 und Cyclophilin B.

5.1.3. Mögliche Bindestellen von Cyclophilin B im TRPV6-Protein

Die Interaktionsstelle von Cyclophilin B im TRPV6-Protein soll mittels Peptidblotanalyse genauer bestimmt werden (Abb. 21). Normalerweise werden Peptidblots verwendet, um die Lage von Epitopen monoklonaler und polyklonaler Antikörper zu identifizieren. In diesem Versuch wird untersucht an welche Peptide oder Proteinregionen potentielle Interaktionspartner binden. Damit ähnelt die Methode dem „Far Western Blot“ (Hall, 2004) mit der Modifikation, dass nicht ganze Proteine sondern nur Proteinfragmente an die Membran gekoppelt sind.

Da die 12 Aminosäuren langen Peptide in ungefaltetem Zustand vorliegen, können dadurch sowohl falschnegative als auch falschpositive Interaktionen vorliegen. Das heißt, bei falschnegativen Interaktionen bindet das Protein nicht an das Peptid, da die Interaktion auf die native Form des Proteins bzw. der Proteinregion angewiesen ist. Im Falle falschpositiver Resultate interagiert das Protein mit Peptiden mit denen es *in vivo* gar nicht in Kontakt kommen kann, z.B. bei transmembranären Regionen oder *in vivo* nicht zugänglichen, im Innern des Proteins liegenden Epitopen.

Von den 11 ermittelten positiven Spots (Abb. 21 + Tabelle 16), werden die Spots mit zytoplasmatischen Peptiden als potentielle Interaktionsstellen favorisiert, da hier eine *in vivo*-Interaktion wahrscheinlicher ist, als bei nicht zugänglichen transmembranären Regionen. Auf Grund der Überlappung der Aminosäuresequenz zwischen zwei Peptidspots sind zwei nebeneinander liegende positive Spots ein mögliches Indiz für eine größere, mehr als 5 AS umfassende, Interaktionsregion. Dies trifft hier nur auf die n-terminale TRPV6-Aminosäuresequenz L₆₁NKLLYEDCKVHQRGAM₇₇ zu, wobei die Sequenz Y₆₆EDCKV₇₁ in den beiden Peptiden vorkommt (Abb. 21 + Tabelle 16, Spot 1 + 2). Möglicherweise handelt es sich bei dieser Aminosäureabfolge um die für die Bindung notwendige Minimalsequenz.

Ansonsten findet sich ein starkes Signal bei dem Peptidspot mit der Aminosäuresequenz R₆₉₇LRQGTLRRDLR₇₀₈, wobei diese Sequenz mit der zuvor beschriebenen CaM-Bindestelle (AS-Sequenz: N₆₉₄WE....GLE₇₁₆) kolokalisiert ist (Niemeyer et al., 2001).

Die Länge der Aminosäureketten der einzelnen Peptidspots sollte ausreichend lang sein, um eine Interaktionssequenz für andere Proteine zu beinhalten. So wurde z.B. eine 13 AS lange Bindestelle für Calmodulin im TRPL-Protein der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (K₈₅₉ ET....VAR₈₇₁) beschrieben (Trost et al., 1999).

Die Inkubation des Peptidblots mit gereinigtem Cyclophilin B und anschließendem Antikörpernachweis zeigt zahlreiche Peptidspot-Signale. Der Großteil der Signale ist höchstwahrscheinlich falschpositiv. Grund können unspezifische Interaktionen des Primär- oder Sekundärantikörpers mit der Membran oder den immobilisierten Peptiden sein. Die Interaktionsregion lässt sich durch Inkubation mit gereinigtem Cyclophilin B nicht nachweisen. Das Ablösen der gebundenen Proteine und Antikörper im Anschluss ist erfolglos, da weiterhin starke unspezifische Signale auftauchen.

Möglicherweise liegt die Ursache des unzureichenden Ablösens in dem im vorhergehenden Ansatz benutzten *in-vitro*-Translationsgemisch. Bei der ivTL wurden in das CyPB-Protein biotinyliertes Lysin eingebaut, das ursprünglich dem Nachweis des Proteins diene. Das Biotin kann aber hier auch zur Bindung anderer Proteine bzw. Antikörper führen. Diese Bindung ist möglicherweise unter den Bedingungen des „Stripping“-Puffers nicht zu lösen. Ein weiterer Aspekt sind die im Retikulozytenlysat enthaltenen Chaperone, welche ebenfalls eine hohe Affinität zu Proteinen haben. Auch sie können, nachdem sie sich an die Peptide des Blots angehängt haben, Antikörper oder antikörperaffine Proteine binden und so das Ergebnis des Peptidblots verfälschen. Für die Konformationsänderung und das anschließende Ablösen vom gefalteten Protein benötigen die Chaperone meist Energie in Form von ATP (Horton et al., 2008). Da ATP in der Lösung fehlt, wäre dies eine mögliche Begründung dafür, dass sich die Chaperone nicht vom Blot lösen ohne die Peptide des Blots selbst zu zerstören.

Um die potentielle Bindungssequenz Y₆₆EDCKV₇₁ bestätigen zu können, sollte man TRPV6-Mutanten mit einer veränderten Aminosäuresequenz in diesem Bereich herstellen. Diese könnte man beispielweise mit funktionellen Untersuchungen nach Injektion der TRPV6-cRNS in Oozyten näher untersuchen. Im Rahmen der Doktorarbeit meines Kollegen Qi Zhang (Zhang, 2008) konnte gezeigt werden, dass TRPV6 injizierte Oozyten große Mengen an radioaktiven ⁴⁵Kalzium aufnehmen können. Diese Kalziumaufnahme wird bei Koinjektion von CyPB-cRNS gesteigert. Erfolgt nun die Interaktion über den N-Terminus von TRPV6 sollte der aktivierende Effekt des Cyclophilin B ausbleiben, wenn die dafür essentiellen Aminosäuren im TRPV6 Protein mutiert werden.

In Kalziumaufnahmeversuchen in Oozyten würde eine im Vergleich zu den Ergebnissen meines Kollegen Qi Zhang veränderte Ca²⁺-Aufnahme auf die Proteininteraktion über den N-Terminus des TRPV6-Proteins sprechen. Durch die Mutation einzelner Aminosäuren dieser

Sequenz könnten anschließend die für die Interaktion von TRPV6 und CyPB essentiellen Aminosäuren identifiziert werden.

Als Alternative zum Peptidblot wird ein GST-Pulldown-Assay mit verschiedenen TRPV6-GST-Fusionsproteinen und gereinigtem Cyclophilin B zur Interaktionsanalyse (Vikis und Guan, 2004) durchgeführt. Zur Aufreinigung von Cyclophilin B stehen die Quellen Kuhmilch, heterolog exprimierende Bakterien und Plazentagewebe zu Auswahl.

Untersuchungen haben ergeben, dass Cyclophilin B in einer um 33 Aminosäuren verkürzten Form in das Blutserum und in Milch sekretiert wird (Mariller et al., 1996). Weiterhin ist bekannt, dass es in den CyPB-exprimierenden Geweben im ER und in der Plasmamembran zu finden ist (Price et al., 1994). Als Aufreinigungsmethode wird für alle Cyclophilin B-Quellen auf Grund des isoelektrischen Punktes (pI) des Proteins von 9,33 eine Ionenaustauschchromatographie mittels einer SP-Kationenaustauschersäule gewählt, da CyPB bei physiologischem pH als Kation vorliegt. Nach der Elution der Proteine werden diese mittels Ultrafiltration in Fraktionen unterschiedlichen Molekulargewichts geteilt und konzentriert (Schema siehe Abb. 26).

Bovines Cyclophilin B, was in Kuhmilch sezerniert wird, ist zu 95% homolog zu dem humanen Protein in Muttermilch (Abb. 22). CyPB kann aber mit der genannten Methode nicht aus der Kuhmilch angereichert werden (Abb. 23). Stattdessen kommt das Protein Lactotransferrin, das massenspektrometrisch identifiziert wurde (Tabelle 17), in erhöhten Konzentrationen in den Proben vor (Abb. 24). Lactotransferrin (708 AS, MW ~78 kDa) liegt bei physiologischem pH mit einem pI von 8,72 ebenso wie Cyclophilin B als Kation vor und wird unter den gegebenen Bedingungen an die Säule gebunden. Lactotransferrin wird allerdings trotz des niedrigeren pI und den daraus resultierenden geringeren Wechselwirkungen viel besser über die Säule gereinigt. Beide Proteine weisen weder homologe Bereiche auf, noch ist eine Assoziation zwischen ihnen bekannt. Die isolierten Cyclophilin B Mengen in den Proben sind für den Nachweis im Western Blot zu gering. Möglicherweise könnte ausgiebiges Waschen das Lactotransferrin wieder von der Säule entfernen. Dies würde zu einer Verlängerung des Aufreinigungsprozesses führen, in Folge dessen das Cyclophilin B inaktiviert oder sogar denaturiert werden könnte.

Alternativ wurde versucht CyPB heterolog in Bakterien zu exprimieren und daraus zu reinigen. Bei der Aufreinigung von CyPB aus Bakterien, stellte sich heraus, dass das CyPB-Protein nicht wie erwartet in den periplasmatischen Raum geschleust wurde (Abb. 25). Entweder ist die Methode der Frier-Tau-Lyse nicht ausreichend zur Lyse der äußeren Zellwand und damit zum Zerstören der Hülle des periplasmatischen Raums geeignet oder das Protein befand sich im Innern des Bakteriums. Für die Sezernierung des Proteins ins Periplasma muss das produzierte Protein ein n-terminales Signalpeptid enthalten, das vom Sekretionsapparat des Bakteriums erkannt wird (Richter, 2003). Diesbezüglich gibt es in den Bakterien unter

anderem Sec- und Tat-Translokationssysteme (Fuchs und Schlegel, 2006). Entsprechend könnte die n-terminal angehängte Zielsequenz von CyPB, die bei Expression in eukaryontischen Zellen für seinen Verbleib im endoplasmatischen Retikulum sorgt (Arber et al., 1992), die Ursache für den Verbleib im Zytoplasma sein. Eventuell erfüllt diese Zielsequenz in den Bakterien eine ähnliche Funktion und sorgt dafür, dass das Protein nicht in den periplasmatischen Raum transportiert wird.

In weiteren Versuchen konnte ich zeigen, dass nach einer Ultraschall/Triton-X-100-Lyse das Cyclophilin B-Protein mit der beschriebenen Vorgehensweise aus *E. coli* isoliert werden kann (Abb. 27). Die Methode ist somit gut für die Reinigung des Proteins geeignet. Ein Nachteil der heterologen Proteinexpression in Bakterien ist, dass die gebildeten Proteine nicht posttranslational modifiziert werden wie in einer Eukaryontenzelle, so dass Glykosylierungen oder Phosphorylierungen z.T. fehlen und das Protein so möglicherweise nicht in seiner nativen aktiven Konformation vorliegt. Für Cyclophilin B würde das den Verlust der Peptidylprolyl-cis-trans-Isomeraseaktivität und damit der Verlust der Interaktionsfähigkeit mit Proteinen, wie z.B. TRPV6, bedeuten. Aus diesem Grund ist die Isolation des Proteins aus eukaryontischen Zellen der Gewinnung aus Bakterien vorzuziehen.

Cyclophilin B kommt in verschiedenen Körpergeweben in stark unterschiedlichen Konzentrationen vor (Abb. 28). Eine starke Expression des ubiquitär (Bukrinsky, 2002) vorhandenen Proteins findet sich in den Geweben von Leber, Milz, Magen, Dünndarm, Dickdarm und Plazenta. Hierbei handelt es sich meist um Organe, in denen Enzyme und andere Proteine eine wichtige Rolle bei Stoffwechsel- und Verdauungsprozessen spielen. Die Funktionalität und aktive Form von Proteinen ist insbesondere von der richtigen Faltung und Konformation der Proteinstruktur abhängig. Chaperone und anderen Faltungsproteine beschleunigen die Faltung solche Proteine bei ihrer Synthese und kontrollieren ihre Struktur während ihres Lebenszyklus, um ihre Funktionalität zu erhalten. Es ist bekannt, dass Cyclophilin B eine Chaperonfunktion einnehmen kann (Rycyzyn und Clevenger, 2002).

Die Anreicherung von Cyclophilin B aus Plazentagewebe gelingt im Gegensatz zur analogen Vorgehensweise bei Milch und Bakterien. Mit Hilfe von Fraktionierung durch Ultrafiltration kann das 20 kDa große Protein von einigen anderen Proteinen des Säuleneluats getrennt werden. Das Protein ist danach sowohl in der Fraktion >10 kDa, als auch in der Fraktion >30 kDa nachweisbar (Abb. 30, rechts) und kann auch mittels MALDI-ToF-Massenspektrometrie identifiziert werden (Tabelle 18, Abb. 31).

Somit konnte eine Methode etabliert werden, die es möglich macht das Protein aus dem stark Cyclophilin B-exprimierenden Gewebe der humanen Plazenta zu isolieren. Das Vorhandensein von CyPB sowohl in der >10 kDa-Fraktion (nach der Ultrafiltration) als auch in der >30 kDa-Fraktion spricht dafür, dass zum einen das Protein allein vorliegt (>10 kDa-

Fraktion) und zum anderen auf Grund von Proteininteraktionen zwischen Cyclophilin B und mindestens einem weiteren Protein (z.B. TRPV6) ein Gesamtmolekulargewicht von mehr als 30 kDa erreicht (>30 kDa-Fraktion). Möglicherweise interagiert Cyclophilin B auch auf Grund seiner PPIase-Aktivität mit noch teilweise ungefalteten Proteinen aus dem Plazentahomogenat, die ein Prolin in *cis*-Konformation aufweisen.

Da die Fraktion >10 kDa wahrscheinlich das ungebundene Cyclophilin B Protein enthält und weniger durch andere Proteine verunreinigt ist (siehe SDS-Gel Abb. 30, links), wird diese für die anschließenden Versuche verwendet. Allerdings zeigt der anschließende kombinierte Aktivitätstest nach Fischer (Fischer et al., 1984), dass das Enzym nicht mehr aktiv ist. Der Verlust der Aktivität von Cyclophilin B kann darauf beruhen, dass das Protein durch das Aufreinigungsverfahren seiner natürlichen Umgebung entzogen wird und mit erhöhten Konzentrationen an Detergenzien (Natriumdeoxycholat) und Salzen (NaCl) in Kontakt kommt. Diese Bedingungen können denaturierende Auswirkungen auf Proteine und Enzyme haben (Rehm, 2006). Eine weitere mögliche Begründung der geringeren spezifischen Aktivität besteht darin, dass mit Cyclophilin B weitere Proteine konzentriert werden könnten, die den Aktivitätstest hemmen. Ansatzpunkte solcher Proteine wären die Hemmung der Enzyme Cyclophilin B und Chymotrypsin, sowie die Denaturierung des Substrats oder seiner photometrisch detektierbaren Produkte nach der Spaltung durch Chymotrypsin.

Trotz des wahrscheinlichen Verlustes der Enzymaktivität wird ein GST-Pulldown-Versuch mit verschiedenen TRPV6-GST-Fusionsproteinen (Details siehe Abb. 12) von Regionen des N- und C-Terminus von TRPV6 durchgeführt. Der Nachweis von Cyclophilin B im Western Blot nach der Durchführung des Pulldown-Assays fällt allerdings negativ aus. CyPB ist in keinem Ansatz nachweisbar. Die Ursache kann in der zuvor genannten Inaktivität des Enzyms liegen, aber auch auf den Bedingungen des Versuchs beruhen. Die Interaktion zwischen TRPV6 und CyPB scheint nur unter sehr definierten Bedingungen stabil zu sein bzw. sich ausbilden zu können, wie die vorhergehenden Ergebnisse bereits andeuteten.

5.1.4. Mögliche Funktionen der TRPV6-Cyclophilin B-Interaktion

Auch wenn die Charakterisierungsversuche nicht die gewünschten Ergebnisse liefern, hat die Coimmunpräzipitation die Interaktion zwischen TRPV6 und Cyclophilin B eindeutig bewiesen. Diese Interaktion hat regulatorische Auswirkungen auf die Kanalaktivität von TRPV6. Wie von meinem Kollegen Qi Zhang im Rahmen seiner Dissertation in radioaktiven Ca^{2+} -Aufnahmeversuchen gezeigt wurde, erhöht sich die Kalziumaufnahme in TRPV6 exprimierenden *Xenopus laevis* Oozyten nach Koinjektion mit Cyclophilin B-mRNS konzentrationsabhängig (Stumpf et al., 2008; Zhang, 2008;). Die Aktivierung steigt mit zunehmender CyPB-Konzentration. Diese Aktivierung ist durch die Zugabe des

Immunsuppressivums Cyclosporin A, von dem man weiß, dass es an Cyclophilin B bindet (Price et al., 1994), blockierbar. Der Wirkstoff hat aber keine Auswirkungen auf die Ca²⁺-Aufnahme bei ausschließlich mit TRPV6-mRNS injizierten Oozyten.

Somit scheint die Peptidylprolylisomeraseaktivität des humanen Cyclophilin B verantwortlich für die Aktivierung des TRPV6-Ionenkanals zu sein. Das endogen in den Oozyten exprimierte Cyclophilin B ist zu 86 % homolog zu humanem CyPB (Abb. 50). Folglich muss die Interaktion zwischen humanem TRPV6 und humanem CyPB auf den Bereichen beruhen, in denen Homologieunterschiede zwischen humanem CyPB und *Xenopus* CyPB vorliegen. Die Unterschiede betreffen nur wenige über das gesamte Protein verteilte Aminosäuren und Sequenzbereiche (Abb. 50, grün), liegen jedoch zum Großteil in der 165 Aminosäuren langen Region (Abb. 50, grau), der die Peptidylprolylisomeraseaktivität und die Cyclosporin A Bindedomäne zugeschrieben werden (Price et al., 1991).

hCyPB	1	mlrlsernmkvlllaaaliagsvfflllpgpsaadekkkgpkvtvkvyfdl	50
		.: : : . . . : .	
XCyPB	1	mlrplernmklffaaliagsvifllfpgssvaddkkkgpkvtdkvyfdl	50
hCyPB	51	rigdedvgrvifglfgktvpktdvnfvalatgekgyknskfhrvikdf	100
		: : : : : . : . :	
XCyPB	51	kigdeevgriviglfkgktvpktdvntlatgekgyknskfhrvikef	100
hCyPB	101	miqggdftrgdgtggksiygerfpdenfklkhygpwvsmanagkdtngs	150
		: : : : : :	
XCyPB	101	miqggdftrgdgtggksiygdrfpdenfklkhygpfwlsmanagkdtngs	150
hCyPB	151	qffittvktawldgkhvvgkvlegmevvrkvestktdsrdkplkdviia	200
		. .: : . :	
XCyPB	151	qffittvktawldgkhvvgkvlegteivrkiestktdgrdkplkdvia	200
hCyPB	201	dcgkievekpfaiake	216
XCyPB	201	dcgkievekpfaiake	216

Abb. 50: Vergleich der Aminosäuresequenz von humanem Cyclophilin B (hCyPB) und Cyclophilin B aus *Xenopus laevis* (XCyPB). Der Vergleich der Aminosäuresequenzen beider Proteine aus der NCBI-Datenbank (Accession-Nr. humanes Cyclophilin B: GI:181335; *Xenopus* Cyclophilin B: GI:148237181) wird mit dem Online-Align-Programm des EMBL-EBI Instituts (<http://www.ebi.ac.uk>) durchgeführt. Die Analyse ergibt eine AS-Sequenzhomologie von 86 %. Bereiche mit vermehrten Sequenzunterschieden sind grün hinterlegt. Grau hinterlegt ist die Kerndomäne, die die PPLase-Aktivität beinhaltet. | = identische Aminosäure, : = Aminosäure der gleichen Gruppe, . = keine Übereinstimmung.

Der nahe mit TRPV6 verwandte TRPV5-Kanal (zu 85 % homolog) verhält bei den radioaktiven Ca²⁺-Aufnahmeversuchen in Oozyten genau gegensätzlich (Abb. 52). Hier wurde ein inhibitorischer Einfluss von Cyclophilin B auf den Kanal beobachtet (Stumpf et al., 2008, Zhang, 2008). Und im Gegensatz zum Versuch mit TRPV6 hat hier das Immunsuppressivum Cyclosporin A keinen Einfluss auf die Inhibition des TRPV5-Kanals. Auf Grund der sehr ähnlichen Eigenschaften und Funktionen der beiden Kanäle kann dieses unterschiedliche Verhalten bei der Co-Expression mit Cyclophilin B nur in den Sequenzbereichen begründet sein, in denen sich die beiden Proteine unterscheiden. Dabei handelt es sich, wie zuvor bereits genannt, um die Bereiche des N- und C-Terminus (Voets et al., 2004).

Es gibt bereits bekannte Interaktionen zwischen TRP-Proteinen und Immunophilinen. Das TRPV6-verwandte TRPV5 ist mit dem Immunophilin FKBP52 assoziiert. Die Interaktion der beiden Proteine hat eine inhibierende Wirkung auf die TRPV5-Aktivität und die Ca^{2+} -Aufnahme in HEK293-Zellen. Dieser Effekt ist abhängig von einer funktionellen Peptidyl-prolyl-cis-trans-Isomeraseaktivität des Immunophilin FKBP52 und kann durch die Gabe von FK506 unterbunden werden (Gkika et al., 2006). Ähnliche Ergebnisse lieferten Untersuchungen meines Kollegen Qi Zhang bezüglich des Einflusses von Cyclophilin B auf TRPV5 bei Kalziumaufnahmeversuchen von mit TRPV5 und Cyclophilin B cotransfizierten *Xenopus laevis* Oozyten (Zhang, 2008). TRPL, Bestandteil des bei der Entdeckung des ersten TRP-Proteins untersuchte Proteinkomplexes interagiert neben dem Stützprotein INAD auch mit FKBP59 (Goel et al., 2001). Weiterhin wurde eine Assoziation von TRPC-Proteinen mit FKBP5 im Überexpressionssystem und nativen Zellen entdeckt. Die Proteine TRPC3, -C6 und -C7 interagieren ausschließlich mit dem Immunophilin FKBP52 (humanes Homolog zu dFKBP59), TRPC1, -C4 und -C5 gehen dagegen eine spezifische Bindung zu FKBP12 ein (Sinkins et al., 2004). Die Interaktion erfolgt auf Grund der Isomeraseaktivität an prolinreichen Regionen und kann jeweils durch das Immunsuppressivum FK506 aufgelöst werden. Da sich prolinreiche Regionen allerdings auf Proteine der TRPC- und TRPM-Familie beschränken, kommt diese Form der Interaktion für TRPV6 und Cyclophilin B nicht in Betracht.

Immunophiline können aber auch mit anderen den Ca^{2+} -Haushalt regulierenden Enzymen und Kanälen assoziiert sein. So wurde eine Interaktion zwischen dem FKBP12-Protein und dem Ryanodinrezeptor (Brillantes et al., 1994) und dem IP_3 -Rezeptor (Cameron et al., 1995) gezeigt. Beide Rezeptoren haben wie TRPV6 eine tetramere Struktur und sind für die Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen bzw. endoplasmatischen Retikulum, den Kalziumspeichern von Skelettmuskeln und anderen Geweben verantwortlich (McPherson und Campbell, 1993; Cameron et al., 1995).

Die Interaktion zwischen TRPV6 und CyPB ist möglicherweise gewebespezifisch und könnte sich auf die Gewebe Plazenta und Dünndarm beschränken, da nur in diesen Geweben beide Proteine in nachweisbaren Mengen vorkommen. Der Nachweis der Interaktion beider Proteine im Dünndarm steht allerdings noch aus. Die Tatsache, dass bei beiden Geweben der Kalziumtransport über Epithelzellen erfolgt und TRPV6 einen großen Beitrag dazu leistet, unterstreicht, dass Immunophiline auch an der Kalziumhomöostase über die Interaktion mit TRP-Kanälen beteiligt sein könnten.

Die Bindung von Cyclophilin B an TRPV6 könnte neben der Aktivierung in der Plasmamembran die Funktion haben, das TRPV6-Protein in funktionell gefalteter Form vom Produktionsort, dem ER, zum Funktionsort, der Plasmamembran zu geleiten (Chaperonfunktion). Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass Cyclophilin B eine Peptidylprolylisomerasereaktion des TRPV6-Proteins katalysiert (Faltungsfunktion).

In Versuchen mit einer Zellkultur aus Rattenherzmyoblasten wurde nachgewiesen, dass die Chaperonfunktion des Cyclophilin B eine wichtige Funktion zu sein scheint, um die Zelle vor den Stressfaktoren aus dem ER zu schützen (Kim et al., 2008). Kommt es im ER zu einer Akkumulation ungefalteter Proteine wird in Folge u.a. Ca^{2+} in das Zytoplasma freigesetzt und die Expression von Cyclophilin B erhöht. Die Ca^{2+} -Freisetzung ist ein Stresssignal für die Zelle und löst in den restlichen Zellkompartimenten, u.a. den Mitochondrien, weitere Stressreaktionen, wie die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) aus. Die vermehrte Produktion von CyPB hat zur Folge, dass die ungefalteten Proteine in korrekt gefaltete Proteine umgewandelt und dadurch die Stressauslöser beseitigt werden. Die Schutzfunktion von CyPB vermindert weiterhin die Ca^{2+} -Freisetzung in das Zytoplasma durch die Interaktion mit Regulationsproteinen der Ca^{2+} -Homöostase (Kim et al., 2008). Dies kann auch in Verbindung mit der TRPV6-CyPB-Interaktion stehen, da eine erhöhte CyPB-Konzentration auch zu einer verstärkte TRPV6-Aktivität und folglich zu einer erhöhten Ca^{2+} -Aufnahme aus dem Zytoplasma führen würde. Das auf Grund des Stresses aus dem ER freigesetzte Kalzium würde somit wieder schneller in das ER zurückgeführt und die nachfolgenden Stressreaktionen, wie das Auslösen einer Apoptosereaktion, dadurch verhindert.

Berücksichtigt man zusätzlich die bereits bekannten Interaktionspartner von TRPV6, Annexin A2-S100A10 und Calmodulin und ihren Einfluss auf das TRPV6-Protein, ist folgendes Modell eines TRPV6-enthaltenden Proteinkomplexes in der Plasmamembran denkbar (Abb. 51). Wie von Niemeyer und Kollegen (Niemeyer et al., 2001) gezeigt, ist der Kanal bei geringen intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen geöffnet und Kalzium strömt in die Zelle ein. Calmodulin interagiert Ca^{2+} -abhängig mit dem C-Terminus des TRPV6-Proteins und sorgt durch dessen Konformationsänderung für eine Blockade der Kanalpore. Diese ist durch eine Verringerung der Ca^{2+} -Konzentration reversibel und ermöglicht so die Kontrolle der intrazellulären Kalziumkonzentration. Außerdem kann die CaM-Bindestelle im TRPV6-Protein durch Phosphorylierung durch die Proteinkinase C (PKC) blockiert werden (Niemeyer et al., 2001).

Die Bindung von CyPB an das TRPV6-Protein, möglicherweise an die in der Dissertation identifizierte, n-terminale TRPV6-Aminosäuresequenz $\text{L}_{61}\text{NKLLYEDCKVHQRGAM}_{77}$, führt zu einer verstärkten Aktivierung des Kanals. Da diese Aminosäuresequenz kein Prolin enthält, kann CyPB hier nicht über seine Peptidyl-proly-cis-trans-Isomerase-Aktivität wirken. Möglicherweise bindet CyPB jedoch auf Grund anderer, z.B. ionischer oder hydrophober Wechselwirkungen an diese Sequenz. Diese Interaktion kann zu einer Konformationsänderung im TRPV6-Protein führen und dadurch den Ca^{2+} -Einstrom erleichtert. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass diese Konformationsänderung oder ein anderer durch die Cyclophilin B-Interaktion resultierender, bisher unbekannter Mechanismus die CaM-

Inaktivierung des Kanals unterbindet und dadurch zu einer Art „Daueraktivierung“ des Kanals führt.

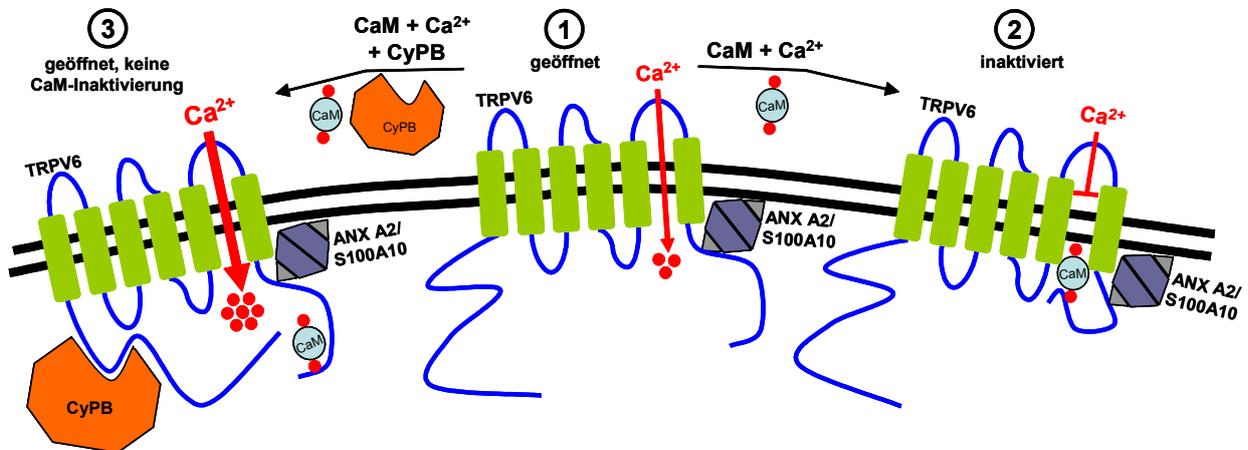


Abb. 51: Theoretisches Modell des TRPV6-Proteinkomplexes bei Interaktion mit Cyclophilin B (CyPB), Calmodulin (CaM) und dem Annexin A2 (ANX A2)-S100A10-Tetramer (in Anlehnung an Niemeyer et al., 2001). Der Annexin A2-S100A10-Komplex verankert den TRPV6-Kanal über dessen c-terminale VATTV-Domäne in der Plasmamembran. Bei geringen intrazellulären Kalziumkonzentrationen strömt Ca^{2+} durch die geöffnete Pore (1). Calmodulin bindet Ca^{2+} -abhängig an eine c-terminale Domäne des TRPV6-Proteins. Die resultierende Konformationsänderung sorgt für den Verschluss der Pore (2). Cyclophilin B bindet an den N-Terminus von TRPV6, sorgt durch eine Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerisierungsreaktion für eine Konformationsänderung im Protein und damit für eine verstärkte Aktivierung des TRPV6-Kanals und einen erhöhten Ca^{2+} -Einstrom. Eine CaM-Inaktivierung wird dadurch möglicherweise verhindert (3).

Wie bereits erwähnt, konnte Qi Zhang im Rahmen seiner Doktorarbeit eine Aktivitätssteigerung von TRPV6 bei der Zugabe von Cyclophilin B durch Koinjektion in Oozyten zeigen (Zhang, 2008). Gleichzeitig wurde von ihm eine Minderung der Aktivität bei Zugabe des Immunsuppressivums Cyclosporin A (CsA) festgestellt, wobei die Ca^{2+} -Aufnahme auf die Rate von TRPV6 allein sinkt. CsA allein hat keinen Einfluss auf die Ca^{2+} -Aufnahmerate von TRPV6 (Abb. 52). CsA und Cyclophilin B haben dagegen beide eine inhibierende Wirkung auf die Ca^{2+} -Aufnahmerate von TRPV5, wobei die Hemmung durch Cyclophilin B stärker ist (60 % Restaktivität gegenüber 75 % Restaktivität). Die Zugabe von CsA zu TRPV5/CyPB-koinjizierten Oozyten hat keine weiteren inhibitorischen Folgen auf die Ca^{2+} -Aufnahme (Abb. 52). Daraus folgt das gewisse Unterschiede zwischen der TRPV6-CyPB- und der potentiellen TRPV5-CyPB-Interaktion bestehen müssen.

Es ist davon auszugehen, dass Cyclosporin A an das aktive Zentrum von CyPB bindet und dieses daher für eine Interaktion mit dem TRPV6-Protein nicht zur Verfügung steht. In der Folge wäre eine CaM-Inaktivierung des Kanals auf Grund der unterbundenen Konformationsänderung möglich (Abb. 51). Die resultierende Aktivität des Kanals wäre damit geringer.

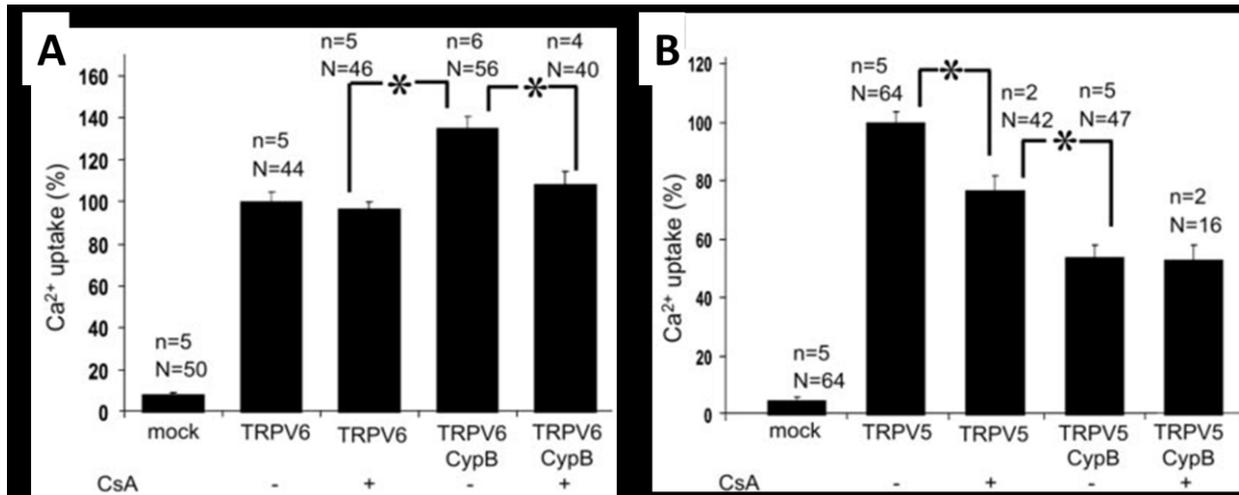


Abb. 52: Cyclosporin A revidiert die Cyclophilin B-Aktivierung bei TRPV6 und hemmt TRPV5 direkt. Ca²⁺-Aufnahme in *Xenopus laevis* Oozyten, bei denen Cyclophilin B-mRNS zusammen mit TRPV6-mRNS (A) bzw. zusammen mit TRPV5-mRNS (B) koinjiziert wurde, in An- und Abwesenheit von Cyclosporin A (Stumpf et al., 2008).

Cyclophilin B hat möglicherweise in der Plazenta zusammen mit TRPV6 die Funktion den erhöhten Kalziumbedarf des Fötus über den TRPV6-Kanal und die Fortdauer der Schwangerschaft zu gewährleisten. In einer Studie wurden Schwangerschaften nach Nierentransplantationen untersucht, um die Auswirkungen des Immunsuppressivums Cyclosporin A (CsA) auf den Verlauf der Schwangerschaft und die Folgen für das Kind näher zu erläutern (Hengst, 1999). Dabei wurden ein geringeres Geburtsgewicht und eine erhöhte Frühgeburtenrate festgestellt im Vergleich zu Neugeborenen bei Frauen, die kein CsA einnehmen mussten (Lessan-Pezeshki, 2002; McKay und Josephson, 2008). Diese Studienresultate könnten meinen Ergebnissen zu Folge im Zusammenhang mit der TRPV6-Cyclophilin B-Interaktion und deren Auswirkung auf die Ca²⁺-Homöostase des Plazentagewebes stehen.

Der Wirkstoff Cyclosporin A kann, wie alle anderen Immunsuppressiva in gewissen Mengen die Plazenta passieren (McKay und Josephson, 2008) und somit während einer Schwangerschaft die Aktivierung des TRPV6 und des TRPV5-Proteins, wie oben gezeigt, beeinflussen. Im Falle von TRPV6 bedeutet das, dass der Kanal den Grundlevel an Kalzium transportieren kann, eine Steigerung durch CyPB-Aktivierung aber nicht möglich ist. Bei TRPV5 würde durch die Gabe von CsA das Grundlevel des Ca²⁺-Transports auf 75 % (60 % bei einer Interaktion mit CyPB) sinken. TRPV5 befindet sich also eher in einem inaktiven Zustand und kann dadurch auch nicht den Aktivierungsverlust von TRPV6 ausgleichen. Schlussfolgernd bedeutet dies, dass bei Schwangeren, die auf Grund einer Transplantation Cyclosporin A einnehmen müssen, die Ca²⁺-Kanäle TRPV5 und TRPV6 in den Synzytiotrophoblasten der Plazenta weniger Kalzium transportieren, wodurch dem Fötus Ca²⁺ unterversorgt ist. Ein geringeres Gewicht und eine möglicherweise dadurch ausgelöste Frühgeburt wären die Folge.

Der schwangerschaftsbedingte erhöhte Nährstoffbedarf der Mutter führt zu einer erhöhten Kalziumaufnahme im Darm, aber auch zu einer für die Zeit der Schwangerschaft andauernden Knochendemineralisierung (Fudge und Kovacs, 2010). Bei einer Behandlung mit Cyclosporin A gelangt das Kalzium aber nicht im ausreichenden Maße zum Fötus, da das TRPV6-Protein nicht genügend Ca^{2+} über die Synzytiotrophoblasten transportiert.

Nach einer Transplantation ist die Einnahme von immunsuppressiven Wirkstoffen eine Standardbehandlung in der Medizin. In Folge der Behandlung mit Cyclosporin A wurde ein verstärktes Auftreten von Osteoporose oder zumindest die Abnahme der Knochendichte (Osteopenie), u.a. nach Transplantation der Niere (Boot et al., 1995), des Herzens (Thiebaud et al., 1996) oder der Leber (Giannini et al., 2000) festgestellt (Cipriani und Farias, 2005).

Obwohl Osteoporose als eine Nebenwirkung von Cyclosporin A bekannt ist, ist die Ursache bzw. der Mechanismus, der dazu führt noch nicht geklärt. Möglicherweise entsteht die Osteoporose in Folge eines verringerten Ca^{2+} -Einstrom in die Epithelzellen des Dünndarms, da die CsA-Medikation die von CyPB-vermittelte „Aktivierung“ des TRPV6-Kanals verhindert. Der Organismus hält den Kalziumserumspiegel konstant, in dem er Ca^{2+} aus den Knochen mobilisiert, wodurch die Knochenstruktur abgebaut wird.

Osteoporose ist auch eine Begleiterscheinung von 30 % aller Frauen nach der Menopause (Bartl, 2008). Vor der Menopause halten sich Knochenaufbau und Knochenabbau durch Osteoplasten bzw. Osteoklasten auf Grund einer strikten hormonellen Steuerung u.a. durch Östrogen, Kalzitinin und Parathormon die Waage. Durch die Menopause verlieren die Eierstöcke ihre Funktion und stellen die Östrogensynthese ein. Der resultierende Östrogenmangel stimuliert osteolytische Enzyme und hemmt vermutlich die Sekretion von Kalzitinin aus der Schilddrüse. Als Folge davon wird die Knochenresorption durch die Osteoklasten gesteigert, so dass Kalzium vermehrt in die Blutbahn gelangt. Daraus resultieren ein Abfall der PTH-Sekretion, eine Unterdrückung der Bildung von Kalzitriol in der Niere und die Steigerung der renale Kalziumausscheidung. Durch diese Faktoren wird die Kalziumbilanz stark beeinträchtigt und der Abbau der Knochenmatrix weiter beschleunigt (Stettin et al., 2005). Möglicherweise kommt TRPV6 eine Funktion bei der Entwicklung von Osteoporose zu. Die Substanzen PTH und Kalzitriol sind beide Aktivatoren von TRPV6, deren Unterdrückung zu weniger aktivem TRPV6-Protein führen könnte. Die resultierende geringere Absorption von Kalzium aus der Nahrung über TRPV6 und die erhöhte Ca^{2+} -Ausscheidung über die Niere könnten zu einem erhöhten Kalziumbedarf führen, welcher wieder mit Kalzium aus den Knochen gedeckt würde. Dadurch entstünde ein Kreislauf, der die Kalziumresorption vorantreibt. Ein altersbedingter Rückgang der TRPV6-Expression im Darm, sowie die vermehrte renale Ca^{2+} -Exkretion wurde bei Mäusen bereits festgestellt (van Abel M. et al., 2006).

5.2. Optimierungsstrategien zur Isolierung der niedrig exprimierten, integralen TRP-Membranproteinen

Im Rahmen meiner Doktorarbeit sollte ich aus der während meiner Diplomarbeit verwendeten zweistufigen Affinitätschromatographie eine einstufige Affinitätschromatographie etablieren, die es ermöglicht auch Ca^{2+} -abhängige TRPV6-Interaktionen zu erhalten.

Für die TRPV6-Antikörpersäulen wurden auch polyklonale Antikörper durch die Immunisierung von Kaninchen mit dem TRPV6-Peptid 981 hergestellt. Dieser Antikörper zeigt in Tests eine hohe Affinität für TRPV6, kann aber nur in geringen Konzentrationen über die antigene Peptidsäule aus dem Kaninchenserum gereinigt werden. Aus diesem Grund wird die Antikörpersäule mit ungereinigtem Kaninchenserum hergestellt. Der zur Optimierung des Verhältnisses von Serum- zu Säulenvolumen durchgeführte Vorversuch ergibt eine Sättigung der Bindekapazität der NHS-Sepharose bereits bei einer Kopplung von 6 μl des Antikörperserums an 30 μl NHS-Sepharose (Abb. 34). Bereits mit 1 μl gekoppeltem Antikörperserum kann TRPV6 aus der mikrosomalen Plazentafraktion in einer nachweisbaren Menge isoliert werden. Dies zeigt die hohe Affinität des Antikörpers zum TRPV6-Protein.

Als Kontrolle zur Säule des 981-Antikörperserums wird das zur 981-Immunisierung gehörende Präimmunserum verwendet (Abb. 34). Im Versuch wird TRPV6 nur über die Antikörpersäule, nicht aber über die Kontrollsäule gereinigt, was beweist, dass die Affinität der Antikörpersäule auf den TRPV6-spezifischen Antikörpern begründet ist und nicht auf anderen Bestandteilen des Serums, die auch im Präimmunserum enthalten sind.

Die Antikörpersäule mit dem TRPV6-Antikörper 981 hat Simone Kalinke im Rahmen ihrer Diplomarbeit mehrfach bei TRPV6-Affinitätsreinigungen erfolgreich eingesetzt und damit gezeigt, dass sich auch solch eine Affinitätssäule mit ungereinigtem Antikörper zur Isolierung des Ionenkanals eignet (Kalinke, 2009). Auf Grund der zusätzlichen Bestandteile, wie unspezifische Immunglobuline, die ein ungereinigtes Serum beinhaltet, binden jedoch mehr unspezifische Proteine an die Säule. Dies zeigt sich auch bei der Negativkontrollsäule aus dem Präimmunserum des Kaninchens. Folglich könnte die Effizienz und Kapazität einer Affinitätschromatographie durch eine Säule mit einem gereinigten TRPV6-Antikörper dieser Qualität weiter gesteigert werden.

Dennoch wird die Säule mit dem TRPV6-Antikörper 981 für die weiterfolgenden Optimierungsversuche der TRPV6-Affinitätschromatographie verwendet.

5.2.1.1. Das TRPV6-Protein kann auch aus muriner Plazenta isoliert werden

TRPV6 kommt in der Plazenta der Maus vor und kann mittels des immobilisierten Antikörpers 981 auch aus der im Vergleich zur menschlichen wesentlich kleineren murinen Plazenta affinitätsgereinigt werden (Abb. 36). Der TRPV6-Antikörper 981 ist somit zur Präzipitation von Maus-TRPV6 geeignet. Allerdings ist die Menge des isolierten Proteins so gering, dass ich es im Rahmen meiner Doktorarbeit nicht massenspektrometrisch nachgewiesen habe.

Gleichzeitig wird hiermit erstmals das Vorkommen des TRPV6-Proteins in muriner Plazenta auf Basis einer Immunpräzipitation mit anschließendem Western Blot bestätigt. Die Detektion des TRPV6-Proteins der Maus durch den 981-Antikörper beruht auf Homologien des Antikörperepitops bei Mensch und Maus. Diese Eigenschaft wurde bereits bei der Etablierung des mit dem 981-Antikörper identischen TRPV6-Antikörper 429 durch Daniela Hirnet festgestellt (Hirnet et al., 2003).

Leider standen mir keine Plazenten von TRPV6-Knockout-Mäusen (Bianco et al., 2007) zur Verfügung. Hätte man diese ebenso für eine Immunpräzipitation verwendet, sollte das TRPV6-Protein nicht im Western Blot detektiert werden, da das TRPV6-Gen in diesen Mäusen vollständig deletiert wurde. Gleichzeitig wäre es ein zusätzlicher Beweis, dass es sich bei dem vom gegen das menschliche TRPV6-Protein gerichteten Präzipitationsantikörper isolierten Protein tatsächlich um das TRPV6-Protein handelt.

TRPV6 konnte bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen zum einen als mRNA, aber auch mittels Immunhistochemie als Protein im Uterus der Maus (Lee und Jeung, 2007) und in der Plazenta der Maus (Bernucci et al., 2006; Suzuki et al., 2008a; Lee et al., 2009) nachgewiesen werden. Suzuki *et al.* verglichen zusätzlich die Ergebnisse mit denen von Plazenten aus TRPV6-Knockout-Mäusen. Bernucci et al. konnte neben TRPV6 auch TRPV5 in den basalen und apikalen Plasmamembranen des Synzytiotrophoblasten immunhistochemisch nachweisen.

Bei diesen vier Arbeiten wurden allerdings jeweils Methoden verwendet, die auf mRNA-Basis arbeiten oder die das Protein nur im Gewebe selbst detektieren können (z.B. Immunhistochemie). Mit dem von mir verwendeten Ansatz kann das Protein aus dem Plazentagewebe isoliert und nachgewiesen werden.

Unter Verwendung größerer Mengen an Mausplazenten könnte das TRPV6-Protein bestimmt auch in größerem Umfang isoliert und mit weiteren Charakterisierungsmethoden, wie Gelelektrophoresen, Western Blot oder Massenspektrometrie näher untersucht werden. Hierbei wäre interessant, ob Annexin A2 und CyPB ebenfalls mit dem murinen TRPV6-Protein assoziiert sind.

5.2.1.2. Verwendbarkeit von verschiedenen Detergenzien für die mehrstufige Affinitätschromatographie

Beim Einsatz verschiedener Detergenzien für die mehrstufige Affinitätschromatographie von TRPV6 aus der mikrosomalen Fraktion humaner Plazenta zeigt sich, dass Natriumdeoxycholat von den ausgewählten Detergenzien am besten für die Methode geeignet ist. Natriumdeoxycholat habe ich bereits während meiner Diplomarbeit erfolgreich für die Solubilisierung und Aufreinigung des TRPV6-Proteins aus menschlicher Plazenta mittels Affinitätsreinigung angewandt (Stumpf, 2006). Außerdem konnte damit auch das mit TRPV6 interagierende Cyclophilin B isoliert werden. Dies bestätigt auch der Western Blot des Elutionsprofils der Calmodulinsäule (Abb. 13).

Dem zwitterionische Detergenz CHAPS, dessen hydrophober Teil, wie der von Natriumdeoxycholat und Digitonin, aus einem Steroidgerüst besteht (Rehm, 2006) werden ebenso gute Eigenschaften bei der Solubilisierung von Membranproteinen zugeschrieben. CHAPS ist in Bezug auf TRPV6 zwar gut zur Reinigung des Proteins geeignet, allerdings nicht zur Reinigung von an TRPV6 assoziiertem Cyclophilin B (Abb. 37). Unter diesen Bedingungen scheint die Interaktion zwischen beiden Proteinen nicht bestehen zu bleiben. Dieser Effekt kann auch bei weiteren, bisher unbekanntem TRPV6-Interaktionen auftreten. Daher ist dieses Detergenz für Solubilisierung von TRPV6-Proteinkomplexen nicht geeignet.

Bei der Solubilisierung mit dem nichtionischen Detergenz Nonidet P-40 und anschließender Affinitätschromatographie zeigen die konzentrierten Eluate im SDS-Gel ein schlechtes Laufverhalten (Abb. 38). Ein schlechtes Laufverhalten wurde bereits 1983 für Nonidet P-40-haltige Proben in der SDS-PAGE beobachtet (Marshall, 1983). Ursächlich kann zusätzlich sein, dass bei der Konzentrierung der Proteine nicht nur an Proteine gebundenes, sondern auch freies Detergenz konzentriert wird.

Warum freies Nonidet P-40 bei der Ultrafiltration des Säuleneluats bei einer Filtermembran mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa konzentriert wird, ist dabei unklar. Mit einem Molekulargewicht des Nonidet P-40-Monomers von 606 Da (Rehm, 2006) zählt das Molekül zwar zu den größeren Detergenzmolekülen, ist aber z.B. kleiner als das Triton-X-100-Molekül (650 Da) und insbesondere als das Digitonin-Molekül (1229 Da).

Nichtionische Detergenzien, wie Triton-X-100 oder Nonidet P-40 können in erhöhten Konzentrationen von über 1 % störend bei der Auftrennung von Proteinen in SDS-Gelen sein.

5.2.1.3. Dodecyl- β -D-maltosid (DDM) und Digitonin sind für die einstufige TRPV6-Affinitätschromatographie verwendbar

Die bisherige Vorgehensweise der TRPV6-Affinitätschromatographie mit einer Vorreinigung durch eine CaM-Säule mit anschließender EGTA-Elution zielte auf eine möglichst effiziente Aufreinigung des TRPV6-Proteins mit möglichst geringen Verunreinigungen ab (Abb. 53). Da der EGTA-Elutionsschritt zur Chelatierung und damit Entfernung von Ca^{2+} -Ionen führt, besteht die Gefahr, dass Ca^{2+} -abhängige Bindungen zwischen TRPV6 und anderen Proteinen zerstört und diese Interaktionen in späteren Analysen nicht detektiert werden können.

Bei der Reduzierung auf eine einstufige Vorgehensweise mit der Aufreinigung der Proteine ausschließlich über eine Antikörperaffinitätssäule werden verschiedene, nichtionische Detergenzien zur Solubilisierung der Membranproteine verwendet. Dabei sind nur die Detergenzien Dodecyl- β -D-maltosid (Abb. 42) und Digitonin (Abb. 43) ohne Einschränkungen für die Isolierung von TRPV6 aus Mikrosomen der humanen Plazenta geeignet (Tabelle 20 + Tabelle 21).

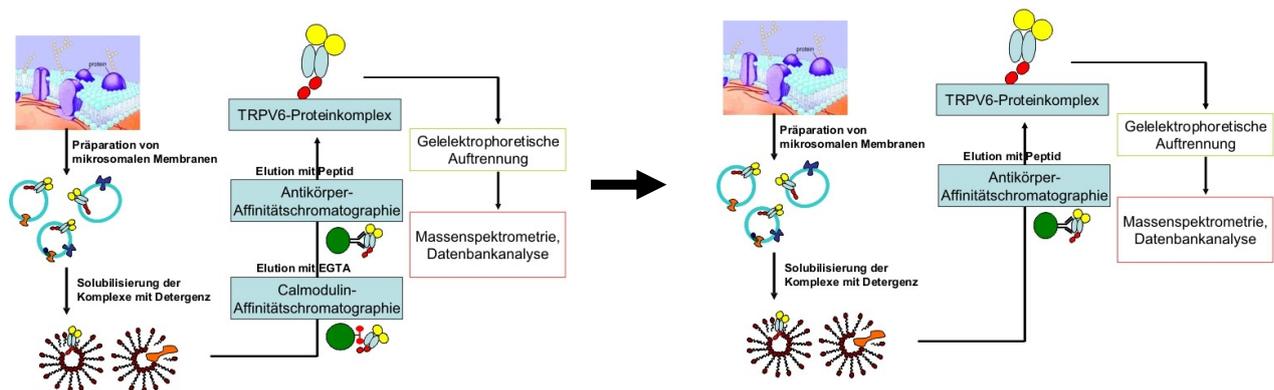


Abb. 53: Veränderung der TRPV6-Affinitätschromatographie durch Eliminierung des CaM-Vorreinigungsschritts.

Beide Detergenzien sind offensichtlich sehr gut zur Solubilisierung und Charakterisierung von Membranproteinkomplexen geeignet, wie sich bereits bei Proteinkomplexen der H^+/K^+ -ATPase (Shin und Sachs, 1996) und bei Proteinkomplexen in Mitochondrien (Herrmann et al., 2001) gezeigt hat. Digitonin hat allerdings den Nachteil, dass es Verunreinigungen enthält, die von Charge zu Charge schwanken und toxisch ist (Rehm, 2006).

5.3. TRPV6-Multiproteinkomplexe besitzen eine Größe von mindestens 440 kDa

Im Vergleich der vier Färbemethoden (Abb. 39) erreicht die „Blue Silver“-Färbung mit 1 µg BSA eine annähernde Nachweisgrenze (Rehm, 2006) wie die Silberfärbung nach Blum (Blum et al., 1987). Beide Färbemethoden sind somit für die Anwendung bei den Blue Native-Gelen mit anschließender MALDI-ToF-Massenspektrometrie der aufgetrennten Proteine geeignet.

Das Ergebnis der Immundetektionen der Blue Native-Gelelektrophoresen nach Solubilisierung mit DDM (Abb. 42) und Digitonin (Abb. 43) führt zunächst zu der Schlussfolgerung, dass TRPV6 auf Grund der erreichten Molekulargrößen der Signale im Western Blot von über 440 kDa in einem Proteinkomplex vorliegt. Auf Grund des über einen weiten Bereich erscheinenden TRPV6-Signals kann es sich dabei um enthaltene TRPV6-Proteinkomplexe unterschiedlicher Größe handeln oder um den gleichen Komplex, der aber aus verschiedenen Kompartimenten, wie endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat, Plasmamembran oder Endosomen gelöst wurde. Die in diesen Kompartimenten durchgeführten Modifikationen führen zu den verschiedenen Molekulargrößen der Komplexe. Als Ursache für die variablen TRPV6-Proteingrößen von TRPV6 in Endosomen beteiligt sein. Die β -Glukoronidase Klotho schneidet extrazellulär Zuckerreste vom Kanal in der Plasmamembran ab (Chang et al., 2005; Lu et al., 2008), ebenso wie bei seinem Verwandten TRPV5 (Chang et al., 2005) und modifiziert so die Aktivität aber auch das Molekulargewicht des TRPV6-Proteins. Die Endosomen dienen dem Recycling von Proteinen aus der Plasmamembran. Dies wurde bisher nur für TRPV5 (van de Graaf et al., 2008) gezeigt, ist aber auch bei TRPV6 denkbar. Im Recyclingprozess wird der TRPV6-Proteinkomplex langsam abgebaut und dadurch dessen Molekulargewicht stetig vermindert.

Für das Vorkommen in unterschiedlichen Kompartimenten sprechen auch die Ergebnisse von Membranfraktionierungsversuchen von Qi Zhang innerhalb seiner Dissertation in unserer Arbeitsgruppe (Zhang, 2008). Diese ergeben, dass das TRPV6-Protein hauptsächlich in der Apikalmembran der Synzytiotrophoblasten, also der Grenzschicht zwischen fetalem und maternalem Blutkreislauf vorkommt, immunhistologisch aber auch im ER detektiert wird. Dabei kommt, im Gegensatz zu den anderen isolierten Membranfraktionen, in der Apikalmembran fast ausschließlich die glykosylierte Form von TRPV6 vor.

Die Affinitätschromatographie nach Solubilisierung der Proteine mit Triton-X-100 führt nur zu einer geringen Mengen an solubiliertem Gesamtprotein (Abb. 44 A) und an TRPV6-Protein (Abb. 44 B). Deshalb ist dieses nichtionische Detergenz für diese Vorgehensweise weniger geeignet.

Die Identifikation der Proteine mittels MALDI-ToF-Massenspektrometrie führt nicht zur Detektion von TRPV6 in der Probe der Affinitätschromatographie, sowohl nach Solubilisierung mit DDM, als auch nach Solubilisierung mit Digitonin (Tabelle 22, Tabelle 23, Tabelle 24, Tabelle 25). Grund könnte eine zu geringe Menge an TRPV6 im Gel der 2. Dimension der BN-PAGE sein. Neben dem möglichen Proteinverlust beim Übertrag von der 1. zur 2. Dimension der Blue Native-Gelelektrophorese beschreibt Zhang *et al.* auch die niedrige Expression und schwere Solubilisierbarkeit der Membranproteine als denkbare Ursache (Zhang et al., 2010). Dadurch fällt die Proteinkonzentration unter das Detektionslimit des Massenspektrometers. Diese Vermutung, bestätigen auch die Ergebnisse der Diplomarbeit von Simone Kalinke in unserer Arbeitsgruppe (Kalinke, 2009). Sie konnte TRPV6 nach dem Einsatz von 2 g Mikrosomenprotein (gewonnen aus 300 g Plazentagewebe) für die Affinitätschromatographie im Gel der 1. Dimension der Blue Native-Gelelektrophorese massenspektrometrisch und via Western Blot nachweisen. Die von ihr verwendete ESI-Massenspektrometrie in Kombination mit einer nano-HPLC-Chromatographie ermöglicht es im Gegensatz zur MALDI-ToF-MS mehrere Proteine in einer Probe zu analysieren. Bei der ESI-MS kann somit auf die Auftrennung der Proteine in der 2. Dimension verzichtet werden. Der Proteinverlust beim Übertrag wird damit umgangen.

Um die Proteinverluste der in sehr geringer Konzentration vorliegenden Proteinen zu minimieren, könnte man die Probe vor der massenspektrometrischen Analyse z.B. mit der Methode der „in-tube digestion“ aufarbeiten. Hierbei wird der Proteinkomplex nicht gelelektrophoretisch aufgetrennt, sondern nach der Elution von der Affinitätssäule in hohen SDS-Konzentrationen inkubiert, danach in ein Acrylamidgel polymerisiert und anschließend tryptisch verdaut. Dieses im Jahr 2007 erstmal publizierte Verfahren (Yu et al., 2007), könnte eine alternative Vorgehensweise darstellen und wurde bereits im Rahmen der Diplomarbeit von Pascal Schalkowsky in unserer Arbeitsgruppe getestet (Schalkowsky, 2009). Hierbei konnte das TRPV6-Protein auch mittels ESI-MS/MS detektiert werden.

Basierend auf dem Ergebnis des Western Blots nach der Blue Native-Gelelektrophorese (Abb. 42 B + Abb. 43 B) und meinen massenspektrometrischen Ergebnissen, könnte der TRPV6-Proteinkomplex aus folgenden Proteinkomponenten bestehen:

<u>Protein</u>	<u>Molekulargewicht</u>
TRPV6 (83 kDa) → TRPV6-Tetramer	332 kDa
Calmodulin (CaM)	17 kDa
Annexin A2 (42 kDa)-S100A10 (11 kDa)-Tetramer	106 kDa
Cyclophilin B	20 kDa
Summe	475 kDa

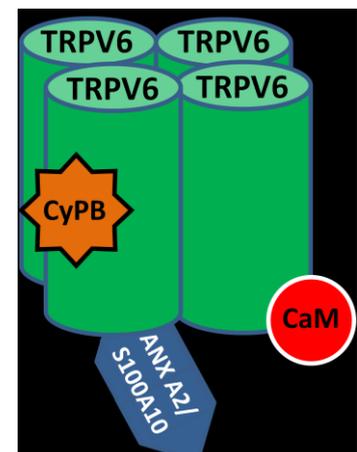


Abb. 54: Potentielle Bestandteile und kalkuliertes Molekulargewicht des in den Western Blots der Blue Native-Gelelektrophorese detektierten TRPV6-Proteinkomplexes. links: Die tabellarische Kalkulation des Molekulargewichts des potentiellen TRPV6-Proteinkomplexes ergibt einen Gesamtwert von 475 kDa; rechts: schematische Darstellung dieses TRPV6 Proteinkomplexes. Das TRPV6-Tetramer interagiert in diesem Schema jeweils mit einer Einheit der Proteine Calmodulin, Cyclophilin B und Annexin A2-S100A10.

Hierbei bindet jeweils ein Calmodulin, ein Cyclophilin B und ein Annexin A2-S100A10-Tetramer an das TRPV6-Tetramer. Van de Graaf und Kollegen gehen davon aus, dass auf Grund des TRPV6-Tetramers auch vier Interaktionsstellen für das Annexin A2-S100A10-Tetramer am Kanal existieren (van de Graaf et al., 2003). Folgt man dieser Auffassung, so ist denkbar, dass bis zu 4 Einheiten dieser Proteine, nämlich je eine Einheit jedes Proteins pro TRPV6-Kanal-Untereinheit, an den TRPV6-Proteinkomplex binden können. Durch die verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten der Interaktionsproteine mit dem TRPV6-Tetramer könnten Proteinkomplexe in einem Bereich von 332 kDa (TRPV6-Tetramer allein) bis 904 kDa (TRPV6-Tetramer plus je vier Einheiten der drei Proteine) entstehen. Detaillierte Studien über die einzelnen stöchiometrischen Zusammensetzungen von TRPV6 und seinen bekannten Interaktionspartnern sind bisher noch nicht bekannt.

Die Komponenten erfüllen im Komplex ihre zuvor bereits genannten Funktionen. Der TRPV6-Kanal dient dem Ca^{2+} -Transport, das Annexin A2-S100A10-Tetramer stabilisiert den Kanal in der Plasmamembran, Calmodulin reguliert den Ca^{2+} -Einstrom und Cyclophilin B hat aktivierende Auswirkungen auf den Kanal.

Natürlich sind weitere transiente Interaktionen mit dem TRPV6-Komplex denkbar. Mit einer ähnlichen Vorgehensweise konnten mit spezifischen Antikörpern gegen β -Untereinheiten die Multiproteinkomplexe von spannungsabhängigen Kalziumkanälen (Cav) aus Mäusehirnen isoliert werden. Diese Studie zeigt, dass das Cav-Proteom bis zu 200 unterschiedliche Proteine beinhaltet (Müller et al., 2010).

5.4. Die etablierte TRPV6-Isolierungsmethode ist auch auf den TRPC6-Kanal in Mastzellen und murinem Lungengewebe übertragbar

Trotz der Schwierigkeiten das stark in Lungengewebe (Hofmann et al., 1999; Corteling et al., 2004) und Mastzellen (Riccio et al., 2002) exprimiert TRPC6-Protein von den Affinitätsäulen zu eluieren, zeigt dieser Versuch, dass die zuvor etablierte Methode der einstufigen Antikörper-Affinitätschromatographie nach der Solubilisierung mit Dodecyl- β -D-maltosid auf andere TRP-Membranproteine und andere Gewebe übertragbar ist. Die Verwendung von

Dodecyl- β -D-maltosid (DDM) und dem zugehörigen Solubilisierungspuffer scheint eine gute Zusammensetzung zum Herauslösen von verschiedenen TRP-Proteinen und TRP-Proteinkomplexen aus den verschiedenen Zellen zu sein. Ausnahme ist allerdings das TRPV5-Protein bzw. der TRPV5-Protein-Komplex, wie meine Kollegin Janka Dörr in ihrer Dissertation gezeigt hat (Dörr, 2010). Das mit dem TRPV6-Protein stark homologe TRPV5 lässt sich schlecht mit DDM, dafür umso besser mit Triton-X-100 solubilisieren.

Zur Durchführung einer anschließenden Auftrennung und Analyse des TRPC6-Proteinkomplexes mittels Blue Native-PAGE ist allerdings die Elution des nativen Proteins bzw. Proteinkomplexes von der Antikörpersäule notwendig. Dies ist auf Grund der zu Elution notwendigen Denaturierung nicht mehr möglich.

6. Zusammenfassung

TRP-Proteine sind integrale Membranproteine, die Untereinheiten von Kationenkanälen bilden, die z.B. an der Schmerz und Temperaturwahrnehmung, der Absorption von Mg^{2+} und Ca^{2+} im Darm und in der Niere oder für die Freisetzung von Entzündungsmediatoren in Immunzellen verantwortlich sind.

Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte TRPV6-Protein stellt einen hochselektiven Ca^{2+} -Kanal dar, der für den tranzellulären Ca^{2+} -Transport in Endothelzellen des Dünndarms und der Plazenta verantwortlich ist und für den bisher noch kein hochaffiner Agonist bekannt ist. Das niedrig exprimierte, integrale Membranprotein konnte ich erstmal im Rahmen meiner Diplomarbeit aus humaner Plazenta zusammen mit Annexin A2 und Cyclophilin B (CyPB) anreichern. Diese putative Interaktion zwischen dem Ionenkanal und CyPB wird im Rahmen meiner Doktorarbeit mit Coimmunpräzipitation, Saccharosedichtegradientenzentrifugation, Peptidblotanalyse und GST-Pulldown-Analysen untersucht. Hierbei kann die TRPV6-CyPB-Interaktion in Immunpräzipitationen mit unabhängigen Antikörpern bestätigt werden. Die Ergebnisse der Dichtegradientenzentrifugation belegen die Existenz von TRPV6-Multimeren bzw. von TRPV6 enthaltenden Multiproteinkomplexen. Unter diesen Bedingungen ist allerdings keine CyPB-Assoziation mit dem TRPV6-Protein festzustellen. Das Einengen der Bindestelle von CyPB im TRPV6-Protein mittels Peptidblot- und GST-Pulldown-Analyse führt zur der potentiellen Bindungsstelle mit der minimalen Aminosäuresequenz $Y_{66}EDCKV_{71}$.

Meine Ergebnisse waren Ausgangspunkt für die funktionelle Charakterisierung der TRPV6-CyPB-Interaktion in *Xenopus laevis* Oozyten, die zeigt, dass CyPB den Ionenkanal aktiviert. Die Bindung zwischen beiden Proteinen ist offenbar wenig affin und scheint nur unter den gegebenen Solubilisierungsbedingungen nachweisbar.

Zur Erhaltung möglicher kalziumabhängiger Proteinbindungen wird die zuvor benutzte mehrstufige TRPV6-Affinitätschromatographie, bestehend aus einer CaM- und einer TRPV6-Antikörpersäule, durch eine einstufige Affinitätsreinigung ersetzt. Zur Solubilisierung und Isolierung des TRPV6-enthaltenden Proteinkomplexes eignen sich hierbei insbesondere die nichtionischen Detergenzien Dodecyl- β -D-maltosid (DDM) und Digitonin.

Zur Auftrennung und Untersuchung der isolierten TRPV6-Proteinkomplexe kann weiterhin eine zweidimensionale Blue Native-Gelelektrophorese (BN-PAGE) etabliert und die daraus isolierten Proteine massenspektrometrisch analysiert werden. Für die Auftrennung der TRPV6-Proteinkomplexe in der BN-PAGE eignen sich ebenfalls am besten die nichtionischen Detergenzien DDM und Digitonin. Das TRPV6-Protein wird nach der nativen BN-PAGE als Bestandteil eines oder mehrerer Proteinkomplexe mit einem Molekulargewicht von 440 - 670 kDa detektiert.

Abschließend wird die Übertragbarkeit der für TRPV6 etablierten Vorgehensweise zur Isolierung von Membranproteinkomplexen auf andere TRP-Kanalproteine in verschiedenen Geweben gezeigt. So kann TRPV6 aus Mausplazenta und das TRPC6-Membranprotein aus murinen Mastzellen und Mauslungengewebe mittels Coimmunpräzipitation und Affinitätschromatographie isoliert und spezifisch detektiert werden.

7. Anhang

7.1. Ergebnistabellen der MALDI-ToF-Massenspektrometrie

Tabelle 24: Ergebnisliste der mittels MALDI-ToF-MS signifikant identifizierten Proteine der Proteinspots aus dem Blue Native-Gel der Affinitätschromatographie nach Solubilisierung mit Dodecyl- β -D-Maltosid (siehe 4.5.1).

Spot	Ergebnis				
	Platz	Accession-Nr.	MW [Da]	Score Protein (Datenbankeintrag)	
1	1.	Mixture 1		293	gij71042280 + gjl619444 = dihydrolipoamide acetyltransferase
	2.	gij71042280	52997	219	Chain A, X-Ray Structure Of Alkaline Phosphatase From Human Placenta In Complex With 5'-Amp
	3.	gij13786807	55841	217	Chain A, Crystal Structure Of A Human Phosphatase
	4.	gij178468	56371	197	preplacental alkaline phosphatase type 1 (EC 3.1.3.1)
	5.	gij94721246	58259	194	placental alkaline phosphatase preproprotein [Homo sapiens]
	6.	gij16307118	58259	194	Alkaline phosphatase, placental (Regan isozyme) [Homo sapiens]
	7.	gij119591397	59938	190	alkaline phosphatase, placental (Regan isozyme) [Homo sapiens]
	8.	gij178464	57701	178	placental alkaline phosphatase precursor
	9.	gij178474	58200	175	alkaline phosphatase precursor [Homo sapiens]
	10.	gij178470	58189	152	preplacental alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1)
	11.	gij296798	57608	140	alkaline phosphatase [Homo sapiens]
	12.	gij15559552	57706	139	Alkaline phosphatase, placental-like 2 [Homo sapiens]
	13.	gij28625	57648	139	unnamed protein product [Homo sapiens]
	14.	gij119591400	57669	139	alkaline phosphatase, placental-like 2, isoform CRA_a [Homo sapiens]
	15.	gij157266296	57626	122	placental-like alkaline phosphatase preproprotein [Homo sapiens]
	16.	gij119591402	57497	122	alkaline phosphatase, placental-like 2, isoform CRA_c [Homo sapiens]
	17.	gij178419	57670	118	alkaline phosphatase precursor (EC 3.1.31.)
	18.	gij178428	57583	107	alkaline phosphatase
	19.	gij226207	65816	61	dihydrolipoamide acetyltransferase
	20.	gij6730582	15723	55	Chain A, Cellular Retinoic Acid Binding Protein Ii In Complex With A Synthetic Retinoic Acid (Ro-13 6307)
2	1.	gij109114537	189538	105	PREDICTED: clathrin heavy chain 1 isoform 3 [Macaca mulatta]
	2.	gij34364629	193170	104	hypothetical protein [Homo sapiens]
	3.	gij119614803	193703	104	clathrin, heavy polypeptide (Hc), isoform CRA_c [Homo sapiens]
	4.	gij4758012	193260	104	clathrin heavy chain 1 [Homo sapiens]
	5.	gij40788952	194332	104	KIAA0034 [Homo sapiens] = clathrin heavy chain 1
	6.	gij109114529	194044	103	PREDICTED: clathrin heavy chain 1 isoform 6 [Macaca mulatta]
	7.	gij119610611	22836	50	transmembrane protein 95, isoform CRA_a [Homo sapiens]
	8.	gij26454769	25193	50	TMEM95 protein [Homo sapiens]
	9.	gij1049217	63672	49	S-AKAP84
	10.	gij119614923	63681	49	A kinase (PRKA) anchor protein 1, isoform CRA_b [Homo sapiens]
	11.	gij119610612	26920	48	transmembrane protein 95, isoform CRA_b [Homo sapiens]
	12.	gij30315354	58937	46	regulator of G protein signaling protein [Homo sapiens]
	13.	gij62089002	42506	46	RAB40B, member RAS oncogene family variant [Homo sapiens]
	14.	gij11596859	20095	46	mitochondrial ribosomal protein L17 [Homo sapiens]
	15.	gij48146471	20065	46	MRPL17 [Homo sapiens]
	16.	gij1408232	187340	45	clathrin heavy chain 2
	17.	gij2506298	189020	45	Clathrin heavy chain 2 (CLH-22)
	18.	gij1335854	189099	45	muscle clathrin heavy chain
	19.	gij108860681	188993	45	clathrin, heavy polypeptide-like 1 [Homo sapiens]
	20.	gij119587006	16538	44	hCG1996772 [Homo sapiens]
3	1.	Mixture 1		210	gij71042280 + gjl4507021
	2.	Mixture 2		206	gij178470 + gjl4507021
	3.	gij71042280	52997	132	Chain A, X-Ray Structure Of Alkaline Phosphatase From Human Placenta In Complex With 5'-Amp
	4.	gij13786807	55841	129	Chain A, Crystal Structure Of A Human Phosphatase
	5.	gij178470	58189	126	preplacental alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1)
	6.	gij178468	56371	114	preplacental alkaline phosphatase type 1 (EC 3.1.3.1)
	7.	gij178464	57701	113	placental alkaline phosphatase precursor
	8.	gij94721246	58259	112	placental alkaline phosphatase preproprotein [Homo sapiens]

	9.	gi 16307118	58259	112	Alkaline phosphatase, placental (Regan isozyme) [Homo sapiens]
	10.	gi 119591397	59938	109	alkaline phosphatase, placental (Regan isozyme) [Homo sapiens]
	11.	gi 178474	58200	97	alkaline phosphatase precursor [Homo sapiens]
	12.	gi 296798	57608	85	alkaline phosphatase [Homo sapiens]
	13.	gi 119591402	57497	83	alkaline phosphatase, placental-like 2, isoform CRA_c [Homo sapiens]
	14.	gi 28625	57648	83	unnamed protein product [Homo sapiens]
	15.	gi 119591400	57669	83	alkaline phosphatase, placental-like 2, isoform CRA_a [Homo sapiens]
	16.	gi 178419	57670	83	alkaline phosphatase precursor (EC 3.1.31.)
	17.	gi 15559552	57706	72	Alkaline phosphatase, placental-like 2 [Homo sapiens]
	18.	gi 178428	57583	71	alkaline phosphatase
	19.	gi 157266296	57626	70	placental-like alkaline phosphatase preproprotein [Homo sapiens]
	20.	gi 4507021	102013	66	solute carrier family 4, anion exchanger, member 1 [Homo sapiens]
4	1.	gi 4507021	102013	80	solute carrier family 4, anion exchanger, member 1 [Homo sapiens]
	2.	gi 28714	102013	80	unnamed protein product [Homo sapiens] = 1, ähnlich 5
	3.	gi 68563369	102053	80	Solute carrier family 4, anion exchanger, member 1 (erythrocyte membrane protein band 3, Diego blood group) [Homo sapiens]
	4.	gi 89513702	101978	80	solute carrier family 4 anion exchanger member 1 variant [Homo sapiens]
	5.	gi 14277739	42623	69	Chain P, Crystal Structure Of The Cytoplasmic Domain Of Human Erythrocyte Band-3 Protein
	6.	gi 119571095	78497	58	JM11 protein, isoform CRA_c [Homo sapiens]
	7.	gi 119571094	78389	57	JM11 protein, isoform CRA_b [Homo sapiens]
	8.	gi 119597271	371236	47	A kinase (PRKA) anchor protein (yotiao) 9, isoform CRA_f [Homo sapiens]
	9.	gi 61966733	41486	45	hypothetical protein LOC388199 [Homo sapiens]
	10.	gi 134284357	46451	42	nuclear prelamin A recognition factor isoform d [Homo sapiens]
	11.	gi 119599532	13062	42	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B", alpha, isoform CRA_e [Homo sapiens]
	12.	gi 113402501	42022	42	PREDICTED: hypothetical protein [Homo sapiens]
	13.	gi 7019235	22234	42	AS12 protein [Homo sapiens]
	14.	gi 74272284	162364	42	membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 1 isoform c [Homo sapiens]
	15.	gi 52545550	42945	41	hypothetical protein [Homo sapiens]
	16.	gi 56204181	24179	41	RNA binding motif protein 34 [Homo sapiens]
	17.	gi 6912524	51979	41	nuclear prelamin A recognition factor isoform a [Homo sapiens]
	18.	gi 73920246	186817	40	Phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase C2 domain-containing beta polypeptide (Phosphoinositide 3-Kinase-C2-beta) (PtdIns-3-kinase C2 beta) (PI3K-C2beta) (C2-PI3K)
	19.	gi 15451926	186875	40	phosphoinositide-3-kinase, class 2, beta polypeptide [Homo sapiens]
	20.	gi 119630816	19967	40	hypothetical protein FLJ25067, isoform CRA_a [Homo sapiens]
5	1.	gi 10716563	67982	82	calnexin precursor [Homo sapiens]
	2.	gi 179832	67948	68	calnexin
	3.	gi 119626919	83685	48	WD repeat domain 78, isoform CRA_b [Homo sapiens]
	4.	gi 119627680	437096	46	microtubule-actin crosslinking factor 1, isoform CRA_b [Homo sapiens]
	5.	gi 119626920	87626	46	WD repeat domain 78, isoform CRA_c [Homo sapiens]
	6.	gi 119627682	455885	46	microtubule-actin crosslinking factor 1, isoform CRA_d [Homo sapiens]
	7.	gi 55961044	51437	46	ligatin [Homo sapiens]
	8.	gi 21755998	14136	45	unnamed protein product [Homo sapiens]
	9.	gi 74756797	95254	45	WD repeat-containing protein 78
	10.	gi 46276887	95295	44	WD repeat domain 78 isoform 1 [Homo sapiens]
	11.	gi 40788319	117079	44	KIAA0661 protein [Homo sapiens]
	12.	gi 17426161	603087	44	macrophin 1 isoform 4 [Homo sapiens]
	13.	gi 10439715	30832	43	unnamed protein product [Homo sapiens]
	14.	gi 4884154	60893	43	hypothetical protein [Homo sapiens]
	15.	gi 34148762	31394	43	truncated zinc finger protein 445 isoform [Homo sapiens]
	16.	gi 7770211	8179	43	PRO2610 [Homo sapiens]
	17.	gi 57162102	8968	42	additional sex combs like 1 (Drosophila) [Homo sapiens]
	18.	gi 114609943	45918	42	PREDICTED: sorting nexin 9 isoform 2 [Pan troglodytes]
	19.	gi 158256764	114221	41	unnamed protein product [Homo sapiens]
	20.	gi 7662230	114350	41	ring finger protein 40 [Homo sapiens]
6	1.	gi 71296885	60216	70	Monoamine oxidase A [Homo sapiens]
	2.	gi 4557735	60157	69	monoamine oxidase A [Homo sapiens]
	3.	gi 62898730	60131	69	monoamine oxidase A variant [Homo sapiens]
	4.	gi 14149617	70936	59	nuclear receptor coactivator 4 [Homo sapiens]
	5.	gi 469146	70910	59	Ret fused gene [Homo sapiens]
	6.	gi 62088558	409946	57	Transformation/transcription domain-associated protein variant [Homo sapiens]
	7.	gi 4151929	441752	56	PCAF-associated factor 400 [Homo sapiens]
	8.	gi 116242829	441766	56	Transformation/transcription domain-associated protein (350/400 kDa PCAF-associated factor) (PAF350/400) (STAF40) (Tra1 homolog)
	9.	gi 119597106	441865	56	transformation/transcription domain-associated protein, isoform CRA_h [Homo sapiens]
	10.	gi 119597101	447976	55	transformation/transcription domain-associated protein, isoform CRA_c [Homo sapiens]

				sapiens]
	11. gi 119597103	442839	54	transformation/transcription domain-associated protein, isoform CRA_e [Homo sapiens]
	12. gi 4507691	438410	54	transformation/transcription domain-associated protein [Homo sapiens]
	13. gi 34527278	29223	48	unnamed protein product [Homo sapiens]
	14. gi 119622729	24511	47	single immunoglobulin and toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain [Homo sapiens]
	15. gi 48146793	46231	47	SIGIRR [Homo sapiens]
	16. gi 11141877	46249	46	single Ig IL-1R-related molecule [Homo sapiens]
	17. gi 119587603	13353	46	hCG2045229 [Homo sapiens]
	18. gi 119571802	12993	46	hCG1795123 [Homo sapiens]
	19. gi 113422713	25192	45	PREDICTED: similar to single Ig IL-1R-related molecule [Homo sapiens]
	20. gi 67189970	60237	45	neutrophil cytosolic factor 2 [Homo sapiens]
7	1. gi 62087952	48955	78	ankyrin repeat domain 11 variant [Homo sapiens]
	2. gi 42767029	299641	53	ankyrin repeat-containing cofactor-1 [Homo sapiens]
	3. gi 56676397	299613	53	ankyrin repeat domain 11 [Homo sapiens]
	4. gi 50400336	299770	53	Ankyrin repeat domain-containing protein 11 (Ankyrin repeat-containing cofactor 1)
	5. gi 58293781	12180	50	hypothetical protein LOC388701 [Homo sapiens]
	6. gi 46362467	50431	50	ANKRD11 protein [Homo sapiens]
	7. gi 119615361	174791	49	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 3, isoform CRA_b [Homo sapiens]
	8. gi 10092601	177682	49	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 3 [Homo sapiens]
	9. gi 158255424	121928	44	unnamed protein product [Homo sapiens]
	10. gi 88943544	8535	44	PREDICTED: hypothetical protein [Homo sapiens]
	11. gi 119620556	32766	43	hypothetical protein FLJ40298, isoform CRA_c [Homo sapiens]
	12. gi 119603068	74348	43	phosphodiesterase 6B, cGMP-specific, rod, beta (congenital stationary night blindness 3, autosomal dominant), isoform CRA_b [Homo sapiens]
	13. gi 33570238	9889	43	immunoglobulin kappa chain variable region [Homo sapiens]
	14. gi 63102224	147577	43	EIF4G3 protein [Homo sapiens]
	15. gi 16553186	61530	42	unnamed protein product [Homo sapiens]
	16. gi 29126885	79252	42	similar to Origin recognition complex subunit 3 [Homo sapiens]
	17. gi 119587136	206034	42	ankyrin repeat domain 11, isoform CRA_b [Homo sapiens]
	18. gi 17148515	37412	41	ADAMTS-13 protein, truncated variant [Homo sapiens]
	19. gi 55976611	86198	41	RNA-binding protein 28 (RNA-binding motif protein 28)
	20. gi 62896991	86126	41	RNA binding motif protein 28 variant [Homo sapiens]
8	1. gi 181213	58362	75	cytochrome P-450-Arom
	2. gi 13904858	58358	73	cytochrome P450, family 19 [Homo sapiens]
	3. gi 28847	58331	73	unnamed protein product [Homo sapiens] = 1
	4. gi 71084088	58418	73	cytochrome P450 subfamily 19 subfamily A polypeptide 1 [Homo sapiens]
	5. gi 23271165	58348	73	Cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1 [Homo sapiens]
	6. gi 78070747	58388	73	Cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1 [Homo sapiens]
	7. gi 181288	49000	64	cytochrome P-450 aromatase
	8. gi 179000	48996	63	aromatase
	9. gi 158256988	58344	63	unnamed protein product [Homo sapiens]
	10. gi 32481927	110982	60	RAI14 isoform [Homo sapiens]
	11. gi 13470086	110601	60	retinoic acid induced 14 [Homo sapiens]
	12. gi 13569962	22328	59	RAB1B, member RAS oncogene family [Homo sapiens]
	13. gi 49065350	22355	59	RAB1B [Homo sapiens]
	14. gi 31418642	110617	59	Retinoic acid induced 14 [Homo sapiens]
	15. gi 108860920	110601	59	Ankycorbin (Ankyrin repeat and coiled-coil structure-containing protein) (Retinoic acid-induced protein 14) (Novel retinal pigment epithelial cell protein)
	16. gi 7243049	111589	56	KIAA1334 protein [Homo sapiens]
	17. gi 13431717	224681	51	Myosin-13 (Myosin heavy chain 13) (Myosin heavy chain, skeletal muscle, extraocular) (MyHC-eo)
	18. gi 110624781	224605	51	myosin, heavy polypeptide 13, skeletal muscle [Homo sapiens]
	19. gi 32425486	22600	51	MYEF2 protein [Homo sapiens]
	20. gi 71042077	20825	51	Chain A, Solution Structure Of The Anti-Apoptotic Protein Bcl-XI In Complex With "sar By Nmr" Ligands
9	1. gi 11935049	66198	72	keratin 1 [Homo sapiens]
	2. gi 119395750	66170	72	keratin 1 [Homo sapiens]
	3. gi 119605949	141497	65	CASK interacting protein 1, isoform CRA_a [Homo sapiens]
	4. gi 18079216	150292	63	CASK interacting protein 1 [Homo sapiens]
	5. gi 1346343	66149	62	Keratin, type II cytoskeletal 1 (Cytokeratin-1) (CK-1) (Keratin-1) (K1) (67 kDa cyto keratin) (Hair alpha protein)
	6. gi 119590454	24200	58	EDAR-associated death domain, isoform CRA_b [Homo sapiens]
	7. gi 119620556	32766	57	hypothetical protein FLJ40298, isoform CRA_c [Homo sapiens]
	8. gi 50949477	7808	53	hypothetical protein [Homo sapiens]
	9. gi 21595200	32463	49	similar to evidence:NAS~putative~unclassifiable [Homo sapiens]
	10. gi 763111	60144	49	desmolase [Homo sapiens]
	11. gi 153218646	60178	49	cytochrome P450, subfamily XIA isoform a precursor [Homo sapiens]
	12. gi 386854	52928	48	type II keratin subunit protein

	13.	qil7242967	120084	47	KIAA1306 protein [Homo sapiens]
	14.	qil89037763	229215	47	PREDICTED: similar to DVL-binding protein DAPLE isoform 9 [Homo sapiens]
	15.	qil148762940	229231	47	DVL-binding protein DAPLE [Homo sapiens]
	16.	qil113424943	229922	47	PREDICTED: similar to DVL-binding protein DAPLE isoform 2 [Homo sapiens]
	17.	qil156630841	146625	46	Uncharacterized protein KIAA2030
	18.	qil119608790	20434	46	hypothetical protein FLJ20433, isoform CRA_d [Homo sapiens]
	19.	qil119620422	3745	46	peroxisome biogenesis factor 13, isoform CRA_a [Homo sapiens]
	20.	qil82571749	27500	45	TRA@ protein [Homo sapiens]
10	1.	qil4501885	42052	111	beta actin [Homo sapiens]
	2.	qil62897671	42036	111	beta actin variant [Homo sapiens]
	3.	qil62897409	42038	111	beta actin variant [Homo sapiens]
	4.	qil62897625	42080	110	beta actin variant [Homo sapiens]
	5.	qil15277503	40536	96	ACTB protein [Homo sapiens]
	6.	qil14250401	41321	94	actin, beta [Homo sapiens]
	7.	qil16924319	40819	94	Unknown (protein for IMAGE:3538275) [Homo sapiens] = 1
	8.	qil4501887	42108	94	actin, gamma 1 propeptide [Homo sapiens]
	9.	qil16359158	42078	93	Actin, beta [Homo sapiens]
	10.	qil28336	42128	92	mutant beta-actin (beta'-actin) [Homo sapiens]
	11.	qil178045	26147	59	gamma-actin
	12.	qil40226101	29678	56	ACTG1 protein [Homo sapiens]
	13.	qil83759095	32491	54	PLXNB2 protein [Homo sapiens]
	14.	qil119607748	13907	52	hCG15971, isoform CRA_b [Homo sapiens]
	15.	qil16306948	17998	51	Unknown (protein for IMAGE:3897065) [Homo sapiens]
	16.	qil56204817	32370	51	actin, alpha 1, skeletal muscle [Homo sapiens]
	17.	qil51476610	12828	49	hypothetical protein [Homo sapiens]
	18.	qil40225338	18724	48	ACTG1 protein [Homo sapiens]
	19.	qil4501889	42249	48	actin, gamma 2 propeptide [Homo sapiens]
	20.	qil49168516	42297	48	ACTG2 [Homo sapiens]
11	1.	qil386780	40303	96	3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene
	2.	qil4504507	42510	94	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 1 [Homo sapiens]
	3.	qil179468	42523	94	3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta-5-delta-4-isomerase
	4.	qil56203572	42712	79	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta-and steroid delta-isomerase 1 [Homo sapiens]
	5.	qil119577108	42725	79	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 1, isoform CRA_b [Homo sapiens]
	6.	qil973228	44660	64	11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 [Homo sapiens]
	7.	qil119587704	23748	56	transgelin, isoform CRA_c [Homo sapiens]
	8.	qil48255905	22653	56	transgelin [Homo sapiens]
	9.	qil119392083	44612	52	hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 2 [Homo sapiens]
	10.	qil565082	44626	52	11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II
	11.	qil40352986	44600	52	Hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 2 [Homo sapiens]
	12.	qil119587702	17202	48	transgelin, isoform CRA_a [Homo sapiens]
	13.	qil119588479	44714	48	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, isoform CRA_b [Homo sapiens]
	14.	qil9910280	177819	46	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase-like 1 isoform 1 [Homo sapiens]
	15.	qil119595426	256666	45	myosin VIIA, isoform CRA_c [Homo sapiens]
	16.	qil115511016	251855	45	myosin VIIA [Homo sapiens]
	17.	qil119627560	14710	44	peptidylprolyl isomerase H (cyclophilin H), isoform CRA_e [Homo sapiens]
	18.	qil119595428	252182	44	myosin VIIA, isoform CRA_e [Homo sapiens]
	19.	qil1613788	251679	44	myosin VIIa [Homo sapiens]
	20.	qil9297020	256412	44	Myosin-VIIa
12	1.	qil119597993	32600	78	annexin A2, isoform CRA_c [Homo sapiens]
	2.	qil56967118	36631	74	Chain A, Structure Of Human Annexin A2 In The Presence Of Calcium Ions
	3.	qil4757756	38808	73	annexin A2 isoform 2 [Homo sapiens]
	4.	qil56966699	38866	73	Chain A, Annexin A2: Does It Induce Membrane Aggregation By A New Multimeric State Of The Protein
	5.	qil18645167	38780	73	Annexin A2 [Homo sapiens]
	6.	qil16306978	38822	73	Annexin A2 [Homo sapiens]
	7.	qil73909156	40731	72	ANXA2 protein [Homo sapiens]
	8.	qil34364597	40613	69	hypothetical protein [Homo sapiens] = 9
	9.	qil50845388	40671	69	annexin A2 isoform 1 [Homo sapiens]
	10.	qil114794644	35448	60	Chain A, Human Annexin A2 With Heparin Tetrasaccharide Bound
	11.	qil2477513	97071	52	F25965_3 [Homo sapiens]
	12.	qil119608211	129079	50	spectrin, alpha, non-erythrocytic 1 (alpha-fodrin), isoform CRA_a [Homo sapiens]
	13.	qil119593558	52338	50	guanylate binding protein 3, isoform CRA_b [Homo sapiens]
	14.	qil7023332	52253	50	unnamed protein product [Homo sapiens]
	15.	qil119580488	39319	48	apolipoprotein L, 4, isoform CRA_a [Homo sapiens]
	16.	qil22035657	39254	48	apolipoprotein L4 isoform 2 precursor [Homo sapiens]
	17.	qil119611919	187061	46	phosphoinositide-3-kinase, class 2, beta polypeptide, isoform CRA_a [Homo sapiens]

	18.	qil3954946	184101	46	PI-3 kinase [Homo sapiens]
	19.	qil68533067	187981	46	PIK3C2B variant protein [Homo sapiens]
	20.	qil73920246	186817	45	Phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase C2 domain-containing beta polypeptide (Phosphoinositide 3-Kinase-C2-beta) (PtdIns-3-kinase C2 beta) (PI3K-C2beta) (C2-PI3K)
13	1.	qil27923959	374544	68	Bullous pemphigoid antigen 1, isoforms 1/2/3/4/5/8 (230 kDa bullous pemphigoid antigen) (BPA) (Hemidesmosomal plaque protein) (Dystonia musculorum protein) (Dystonin)
	2.	qil119624862	316436	64	dystonin, isoform CRA_b [Homo sapiens]
	3.	qil80478734	84580	56	Hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM) [Homo sapiens]
	4.	qil119571303	29390	56	spectrin domain with coiled-coils 1, isoform CRA_d [Homo sapiens]
	5.	qil20911035	57703	55	peptidylprolyl isomerase-like 4 [Homo sapiens]
	6.	qil119573617	28164	51	tropomyosin 3, isoform CRA_d [Homo sapiens]
	7.	qil50949586	96992	51	hypothetical protein [Homo sapiens]
	8.	qil110225358	96978	51	tetratricopeptide repeat domain 7A [Homo sapiens]
	9.	qil59676587	54945	50	PRAME family member 8 [Homo sapiens]
	10.	qil113403763	54945	50	PREDICTED: similar to PRAME family member 8 [Homo sapiens]
	11.	qil84105506	99788	50	TTC7A protein [Homo sapiens]
	12.	qil5803171	31422	50	Src-like-adaptor [Homo sapiens]
	13.	qil119568185	45830	49	peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 4, isoform CRA_b [Homo sapiens]
	14.	qil54696850	31454	49	Src-like-adaptor [Homo sapiens]
	15.	qil119571112	66202	48	OTU domain containing 5, isoform CRA_e [Homo sapiens]
	16.	qil119610443	25318	48	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 5, p101, isoform CRA_b [Homo sapiens]
	17.	qil119571108	68991	47	OTU domain containing 5, isoform CRA_b [Homo sapiens]
	18.	qil20380411	60229	47	OTUD5 protein [Homo sapiens]
	19.	qil339715	95191	47	tyrosine kinase (FER)
	20.	qil119964721	95205	47	fer (fps/fes related) tyrosine kinase (phosphoprotein NCP94) [Homo sapiens]
14	1.	qil38492827	15141	99	Chain B, Globular Head Of The Complement System Protein C1q
	2.	qil573114	24154	87	C1q B-chain precursor [Homo sapiens]
	3.	qil150036344	24592	87	complement component 1, q subcomponent, B chain [Homo sapiens]
	4.	qil399140	26670	84	Complement C1q subcomponent subunit B precursor
	5.	qil87298828	26933	84	complement component 1, q subcomponent, B chain precursor [Homo sapiens]
	6.	qil5802988	17690	59	B-cell translocation gene 2 [Homo sapiens]
	7.	qil119597657	46808	53	FERM domain containing 5, isoform CRA_b [Homo sapiens]
	8.	qil113426976	8028	53	PREDICTED: hypothetical protein [Homo sapiens]
	9.	qil119597393	538500	49	hCG19253, isoform CRA_c [Homo sapiens]
	10.	qil119597394	537544	49	hCG19253, isoform CRA_d [Homo sapiens]
	11.	qil119592501	85864	47	zinc finger protein 600, isoform CRA_a [Homo sapiens]
	12.	qil119589752	13456	47	amino-terminal enhancer of split, isoform CRA_f [Homo sapiens]
	13.	qil42734366	49737	47	mast cell immunoreceptor signal transducer [Homo sapiens]
	14.	qil41019528	568304	47	Protein piccolo (Aczonin)
	15.	qil119597391	580541	46	hCG19253, isoform CRA_a [Homo sapiens]
	16.	qil119597392	581497	46	hCG19253, isoform CRA_b [Homo sapiens]
	17.	qil119568212	190677	46	hCG1812738, isoform CRA_a [Homo sapiens]
	18.	qil150378539	562179	46	piccolo isoform 1 [Homo sapiens]
	19.	qil150170670	539210	45	piccolo isoform 2 [Homo sapiens]
	20.	qil119575434	32473	45	hCG1744899 [Homo sapiens]
15	1.	qil4506743	24475	70	ribosomal protein S8 [Homo sapiens]
	2.	qil119627428	27743	66	ribosomal protein S8, isoform CRA_a [Homo sapiens]
	3.	qil73977185	22094	56	PREDICTED: similar to ribosomal protein S8 isoform 7 [Canis familiaris]
	4.	qil10435275	35421	56	unnamed protein product [Homo sapiens]
	5.	qil119606190	10383	54	hypothetical protein MGC13114, isoform CRA_a [Homo sapiens]
	6.	qil124517695	128113	51	hypothetical protein LOC57730 [Homo sapiens]
	7.	qil119598292	60773	46	pyruvate kinase, muscle, isoform CRA_c [Homo sapiens]
	8.	qil119613259	68330	46	stromal interaction molecule 2, isoform CRA_a [Homo sapiens]
	9.	qil30047763	30062	45	METRNL protein [Homo sapiens]
	10.	qil119586119	55883	45	cyclin-dependent kinase-like 1 (CDC2-related kinase), isoform CRA_b [Homo sapiens]
	11.	qil179337	112562	44	basonuclin
	12.	qil157276588	112498	44	basonuclin 1 [Homo sapiens]
	13.	qil114657944	62125	43	PREDICTED: pyruvate kinase 3 isoform 2 [Pan troglodytes]
	14.	qil93102401	20281	42	hypothetical protein LOC84326 isoform g [Homo sapiens]
	15.	qil119583003	340740	41	vacuolar protein sorting 13A (yeast), isoform CRA_c [Homo sapiens]
	16.	qil119620437	48147	41	poly(A) polymerase gamma, isoform CRA_d [Homo sapiens]
	17.	qil119583001	341636	41	vacuolar protein sorting 13A (yeast), isoform CRA_a [Homo sapiens]
	18.	qil13540527	42853	41	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 4 [Homo sapiens]
	19.	qil10434565	41285	41	unnamed protein product [Homo sapiens]
	20.	qil93102391	22429	41	hypothetical protein LOC84326 isoform b [Homo sapiens]
16	1.	qil38114878	23417	68	RPL13A protein [Homo sapiens]

	2.	gi 62897053	23600	68	ribosomal protein L13a variant [Homo sapiens]
	3.	gi 6912634	23619	67	ribosomal protein L13a [Homo sapiens]
	4.	gi 33337718	23704	66	FWP004 [Homo sapiens] = 1
	5.	gi 13129032	36731	56	hypothetical protein LOC79025 [Homo sapiens]
	6.	gi 89033540	23661	52	PREDICTED: similar to ribosomal protein L13a isoform 1 [Homo sapiens]
	7.	gi 13569889	31360	49	tetraspanin 14 [Homo sapiens]
	8.	gi 119616975	43319	42	hCG1642672 [Homo sapiens]
	9.	gi 119629122	14168	42	hCG2038513 [Homo sapiens]
	10.	gi 119572387	44204	41	SH2-B homolog, isoform CRA_d [Homo sapiens]
	11.	gi 119586453	15798	41	TERF1 (TRF1)-interacting nuclear factor 2, isoform CRA_b [Homo sapiens]
	12.	gi 113412660	37481	40	PREDICTED: hypothetical protein [Homo sapiens]
	13.	gi 31874248	13086	40	hypothetical protein [Homo sapiens]
	14.	gi 423121	2242	40	RNA-binding protein TIAR - human (fragment)
	15.	gi 113417206	16407	40	PREDICTED: similar to THO complex 3 [Homo sapiens]
	16.	gi 27881482	108014	39	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide RIG-I [Homo sapiens]
	17.	gi 4405795	108028	39	RNA helicase [Homo sapiens]
	18.	gi 89037068	21118	39	PREDICTED: similar to ribosomal protein L13a isoform 2 [Homo sapiens]
	19.	gi 114678471	16720	39	PREDICTED: similar to ribosomal protein L13a isoform 5 [Pan troglodytes]
	20.	gi 111494155	16706	39	RPL13A protein [Homo sapiens]
17	1.	gi 16076266	8712	68	immunoglobulin heavy chain variable region [Homo sapiens]
	2.	gi 159163831	14879	59	Chain A, Solution Structure Of The 1st Cap-Gly Domain In Human Clip- 170RESTIN
	3.	gi 12005493	24396	57	NPD011 [Homo sapiens]
	4.	gi 119580338	8420	54	selenoprotein M [Homo sapiens]
	5.	gi 119569462	88242	51	Histidine acid phosphatase domain containing 1, isoform CRA_b [Homo sapiens]
	6.	gi 119569464	90541	51	Histidine acid phosphatase domain containing 1, isoform CRA_d [Homo sapiens]
	7.	gi 4378937	10587	50	immunoglobulin heavy chain variable region [Homo sapiens]
	8.	gi 13529026	42705	48	DTNA protein [Homo sapiens]
	9.	gi 42717994	43107	48	dystrobrevin alpha isoform 7 [Homo sapiens]
	10.	gi 2149318	43140	48	dystrobrevin isoform DTN-3 [Homo sapiens]
	11.	gi 3550289	43106	48	alpha-dystrobrevin-3 [Homo sapiens]
	12.	gi 119628455	532488	47	dynein, axonemal, heavy polypeptide 5 [Homo sapiens]
	13.	gi 157276588	112498	45	basonuclin 1 [Homo sapiens]
	14.	gi 38492828	14451	45	Chain C, Globular Head Of The Complement System Protein C1q
	15.	gi 32189362	133984	45	PTPRF interacting protein alpha 3 [Homo sapiens]
	16.	gi 75517675	134000	45	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, f polypeptide (PTPRF), interacting protein (liprin), alpha 3 [Homo sapiens]
	17.	gi 55959150	15287	44	nuclear distribution gene C homolog (A. nidulans) [Homo sapiens]
	18.	gi 55770888	163337	43	early endosome antigen 1, 162kD [Homo sapiens]
	19.	gi 119585645	195717	43	polybromo 1, isoform CRA_c [Homo sapiens]
	20.	gi 73921624	194080	42	Protein polybromo-1 (hPB1) (Polybromo-1D) (BRG1-associated factor 180) (BAF180)
18	1.	Mixture 1		151	gi 40354192 + gi 47132620
	2.	gi 40354192	59020	79	keratin 10 [Homo sapiens]
	3.	gi 28317	59720	78	unnamed protein product [Homo sapiens] = 2
	4.	gi 147744568	59703	78	Keratin, type I cytoskeletal 10 (Cytokeratin-10) (CK-10) (Keratin-10) (K10)
	5.	gi 119581085	63536	77	keratin 10 (epidermolytic hyperkeratosis; keratosis palmaris et plantaris), isoform CRA_b [Homo sapiens]
	6.	gi 186629	39832	76	keratin 10
	7.	gi 47132620	65678	63	keratin 2 [Homo sapiens]
	8.	gi 40352781	140971	56	STAG1 protein [Homo sapiens]
	9.	gi 623409	57384	56	keratin 10
	10.	gi 62243696	145305	55	stromal antigen 1 [Homo sapiens]
	11.	gi 68533101	147272	55	STAG1 variant protein [Homo sapiens]
	12.	gi 3954954	13672	53	immunoglobulin heavy chain Fab fragment [Homo sapiens]
	13.	gi 113422578	6807	51	PREDICTED: hypothetical protein [Homo sapiens]
	14.	gi 179337	112562	49	basonuclin
	15.	gi 547754	66110	46	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal (Cytokeratin-2e) (K2e) (CK 2e) (keratin-2)
	16.	gi 181649	59010	45	terminal DONT
	17.	gi 26007035	58913	45	DNA nucleotidyltransferase (Terminal addition enzyme) (Terminal deoxynucleotidyltransferase) (Terminal transferase)
	18.	gi 339437	58785	45	terminal transferase
	19.	gi 63054850	59012	45	terminal deoxynucleotidyltransferase isoform 1 [Homo sapiens]
	20.	gi 63054852	58884	45	terminal deoxynucleotidyltransferase isoform 2 [Homo sapiens]
19	1.	gi 763111	60144	153	desmolase [Homo sapiens]
	2.	gi 153218646	60178	153	cytochrome P450, subfamily XIA isoform a precursor [Homo sapiens]
	3.	gi 181376	60199	152	cholesterol side-chain cleavage enzyme P450scc (EC 1.14.15.67)
	4.	gi 153218654	42182	145	cytochrome P450, subfamily XIA isoform b [Homo sapiens]
	5.	gi 158258034	42110	145	unnamed protein product [Homo sapiens] = 2
	6.	gi 13994151	36505	62	PDZ and LIM domain 1 (elfin) [Homo sapiens]
	7.	gi 119570396	27841	51	PDZ and LIM domain 1 (elfin), isoform CRA_c [Homo sapiens]

	8.	qil114631934	30199	49	PREDICTED: similar to PDZ and LIM domain 1 (elfin) isoform 2 [Pan troglodytes]
	9.	qil112789896	31710	48	MHC class I antigen [Homo sapiens]
	10.	qil23271915	50818	47	ZNF25 protein [Homo sapiens]
	11.	qil55660901	50804	47	zinc finger protein 25 [Homo sapiens]
	12.	qil1905874	36604	45	carboxyl terminal LIM domain protein [Homo sapiens]
	13.	qil7076980	12568	45	hypothetical protein [Homo sapiens]
	14.	qil189438	27976	44	cytochrome P-450-scc
	15.	qil481995	14177	43	Ig kappa chain - human
	16.	qil119586221	9167	43	hCG2039848 [Homo sapiens]
	17.	qil6466068	30293	43	ATP sulfurylase/APS kinase isoform SK2 [Homo sapiens]
	18.	qil119574613	128498	42	AT rich interactive domain 5B (MRF1-like), isoform CRA_c [Homo sapiens]
	19.	qil109103707	34747	41	PREDICTED: similar to ubiquitin specific protease 39 isoform 2 [Macaca mulatta]
	20.	qil56203495	12868	41	OTTHUMP00000017056 [Homo sapiens]
20	1.	qil4501887	42108	88	actin, gamma 1 propeptide [Homo sapiens]
	2.	qil4501885	42052	88	beta actin [Homo sapiens]
	3.	qil62897671	42036	88	beta actin variant [Homo sapiens]
	4.	qil62897409	42038	88	beta actin variant [Homo sapiens]
	5.	qil62897625	42080	87	beta actin variant [Homo sapiens]
	6.	qil15277503	40536	74	ACTB protein [Homo sapiens]
	7.	qil14250401	41321	73	actin, beta [Homo sapiens]
	8.	qil16924319	40819	73	Unknown (protein for IMAGE:3538275) [Homo sapiens]
	9.	qil16359158	42078	72	Actin, beta [Homo sapiens]
	10.	qil28336	42128	71	mutant beta-actin (beta'-actin) [Homo sapiens]
	11.	qil119605301	3457	50	hCG2045451 [Homo sapiens]
	12.	qil119607748	13907	49	hCG15971, isoform CRA_b [Homo sapiens]
	13.	qil24659535	34493	49	MGC34761 protein [Homo sapiens]
	14.	qil33150842	34291	49	hypothetical protein [Homo sapiens]
	15.	qil119628602	25277	48	hCG2020802 [Homo sapiens]
	16.	qil52545771	92133	46	hypothetical protein [Homo sapiens]
	17.	qil51476610	12828	46	hypothetical protein [Homo sapiens]
	18.	qil119617485	63458	46	advillin, isoform CRA_a [Homo sapiens]
	19.	qil7020654	38263	45	unnamed protein product [Homo sapiens]
	20.	qil119850659	129616	44	CROCC protein [Homo sapiens]
21	1.	qil862457	83648	69	enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase alpha-subunit of trifunctional protein [Homo sapiens]
	2.	qil20127408	83688	69	mitochondrial trifunctional protein, alpha subunit precursor [Homo sapiens]
	3.	qil595267	83730	69	78 kDa gastrin-binding protein
	4.	qil62702215	59149	58	unknown [Homo sapiens]
	5.	qil119621109	65600	57	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), alpha subunit, isoform CRA_b [Homo sapiens]
	6.	qil2905630	8115	52	macrophage inflammatory protein 2 alpha [Homo sapiens]
	7.	qil119580713	12381	44	hCG2014776 [Homo sapiens]
	8.	qil30704548	73811	42	RHOT1 protein [Homo sapiens]
	9.	qil56205399	15738	41	chromosome 1 open reading frame 123 [Homo sapiens]
	10.	qil124494236	80610	40	interleukin 17 receptor D isoform hSef-b [Homo sapiens]
	11.	qil42540832	80640	40	SEF splice variant b [Homo sapiens]
	12.	qil37182667	82456	40	IL17Rhom [Homo sapiens]
	13.	qil21955370	18477	40	FHAD1 protein [Homo sapiens]
	14.	qil119582056	13246	39	hCG2038681 [Homo sapiens]
	15.	qil119615826	24363	39	hypothetical protein FLJ12998, isoform CRA_b [Homo sapiens]
	16.	qil20149844	4646	39	Chain A, Human Vimentin Coil 1a Fragment (1a)
	17.	qil21667504	83757	38	interleukin 17 receptor-like protein long form [Homo sapiens]
	18.	qil75750480	80865	38	ras homolog gene family, member T1 isoform 1 [Homo sapiens]
	19.	qil37543626	80893	38	rac-GTP binding protein-like protein [Homo sapiens]
	20.	qil124494234	83726	38	interleukin 17 receptor D isoform hSef-a [Homo sapiens]
22	1.	qil55669910	67174	100	Chain A, Crystal Structure Of The Ga Module Complexed With Human Serum Albumin
	2.	qil31615331	68366	100	Chain A, Human Serum Albumin Mutant R218p Complexed With Thyroxine (3,3',5,5'-Tetraiodo-L-Thyronine)
	3.	qil31615330	68406	100	Chain A, Human Serum Albumin Mutant R218h Complexed With Thyroxine (3,3',5,5'-Tetraiodo-L-Thyronine)
	4.	qil122920512	68408	100	Chain A, Human Serum Albumin Complexed With Myristate And Aspirin
	5.	qil157830361	67988	100	Chain A, Human Serum Albumin In A Complex With Myristic Acid And Tri-iodobenzoic Acid
	6.	qil78101694	68398	100	Chain A, Human Serum Albumin Complexed With Myristate And Azapropazone
	7.	qil3212456	68425	99	Chain A, Crystal Structure Of Human Serum Albumin
	8.	qil62113341	71092	96	serum albumin [Homo sapiens]
	9.	qil119626071	70564	95	albumin, isoform CRA_h [Homo sapiens]
	10.	qil4502027	71317	94	albumin precursor [Homo sapiens]

	11.	gi 51476390	71353	94	hypothetical protein [Homo sapiens]
	12.	gi 23307793	71344	94	serum albumin [Homo sapiens]
	13.	gi 178345	71177	94	alloalbumin Venezia
	14.	gi 119626068	47098	93	albumin, isoform CRA_e [Homo sapiens]
	15.	gi 23241675	46442	92	ALB protein [Homo sapiens]
	16.	gi 119626083	60211	80	albumin, isoform CRA_t [Homo sapiens]
	17.	gi 119626065	61122	80	albumin, isoform CRA_b [Homo sapiens]
	18.	gi 6013427	71176	79	serum albumin precursor [Homo sapiens]
	19.	gi 158258947	71218	79	unnamed protein product [Homo sapiens]
	20.	gi 28592	71316	78	serum albumin [Homo sapiens]
23	1.	gi 55669910	67174	67	Chain A, Crystal Structure Of The Ga Module Complexed With Human Serum Albumin
	2.	gi 31615331	68366	66	Chain A, Human Serum Albumin Mutant R218p Complexed With Thyroxine (3,3',5,5'-Tetraiodo-L-Thyronine)
	3.	gi 31615330	68406	66	Chain A, Human Serum Albumin Mutant R218h Complexed With Thyroxine (3,3',5,5'-Tetraiodo-L-Thyronine)
	4.	gi 122920512	68408	66	Chain A, Human Serum Albumin Complexed With Myristate And Aspirin
	5.	gi 157830361	67988	66	Chain A, Human Serum Albumin In A Complex With Myristic Acid And Tri-iodobenzoic Acid
	6.	gi 78101694	68398	66	Chain A, Human Serum Albumin Complexed With Myristate And Azapropazone
	7.	gi 3212456	68425	66	Chain A, Crystal Structure Of Human Serum Albumin
	8.	gi 62113341	71092	64	serum albumin [Homo sapiens]
	9.	gi 6013427	71176	64	serum albumin precursor [Homo sapiens]
	10.	gi 119626071	70564	64	albumin, isoform CRA_h [Homo sapiens]
	11.	gi 4502027	71317	63	albumin precursor [Homo sapiens]
	12.	gi 51476390	71353	63	hypothetical protein [Homo sapiens]
	13.	gi 23307793	71344	63	serum albumin [Homo sapiens]
	14.	gi 178345	71177	63	alloalbumin Venezia
	15.	gi 28592	71316	63	serum albumin [Homo sapiens]
	16.	gi 27692693	48641	61	ALB protein [Homo sapiens]
	17.	gi 119626074	48568	61	albumin, isoform CRA_k [Homo sapiens]
	18.	gi 763431	53416	59	similar to human albumin, Swiss-Prot Accession Number P02768; Method: conceptual translation supplied by author
	19.	gi 119626065	61122	51	albumin, isoform CRA_b [Homo sapiens]
	20.	gi 158258947	71218	50	unnamed protein product [Homo sapiens]
24	1.	gi 763111	60144	150	desmolase [Homo sapiens]
	2.	gi 153218646	60178	150	cytochrome P450, subfamily XIA isoform a precursor [Homo sapiens]
	3.	gi 181376	60199	150	cholesterol side-chain cleavage enzyme P450scc (EC 1.14.15.67)
	4.	gi 153218654	42182	142	cytochrome P450, subfamily XIA isoform b [Homo sapiens]
	5.	gi 158258034	42110	142	unnamed protein product [Homo sapiens]
	6.	gi 189438	27976	74	cytochrome P-450-scc
	7.	gi 21749955	112600	53	unnamed protein product [Homo sapiens]
	8.	gi 21595200	32463	51	similar to evidence:NAS~putative~unclassifiable [Homo sapiens]
	9.	gi 13528729	16714	48	HYOU1 protein [Homo sapiens]
	10.	gi 117956393	29035	47	glycine/arginine rich protein 1 [Homo sapiens]
	11.	gi 158254866	29054	47	unnamed protein product [Homo sapiens]
	12.	gi 113427706	36606	45	PREDICTED: hypothetical protein [Homo sapiens]
	13.	gi 55957176	21553	45	eukaryotic translation initiation factor 4E nuclear import factor 1 [Homo sapiens]
	14.	gi 22297228	24307	43	AID [Homo sapiens]
	15.	gi 7328028	35404	41	hypothetical protein [Homo sapiens]
	16.	gi 148886707	132545	41	hephaestin-like 1 [Homo sapiens]
	17.	gi 25121936	144111	41	RAS protein activator like 2 isoform 2 [Homo sapiens]
	18.	gi 55662105	144153	41	RAS protein activator like 2 [Homo sapiens]
	19.	gi 119584802	13274	41	5-azacytidine induced 2, isoform CRA_e [Homo sapiens]
	20.	gi 83405059	143378	40	RASAL2 protein [Homo sapiens]
25	1.	gi 4501885	42052	142	beta actin [Homo sapiens]
	2.	gi 62897671	42036	142	beta actin variant [Homo sapiens]
	3.	gi 62897409	42038	142	beta actin variant [Homo sapiens]
	4.	gi 62897625	42080	142	beta actin variant [Homo sapiens]
	5.	gi 28336	42128	141	mutant beta-actin (beta'-actin) [Homo sapiens]
	6.	gi 15277503	40536	121	ACTB protein [Homo sapiens]
	7.	gi 14250401	41321	119	actin, beta [Homo sapiens]
	8.	gi 4501887	42108	118	actin, gamma 1 propeptide [Homo sapiens]
	9.	gi 16924319	40819	118	Unknown (protein for IMAGE:3538275) [Homo sapiens]
	10.	gi 16359158	42078	118	Actin, beta [Homo sapiens]
	11.	gi 119607748	13907	82	hCG15971, isoform CRA_b [Homo sapiens]
	12.	gi 56204817	32370	63	actin, alpha 1, skeletal muscle [Homo sapiens]
	13.	gi 998468	2420	62	48 kda histamine receptor subunit peptide 1 (internal fragment) [human, peripheral blood mononuclear cells, Peptide Partial, 23 aa]
	14.	gi 149758067	38142	62	PREDICTED: similar to actin, alpha 1, skeletal muscle isoform 2 [Equus caballus]

15.	gil118505325	13588	61	beta-actin [Mus musculus]
16.	gil4501889	42249	60	actin, gamma 2 propeptide [Homo sapiens]
17.	gil49168516	42297	60	ACTG2 [Homo sapiens]
18.	gil4885049	42334	60	cardiac muscle alpha actin 1 proprotein [Homo sapiens]
19.	gil4501883	42381	60	alpha 2 actin [Homo sapiens]
20.	gil178027	42480	60	alpha-actin

Tabelle 25: Ergebnisliste der mittels MALDI-ToF-MS signifikant identifizierten Proteine der Proteinspots aus dem Blue Native-Gel der Affinitätschromatographie nach Solubilisierung mit Digitonin (siehe 4.5.2).

Spot	Ergebnis				
	Platz	Accession-Nr.	MW [Da]	Score Protein (Datenbankeintrag)	
1	1.	gil186629	39834	74	keratin 10
	2.	gil21961605	59024	74	Keratin 10 [Homo sapiens]
	3.	gil195972866	58998	74	keratin 10 [Homo sapiens]
	4.	gil251757513	59050	74	RecName: Full=Keratin, type I cytoskeletal 10; AltName: Full=Cytokeratin-10; Short=CK-10; AltName: Full=Keratin-10; Short=K10
	5.	gil28317	59724	73	unnamed protein product [Homo sapiens]
	6.	gil119581085	63540	71	keratin 10 (epidermolytic hyperkeratosis; keratosis palmaris et plantaris), isoform CRA b [Homo sapiens]
	7.	gil307086	46475	57	keratin-10 [Homo sapiens]
	8.	gil623409	57387	53	keratin 10 [Homo sapiens]
	9.	gil190889092	7869	51	tryptophan hydroxylase 2 [Homo sapiens]
	10.	gil16552326	30705	48	unnamed protein product [Homo sapiens]
	11.	gil55665855	19191	44	ribonuclease P (38kD) (RPP38) [Homo sapiens]
	12.	gil194380168	50066	41	unnamed protein product [Homo sapiens]
	13.	gil55958272	20414	41	COMM domain containing 3 [Homo sapiens]
	14.	gil221041614	69369	39	unnamed protein product [Homo sapiens]
	15.	gil11935049	66201	39	keratin 1 [Homo sapiens]
	16.	gil7331218	66152	39	keratin 1 [Homo sapiens]
	17.	gil119395750	66173	39	keratin 1 [Homo sapiens]
	18.	gil158261815	73952	39	unnamed protein product [Homo sapiens]
	19.	gil33875203	53799	38	SRRT protein [Homo sapiens]
	20.	gil119578719	38283	37	chromosome 9 open reading frame 19, isoform CRA a [Homo sapiens]
2	1.	gil8569502	23766	68	Chain A, Fc Fragment Of Human Igg1 In Complex With An Engineered 13 Residue Peptide Dcawhlgelvwct-Nh2
	2.	gil1065199	23707	52	Chain A, Crystal Structure Of The C2 Fragment Of Streptococcal Protein G In Complex With The Fc Domain Of Human Igg
	3.	gil28373341	25428	51	Chain A, Crystal Structure Of The Human Igg1 Fc-Fragment, Glycoform (Mn2f)2
	4.	gil229905	25538	51	Chain A, Crystallographic Refinement And Atomic Models Of A Human Fc Fragment And Its Complex With Fragment B Of Protein A From Staphylococcus Aureus At 2.9- And 2.8-Angstroms Resolution
	5.	gil10121059	25666	51	Chain A, Crystal Structure Of Soluble Human Igg1 Fc Fragment-Fc- Gamma Receptor Iii Complex
	6.	gil254574798	24194	49	Chain A, Enzyme Deglycosylated Human Igg1 Fc Fragment
	7.	gil254574800	24193	49	Chain A, Human Igg1 Fc Fragment, 2.5 Angstrom Structure
	8.	gil226787	25562	49	Ig gamma1
	9.	gil55669886	25568	49	Chain A, Crystal Structure Of A Human Type Iii Fc Gamma Receptor In Complex With An Fc Fragment Of Igg1 (Orthorhombic)
	10.	gil171848866	25755	49	Chain A, Structural Characterization Of A Mutated, Adcc-Enhanced Human Fc Fragment
	11.	gil197107226	25709	49	Chain A, Structural Characterization Of A Human Fc Fragment Engineered For Lack Of Effector Functions
	12.	gil109157866	25911	49	Chain A, Crystal Structure Of A Ge-GiFC COMPLEX
	13.	gil46326410	38660	42	Hepatitis B virus receptor binding protein [Homo sapiens]
	14.	gil9857753	36594	42	recombinant IgG1 heavy chain [Homo sapiens]
	15.	gil2146957	42337	41	Ig heavy chain V region precursor - human
	16.	gil494350	47287	40	Chain H, Three-Dimensional Structure Of A Human Immunoglobulin With A Hinge Deletion
	17.	gil119602340	44511	40	hCG2029987 [Homo sapiens]
	18.	gil194387708	41968	39	unnamed protein product [Homo sapiens]
	19.	gil230581	50457	39	Chain H, Dir Primaerstruktur Des Kristallisierbaren Monoklonalen Immunoglobulins Igg1 Kol. Ii. Aminosaeuresequenz Der L- Kette, Lambda-Typ, Subgruppe I (German)
	20.	gil21757086	52908	38	unnamed protein product [Homo sapiens]
3	1.	gil6005942	89962	145	valosin-containing protein [Homo sapiens]
	2.	gil111305821	89984	145	Valosin-containing protein [Homo sapiens]

	3.	gij189065396	89947	128	unnamed protein product [Homo sapiens]
	4.	gij119578807	70441	114	valosin-containing protein, isoform CRA_a [Homo sapiens]
	5.	gij48257098	71543	108	VCP protein [Homo sapiens]
	6.	gij6807907	47875	83	hypothetical protein [Homo sapiens]
	7.	gij112818458	52775	77	VCP protein [Homo sapiens]
	8.	gij11095436	34718	50	valosin-containing protein [Homo sapiens]
	9.	gij13374129	15275	46	hypothetical protein [Homo sapiens]
	10.	gij47678441	15270	46	dJ22E13.1 [Homo sapiens]
	11.	gij37589111	45565	43	KIAA1370 protein [Homo sapiens]
	12.	gij7023361	44308	43	unnamed protein product [Homo sapiens]
	13.	gij71152996	21588	42	RecName: Full=Uncharacterized protein C10orf110
	14.	gij224393	14619	39	fibronectin
	15.	gij93102387	22854	39	hypothetical protein LOC84326 isoform a [Homo sapiens]
	16.	gij119584151	26261	38	hCG165990 [Homo sapiens]
	17.	gij11095437	33893	38	valosin-containing protein [Homo sapiens]
	18.	gij27650540	10012	38	immunoglobulin heavy chain variable region [Homo sapiens]
	19.	gij29836852	7443	38	immunoglobulin heavy chain [Homo sapiens]
	20.	gij13124806	79062	38	RecName: Full=Microtubule-associated protein tau; AltName: Full=Neurofibrillary tangle protein; AltName: Full=
4	1.	gij6005942	89962	315	valosin-containing protein [Homo sapiens]
	2.	gij111305821	89984	315	Valosin-containing protein [Homo sapiens]
	3.	gij189065396	89947	299	unnamed protein product [Homo sapiens]
	4.	Mixture 1		278	gij112818458 + gij11095436
	5.	gij48257098	71543	267	VCP protein [Homo sapiens]
	6.	gij119578807	70441	263	valosin-containing protein, isoform CRA_a [Homo sapiens]
	7.	gij112818458	52775	163	VCP protein [Homo sapiens]
	8.	gij6807907	47875	162	hypothetical protein [Homo sapiens]
	9.	gij11095436	34718	105	valosin-containing protein [Homo sapiens]
	10.	gij11095437	33893	75	valosin-containing protein [Homo sapiens]
	11.	gij11640558	7735	53	putative FWP002 [Homo sapiens]
	12.	gij111607457	40410	51	deafness, autosomal recessive 59 [Homo sapiens]
	13.	gij189067898	88332	49	unnamed protein product [Homo sapiens]
	14.	gij194379102	73345	49	unnamed protein product [Homo sapiens]
	15.	gij193787376	67155	48	unnamed protein product [Homo sapiens]
	16.	gij33357758	10925	48	Chain A, U1a Rnp Domain 1-95
	17.	gij193787217	67136	48	unnamed protein product [Homo sapiens]
	18.	gij63992666	51516	47	unknown [Homo sapiens]
	19.	gij119613770	95529	47	ribosomal protein S6 kinase, 52kDa, polypeptide 1, isoform CRA_b [Homo sapiens]
	20.	gij13399477	14776	47	Chain A, Solution Structure Of Human Heart-Type Fatty Acid Binding Protein
5	1.	gij68563322	70108	130	EPB42 protein [Homo sapiens]
	2.	gij182084	77795	126	erythrocyte membrane protein band 4.2
	3.	gij189436	77908	126	protein 4.2 (HUMP4.2S) (put.); putative
	4.	gij166362737	77831	126	erythrocyte membrane protein band 4.2 isoform 2 [Homo sapiens]
	5.	gij221041664	77859	126	unnamed protein product [Homo sapiens]
	6.	gij306740	80711	124	does not fit consensus
	7.	gij189434	80824	124	protein 4.2 (P4.2L) (put.); putative
	8.	gij166362735	80747	124	erythrocyte membrane protein band 4.2 isoform 1 [Homo sapiens]
	9.	gij221041934	69048	60	unnamed protein product [Homo sapiens]
	10.	gij2662467	9488	45	MHC class II DRB5 [Homo sapiens]
	11.	gij119611178	8021	45	hCG1811134 [Homo sapiens]
	12.	gij154089850	10867	45	MHC class II antigen [Homo sapiens]
	13.	gij156601537	10867	45	MHC class II antigen [Homo sapiens]
	14.	gij161728170	13611	43	T cell receptor beta variable 20 [Homo sapiens]
	15.	gij58222068	13623	42	anti-tetanus toxoid immunoglobulin heavy chain variable region [Homo sapiens]
	16.	gij221039768	81659	42	unnamed protein product [Homo sapiens]
	17.	gij209447290	17286	42	Chain A, Crystal Structure Of The C-Terminal Domain Of Hnup98
	18.	gij17224448	31359	41	zinc-finger protein DZIPT1 [Homo sapiens]
	19.	gij183351	41642	41	glycogen phosphorylase type IV
	20.	gij51094564	90658	41	arsenate resistance protein ARS2 [Homo sapiens]
6	1.	gij194385794	49080	102	unnamed protein product [Homo sapiens]= mitochondrial trifunctional protein
	2.	gij77627977	51653	94	mitochondrial trifunctional protein, beta subunit precursor [Pan troglodytes]
	3.	gij4504327	51552	93	mitochondrial trifunctional protein, beta subunit precursor [Homo sapiens]
	4.	gij194379384	50995	84	unnamed protein product [Homo sapiens]
	5.	gij15778991	51643	75	Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), beta subunit [Homo sapiens]
	6.	gij119621106	40678	64	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), beta subunit, isoform CRA_b [Homo sapiens]
	7.	gij194375490	49942	53	unnamed protein product [Homo sapiens]
	8.	gij18034767	81546	50	phosphorylated CTD interacting factor 1 [Homo sapiens]

	9	gij221042708	82227	50	unnamed protein product [Homo sapiens]
	10	gij18677086	19129	48	unnamed protein product [Homo sapiens]
	11	gij159163819	7299	45	Chain A, Solution Structure Of The E3_binding Domain Of Dihydrolipoamide Branched Chaintransacylase
	12	gij159163701	6616	44	Chain A, Solution Structure Of The Subunit Binding Domain (Hbsbd) Of The Human Mitochondrial Branched-Chain Alpha-Ketoacid Dehydrogenase
	13	gij129561151	13256	43	alpha-helix coiled-coil rod homologue [Homo sapiens]
	14	gij2662397	44787	43	3-ketoacyl-CoA thiolase beta-subunit of mitochondrial trifunctional protein [Homo sapiens]
	15	gij91980182	11243	42	immunoglobulin heavy chain variable region [Homo sapiens]
	16	gij114682333	79329	42	PREDICTED: phosphorylated CTD interacting factor 1 isoform 4 [Pan troglodytes]
	17	gij119621105	21475	40	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), beta subunit, isoform CRA_a [Homo sapiens]
	18	gij21732424	20750	39	hypothetical protein [Homo sapiens]
	19	gij509341	65069	39	L-type Ca2+ channel isoform 1, neuronal subform [Homo sapiens]
	20	gij29292384	9932	39	immunoglobulin heavy chain [Homo sapiens]
7	1	gij166362737	77831	110	erythrocyte membrane protein band 4.2 isoform 2 [Homo sapiens]
	2	gij221041664	77859	110	unnamed protein product [Homo sapiens]
	3	gij166362735	80747	108	erythrocyte membrane protein band 4.2 isoform 1 [Homo sapiens]
	4	gij68563322	70108	99	EPB42 protein [Homo sapiens]
	5	gij182084	77795	93	erythrocyte membrane protein band 4.2
	6	gij189436	77908	93	protein 4.2 (HUMP4.2S) (put.); putative
	7	gij306740	80711	91	does not fit consensus
	8	gij189434	80824	91	protein 4.2 (P4.2L) (put.); putative
	9	gij221041934	69048	84	unnamed protein product [Homo sapiens]
	10	gij862457	83661	57	enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase alpha-subunit of trifunctional protein [Homo sapiens]
	11	gij20127408	83701	57	mitochondrial trifunctional protein, alpha subunit precursor [Homo sapiens]
	12	gij74024919	30781	56	sulfotransferase family, cytosolic, 6B, member 1 [Homo sapiens]
	13	gij187954805	30815	56	Sulfotransferase family, cytosolic, 6B, member 1 [Homo sapiens]
	14	gij595267	83743	56	78 kDa gastrin-binding protein
	15	gij119620810	35186	52	sulfotransferase SULT6B1 [Homo sapiens]
	16	gij194387750	79019	51	unnamed protein product [Homo sapiens]
	17	gij189055087	103544	42	unnamed protein product [Homo sapiens]
	18	gij194379632	128688	41	unnamed protein product [Homo sapiens]
	19	gij119621109	65608	41	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), alpha subunit, isoform CRA_b [Homo sapiens]
	20	gij119618260	138433	41	acetyl-Coenzyme A carboxylase beta, isoform CRA_c [Homo sapiens]
8	1	gij31645	36205	125	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Homo sapiens]
	2	gij67464043	36486	98	Chain O, Crsytal Structure Of Human Liver Gapdh
	3	gij7669492	36204	98	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Homo sapiens]
	4	gij54303910	36200	82	aging-associated gene 9 protein [Homo sapiens]
	5	gij89573929	24779	74	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Homo sapiens]
	6	gij119609192	35312	74	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, isoform CRA_a [Homo sapiens]
	7	gij35053	35702	73	uracil DNA glycosylase [Homo sapiens]
	8	gij134254708	17466	53	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase [Homo sapiens]
	9	gij74736042	19618	53	RecName: Full=UPF0692 protein C19orf54
	10	gij58000465	14071	46	rippy2 protein [Homo sapiens]
	11	gij57997088	7321	44	hypothetical protein [Homo sapiens]
	12	gij194388808	23530	43	unnamed protein product [Homo sapiens]
	13	gij32526915	24185	41	StAR-related lipid transfer protein 5 [Homo sapiens]
	14	gij119620155	62685	41	RAB11 family interacting protein 5 (class I), isoform CRA_a [Homo sapiens]
	15	gij230867	36027	41	Chain R, Twinning In Crystals Of Human Skeletal Muscle D- Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
	16	gij33319682	13330	40	Ig heavy chain variable region, VH3 family [Homo sapiens]
	17	gij7661960	253257	40	Rough Deal homolog, centromere/kinetochore protein [Homo sapiens]
	18	gij119618739	253285	40	kinetochore associated 1, isoform CRA_a [Homo sapiens]
	19	gij40788891	255696	40	KIAA0166 [Homo sapiens]
	20	gij9844404	5460	40	T-cell receptor beta chain [Homo sapiens]
9	1	gij551547	25951	89	prosome beta-subunit; HSBpros26 [Homo sapiens]
	2	gij565651	29231	82	proteasome subunit HsN3 [Homo sapiens]
	3	gij22538467	29243	82	proteasome beta 4 subunit [Homo sapiens]
	4	gij48145757	29229	66	PSMB4 [Homo sapiens]
	5	gij170292427	41425	55	Chain A, Crystal Structure Of Human Reticulon 4 Interacting Protein 1 In Complex With Nadph
	6	gij123992939	38971	55	reticulon 4 interacting protein 1 [synthetic construct]
	7	gij14522882	44144	55	NOGO-interacting mitochondrial protein [Homo sapiens]
	8	gij195963403	14502	50	zinc finger protein 720 [Homo sapiens]

	9.	gil47519420	43968	50	reticulon 4 interacting protein 1 precursor [Homo sapiens]
	10.	gil157835245	22233	48	Chain A, Human Gamma-B Crystallin
	11.	gil119568794	25309	48	reticulon 4 interacting protein 1, isoform CRA_a [Homo sapiens]
	12.	gil57997588	120521	48	hypothetical protein [Homo sapiens]
	13.	gil119590420	121587	47	AT rich interactive domain 4B (RBP1- like), isoform CRA_e [Homo sapiens]
	14.	gil62088982	55224	47	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan precursor variant [Homo sapiens]
	15.	gil221041666	71651	46	unnamed protein product [Homo sapiens]
	16.	gil20800447	137383	43	breast cancer-associated antigen BRCA1 [Homo sapiens]
	17.	gil13629869	138454	43	retinoblastoma-binding protein 1-like 1 [Homo sapiens]
	18.	gil120660362	131325	43	ARID4B protein [Homo sapiens]
	19.	gil20149844	4646	42	Chain A, Human Vimentin Coil 1a Fragment (1a)
	20.	gil22035679	138509	42	AT rich interactive domain 4B isoform 2 [Homo sapiens]
10	1.	gil20147503	411935	131	laminin alpha5 chain precursor [Homo sapiens]
	2.	gil12274842	411496	124	laminin, alpha 5 [Homo sapiens]
	3.	gil21264602	412023	124	laminin alpha 5 precursor [Homo sapiens]
	4.	gil229463053	412085	124	RecName: Full=Laminin subunit alpha-5; Flags: Precursor
	5.	gil119595780	411358	122	laminin, alpha 5, isoform CRA_c [Homo sapiens]
	6.	gil119595778	411885	121	laminin, alpha 5, isoform CRA_a [Homo sapiens]
	7.	gil119595779	414602	121	laminin, alpha 5, isoform CRA_b [Homo sapiens]
	8.	gil3043590	180214	86	KIAA0533 protein [Homo sapiens]
	9.	gil221316618	652503	69	dystonin isoform 2 [Homo sapiens]
	10.	gil34577049	593806	69	dystonin isoform 1eA precursor [Homo sapiens]
	11.	gil34577047	632532	68	dystonin isoform 1 [Homo sapiens]
	12.	gil55960336	590460	68	dystonin [Homo sapiens]
	13.	gil73620945	593763	66	RecName: Full=Bullous pemphigoid antigen 1 [Homo sapiens]
	14.	gil18157651	593646	66	bullous pemphigoid antigen 1 eA [Homo sapiens]
	15.	gil221316622	636467	66	dystonin isoform 3 [Homo sapiens]
	16.	gil20521141	187130	65	KIAA0728 protein [Homo sapiens]
	17.	gil221316624	635267	64	dystonin isoform 4 [Homo sapiens]
	18.	gil119624871	594278	63	dystonin, isoform CRA_k [Homo sapiens]
	19.	gil193785471	43372	58	unnamed protein product [Homo sapiens]
	20.	gil47027968	33142	54	potassium channel tetramerization domain containing 10 [Homo sapiens]
11	1.	gil126366	205178	105	RecName: Full=Laminin subunit beta-1; Short=Laminin B1 chain; Flags: Precursor
	2.	gil167614504	205150	98	laminin, beta 1 precursor [Homo sapiens]
	3.	gil119603829	207703	97	laminin, beta 1, isoform CRA_a [Homo sapiens]
	4.	gil51476683	185960	75	hypothetical protein [Homo sapiens]
	5.	gil217416352	186036	61	sphingosine kinase type 1-interacting protein isoform 2 [Homo sapiens]
	6.	gil119596067	104636	59	zinc finger, NFX1-type containing 1, isoform CRA_a [Homo sapiens]
	7.	gil194383156	51597	56	unnamed protein product [Homo sapiens]
	8.	gil23272533	38919	56	ACTR2 protein [Homo sapiens]
	9.	gil33874125	106504	54	ZNFX1 protein [Homo sapiens]
	10.	gil194377444	49385	54	unnamed protein product [Homo sapiens]
	11.	gil217416354	189076	54	sphingosine kinase type 1-interacting protein isoform 1 [Homo sapiens]
	12.	gil193786919	78702	54	unnamed protein product [Homo sapiens]
	13.	gil21732433	95423	53	hypothetical protein [Homo sapiens]
	14.	gil193785471	43372	53	unnamed protein product [Homo sapiens]
	15.	gil14042873	57860	53	unnamed protein product [Homo sapiens]
	16.	gil56203616	108657	51	zinc finger, NFX1-type containing 1 [Homo sapiens]
	17.	gil186915	48162	51	laminin B1 [Homo sapiens]
	18.	gil7023836	103699	51	unnamed protein product [Homo sapiens]
	19.	gil119568467	352320	50	laminin, alpha 2 (merosin, congenital muscular dystrophy), isoform CRA_c [Homo sapiens]
	20.	gil109103172	38988	50	PREDICTED: actin-related protein 2 isoform 1 [Macaca mulatta]
12	1.	gil194385772	116680	68	2-oxoglutarate dehydrogenase
	2.	gil259013553	116695	68	oxoglutarate dehydrogenase isoform 3 precursor [Homo sapiens]
	3.	gil2160381	114602	67	2-oxoglutarate dehydrogenase [Homo sapiens]
	4.	gil531241	114601	67	2-oxoglutarate dehydrogenase precursor [Homo sapiens]
	5.	gil51873036	117059	66	oxoglutarate dehydrogenase isoform 1 precursor [Homo sapiens]
	6.	gil194375834	111596	63	unnamed protein product [Homo sapiens]
	7.	gil55959141	97615	52	cyclin M2 [Homo sapiens]
	8.	gil40068053	97531	52	cyclin M2 isoform 1 [Homo sapiens]
	9.	gil194378950	98659	49	unnamed protein product [Homo sapiens]
	10.	gil194380878	93739	46	unnamed protein product [Homo sapiens]
	11.	gil55959142	95334	46	cyclin M2 [Homo sapiens]
	12.	gil23208520	11938	45	DNA polymerase kappa [Homo sapiens]
	13.	gil40068055	95250	45	cyclin M2 isoform 2 [Homo sapiens]
	14.	gil194383022	100120	45	unnamed protein product [Homo sapiens]
	15.	gil119570045	95357	45	cyclin M2, isoform CRA_b [Homo sapiens]

	16.	gi 189163493	39899	44	ataxin 3 isoform ad [Homo sapiens]
	17.	gi 2765425	53379	44	immunoglobulin lambda heavy chain [Homo sapiens]
	18.	gi 34526202	52524	43	unnamed protein product [Homo sapiens]
	19.	gi 34527666	51508	43	unnamed protein product [Homo sapiens]
	20.	gi 27728677	52827	43	anti-rabies SO57 immunoglobulin heavy chain [Homo sapiens]
13	1.	gi 9857753	36585	78	recombinant IgG1 heavy chain [Homo sapiens]
	2.	gi 46326410	38651	76	Hepatitis B virus receptor binding protein [Homo sapiens]
	3.	gi 226787	25556	76	Ig gamma1
	4.	gi 55669886	25562	76	Chain A, Crystal Structure Of A Human Type Iii Fc Gamma Receptor In Complex With An Fc Fragment Of Igg1 (Orthorhombic)
	5.	gi 34535607	60218	76	unnamed protein product [Homo sapiens]
	6.	gi 254574798	24190	76	Chain A, Enzyme Deglycosylated Human Igg1 Fc Fragment
	7.	gi 254574800	24189	76	Chain A, Human 1gg1 Fc Fragment, 2.5 Angstrom Structure
	8.	gi 109157866	25905	76	Chain A, Crystal Structure Of A Ge-GiFC COMPLEX
	9.	gi 119602340	44500	72	hCG2029987 [Homo sapiens]
	10.	gi 34527363	51483	67	unnamed protein product [Homo sapiens]
	11.	gi 34527666	51508	67	unnamed protein product [Homo sapiens]
	12.	gi 21757752	52381	67	unnamed protein product [Homo sapiens]
	13.	gi 21757066	52459	67	unnamed protein product [Homo sapiens]
	14.	gi 21757860	52370	67	unnamed protein product [Homo sapiens]
	15.	gi 34365137	52829	67	hypothetical protein [Homo sapiens]
	16.	gi 27728681	52436	67	anti-rabies SOJA immunoglobulin heavy chain [Homo sapiens]
	17.	gi 34526389	51864	67	unnamed protein product [Homo sapiens]
	18.	gi 34526202	52524	66	unnamed protein product [Homo sapiens]
	19.	gi 27728677	52827	66	anti-rabies SO57 immunoglobulin heavy chain [Homo sapiens]
	20.	gi 2765425	53379	66	immunoglobulin lambda heavy chain [Homo sapiens]
14	1.	gi 41388180	65126	98	monoclonal IgM antibody heavy chain [Homo sapiens]
	2.	gi 12054080	50117	97	immunoglobulin heavy chain constant region mu [Homo sapiens]
	3.	gi 7439150	50123	97	Ig mu chain C region - human
	4.	gi 119602344	52491	96	hCG2038942 [Homo sapiens]
	5.	gi 28071026	41817	92	unnamed protein product [Homo sapiens]
	6.	gi 41388182	66596	85	monoclonal IgM antibody heavy chain [Homo sapiens]
	7.	gi 7428607	49994	84	Ig mu chain C region, secreted splice form - human
	8.	gi 193806374	49960	84	RecName: Full=Ig mu chain C region
	9.	gi 4467842	50105	84	immunoglobulin M heavy chain [Homo sapiens]
	10.	gi 33451	69208	83	unnamed protein product [Homo sapiens]
	11.	gi 127506	43543	54	RecName: Full=Ig mu heavy chain disease protein; AltName: Full=BOT
	12.	gi 38635953	12368	54	unnamed protein product [Homo sapiens]
	13.	gi 91978956	12671	47	GLIS family zinc finger 3 transcript variant TS12 [Homo sapiens]
	14.	gi 29836893	12527	45	immunoglobulin heavy chain [Homo sapiens]
	15.	gi 21670111	13447	44	immunoglobulin heavy chain VHDJ region [Homo sapiens]
	16.	gi 184728	8872	43	immunoglobulin mu chain [Homo sapiens]
	17.	gi 51103361	13836	42	immunoglobulin variable region VH gamma domain [Homo sapiens]
	18.	gi 74354421	14408	42	SLC26A1 protein [Homo sapiens]
	19.	gi 145941400	11807	39	immunoglobulin heavy chain variable region [Homo sapiens]
	20.	gi 23273927	40868	38	NudC domain containing 3 [Homo sapiens]
15	1.	gi 862457	83648	116	enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase alpha-subunit of trifunctional protein [Homo sapiens]
	2.	gi 20127408	83688	116	mitochondrial trifunctional protein, alpha subunit precursor [Homo sapiens]
	3.	gi 595267	83730	115	78 kDa gastrin-binding protein
	4.	gi 194387750	79007	111	unnamed protein product [Homo sapiens]
	5.	gi 119621109	65600	109	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), alpha subunit, isoform CRA_b [Homo sapiens]
	6.	gi 194373621	62969	100	unnamed protein product [Homo sapiens]
	7.	gi 62702215	59149	94	unknown [Homo sapiens]
	8.	gi 68563322	70096	70	EPB42 protein [Homo sapiens]
	9.	gi 182084	77780	65	erythrocyte membrane protein band 4.2
	10.	gi 189436	77892	65	protein 4.2 (HUMP4.2S) (put.); putative
	11.	gi 166362737	77816	65	erythrocyte membrane protein band 4.2 isoform 2 [Homo sapiens]
	12.	gi 221041664	77844	65	unnamed protein product [Homo sapiens]
	13.	gi 306740	80696	63	does not fit consensus
	14.	gi 189434	80808	63	protein 4.2 (P4.2L) (put.); putative
	15.	gi 166362735	80732	63	erythrocyte membrane protein band 4.2 isoform 1 [Homo sapiens]
	16.	gi 183351	41639	58	glycogen phosphorylase type IV
	17.	gi 7657526	84389	57	ribosomal protein S6 kinase polypeptide 6 [Homo sapiens]
	18.	gi 49168616	84198	57	RPS6KA6 [Homo sapiens]
	19.	gi 183353	97560	55	glycogen phosphorylase (EC 2.4.1.1) [Homo sapiens]
	20.	gi 189096182	93283	55	Chain A, Human Liver Glycogen Phosphorylase (Tense State) In Complex With The Allosteric

16	1.	gi 119610656	62941	104	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain, isoform CRA_e [Homo sapiens]
	2.	gi 167745034	63747	99	Chain A, Structural Basis For Substrate Fatty-Acyl Chain Specificity: Crystal Structure Of Human Very-Long-Chain Acyl-Coa Dehydrogenase
	3.	gi 76496475	68414	99	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain isoform 2 precursor [Homo sapiens]
	4.	gi 146386728	66085	99	Chain A, Crystal Structure Of Human Very Long Chain Acyl-Coa Dehydrogenase (Acadvl)
	5.	gi 194374247	75619	98	unnamed protein product [Homo sapiens]
	6.	gi 119610653	75618	95	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain, isoform CRA_b [Homo sapiens]
	7.	gi 3273228	70848	94	very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase [Homo sapiens]
	8.	gi 4557235	70745	94	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain isoform 1 precursor [Homo sapiens]
	9.	gi 119610655	49668	94	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain, isoform CRA_d [Homo sapiens]
	10.	gi 119610652	73288	93	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain, isoform CRA_a [Homo sapiens]
	11.	gi 62896595	70773	85	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain precursor variant [Homo sapiens]
	12.	gi 194374263	73280	83	unnamed protein product [Homo sapiens]
	13.	gi 193787010	38899	75	unnamed protein product [Homo sapiens]
	14.	gi 119610654	47614	51	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain, isoform CRA_c [Homo sapiens]
	15.	gi 14336743	39117	50	unknown [Homo sapiens]
	16.	gi 194388374	101217	50	unnamed protein product [Homo sapiens]
	17.	gi 239757800	7225	46	PREDICTED: similar to hCG2042049 [Homo sapiens]
	18.	gi 40737308	48037	44	C4B1 [Homo sapiens]
	19.	gi 40737313	48007	44	C4B1 [Homo sapiens]
	20.	gi 40737408	48036	44	C4B5 [Homo sapiens]
17	1.	gi 499719	49000	86	mitochondrial dihydrolipoamide succinyltransferase [Homo sapiens]
	2.	gi 736677	48992	86	dihydrolipoamide succinyltransferase
	3.	gi 19923748	49067	86	dihydrolipoamide S-succinyltransferase (E2 component of 2-oxo-glutarate complex) [Homo sapiens]
	4.	gi 48145571	49131	86	DLST [Homo sapiens]
	5.	gi 206729909	49041	86	RecName: Full=Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase
	6.	gi 221042754	39585	68	unnamed protein product [Homo sapiens]
	7.	gi 18089108	16161	66	TAT protein [Homo sapiens]
	8.	gi 643589	48896	63	dihydrolipoamide succinyltransferase [Homo sapiens]
	9.	gi 194385794	49076	59	unnamed protein product [Homo sapiens]
	10.	gi 194379384	50989	58	unnamed protein product [Homo sapiens]
	11.	gi 28375583	32844	56	unnamed protein product [Homo sapiens]
	12.	gi 28207901	26925	56	unnamed protein product [Homo sapiens]
	13.	gi 4504327	51547	56	mitochondrial trifunctional protein, beta subunit precursor [Homo sapiens]
	14.	gi 77627977	51648	55	mitochondrial trifunctional protein, beta subunit precursor [Pan troglodytes]
	15.	gi 119577950	11121	50	hCG2041482 [Homo sapiens]
	16.	gi 903599	59097	45	Krueppel-type zinc finger protein [Homo sapiens]
	17.	gi 119621106	40673	44	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), beta subunit, isoform CRA_b [Homo sapiens]
	18.	gi 194387906	67932	43	unnamed protein product [Homo sapiens]
	19.	gi 1871210	22924	43	T-complex protein 1, Beta subunit (TCP-1-BETA) [Homo sapiens]
	20.	gi 15778991	51638	43	Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme
18	1.	gi 194376310	38950	95	actin, beta [Homo sapiens]
	2.	gi 194388064	40116	92	unnamed protein product [Homo sapiens]
	3.	gi 15277503	40536	92	ACTB protein [Homo sapiens]
	4.	gi 157881403	41921	91	Chain A, The Structure Of Crystalline Profilin-Beta-Actin
	5.	gi 14250401	41321	91	actin, beta [Homo sapiens]
	6.	gi 194385944	39543	91	unnamed protein product [Homo sapiens]
	7.	gi 194375299	37667	91	unnamed protein product [Homo sapiens]
	8.	gi 16924319	40819	90	Unknown (protein for IMAGE:3538275) [Homo sapiens]
	9.	gi 4501885	42052	90	beta actin [Homo sapiens]
	10.	gi 4501887	42108	90	actin, gamma 1 propeptide [Homo sapiens]
	11.	gi 62897671	42036	90	beta actin variant [Homo sapiens]
	12.	gi 62897409	42038	90	beta actin variant [Homo sapiens]
	13.	gi 62897625	42080	90	beta actin variant [Homo sapiens]
	14.	gi 16359158	42078	74	Actin, beta [Homo sapiens]
	15.	gi 28336	42128	71	mutant beta-actin (beta'-actin) [Homo sapiens]
	16.	gi 109119055	28478	56	PREDICTED: similar to cytoplasmic beta-actin isoform 2 [Macaca mulatta]
	17.	gi 178045	26147	56	gamma-actin [Homo sapiens]
	18.	gi 40226101	29678	53	ACTG1 protein [Homo sapiens]
	19.	gi 221046110	33365	50	unnamed protein product [Homo sapiens]
	20.	gi 56204817	32370	50	actin, alpha 1, skeletal muscle [Homo sapiens]

8. Literaturverzeichnis

- Adams, P.D., Seeholzer, S., Ohh, M. (2002): Identification of Associated Proteins by Immunoprecipitation. *Protein-Protein Interactions*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2001): Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie. WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim
- Allain, F., Vanpouille, C., Carpentier, M., Slomianny, M.C., Durieux, S., Spik, G. (2002): Interaction with glycosaminoglycans is required for cyclophilin B to trigger integrin-mediated adhesion of peripheral blood T lymphocytes to extracellular matrix. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **99** (5), 2714-2719
- Arber, S., Krause, K.H., Caroni, P. (1992): s-cyclophilin is retained intracellularly via a unique COOH-terminal sequence and colocalizes with the calcium storage protein calreticulin. *J.Cell Biol.*, **116** (1), 113-125
- Barley, N.F., Howard, A., O'Callaghan, D., Legon, S., Walters, J.R. (2001): Epithelial calcium transporter expression in human duodenum. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol*, **280** (2), G285-G290
- Bartl, R. (2008): Osteoporose: Prävention, Diagnostik, Therapie. Thieme Verlag, Stuttgart
- Belkacemi, L., Bedard, I., Simoneau, L., Lafond, J. (2005): Calcium channels, transporters and exchangers in placenta: a review. *Cell Calcium*, **37** (1), 1-8
- Bergeron, M.J., Burzle, M., Kovacs, G., Simonin, A., Hediger, M.A. (2011): Synthesis, maturation, and trafficking of human Na⁺-dicarboxylate cotransporter NaDC1 requires the chaperone activity of cyclophilin B. *J.Biol.Chem.*, **286** (13), 11242-11253
- Berkefeld, H., Sailer, C.A., Bildl, W., Rohde, V., Thumfart, J.O., Eble, S., Klugbauer, N., Reisinger, E., Bischofberger, J., Oliver, D., Knaus, H.G., Schulte, U., Fakler, B. (2006): BKCa-Cav channel complexes mediate rapid and localized Ca²⁺-activated K⁺ signaling. *Science*, **314** (5799), 615-620
- Bernucci, L., Henriquez, M., Diaz, P., Riquelme, G. (2006): Diverse calcium channel types are present in the human placental syncytiotrophoblast basal membrane. *Placenta*, **27** (11-12), 1082-1095
- Berridge, M.J., Bootman, M.D., Roderick, H.L. (2003): Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, **4** (7), 517-529
- Bianco, S.D., Peng, J.B., Takanaga, H., Suzuki, Y., Crescenzi, A., Kos, C.H., Zhuang, L., Freeman, M.R., Gouveia, C.H., Wu, J., Luo, H., Mauro, T., Brown, E.M., Hediger, M.A. (2007): Marked disturbance of calcium homeostasis in mice with targeted disruption of the Trpv6 calcium channel gene. *J.Bone Miner.Res.*, **22** (2), 274-285
- Bildl, W., Strassmaier, T., Thurm, H., Andersen, J., Eble, S., Oliver, D., Knipper, M., Mann, M., Schulte, U., Adelman, J.P., Fakler, B. (2004): Protein kinase CK2 is coassembled with small conductance Ca(2+)-activated K⁺ channels and regulates channel gating. *Neuron.*, **43** (6), 847-858
- Blum, H., Beier, H., Gross, H.J. (1987): Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, **8**, 93-99

- Bodding, M. (2007): TRP proteins and cancer. *Cell Signal.*, **19** (3), 617-624
- Bödning, M. und Flockerzi, V. (2004): Ca²⁺ dependence of the Ca²⁺-selective TRPV6 channel. *J.Biol.Chem.*, **279** (35), 36546-36552
- Bohmer, C., Palmada, M., Kenngott, C., Lindner, R., Klaus, F., Laufer, J., Lang, F. (2007): Regulation of the epithelial calcium channel TRPV6 by the serum and glucocorticoid-inducible kinase isoforms SGK1 and SGK3. *FEBS Lett.*, **581** (29), 5586-5590
- Bolanz, K.A., Hediger, M.A., Landowski, C.P. (2008): The role of TRPV6 in breast carcinogenesis. *Mol.Cancer Ther.*, **7** (2), 271-279
- Boot, A.M., Nauta, J., Hokken-Koelega, A.C., Pols, H.A., de Ridder, M.A., de Muinck Keizer-Schrama SM (1995): Renal transplantation and osteoporosis. *Arch.Dis.Child.*, **72** (6), 502-506
- Borthwick, L.A., Neal, A., Hobson, L., Gerke, V., Robson, L., Muimo, R. (2008): The annexin 2-S100A10 complex and its association with TRPV6 is regulated by cAMP/PKA/CnA in airway and gut epithelia. *Cell Calcium*, **44** (2), 147-157
- Boulay, G. (2002): Ca(2+)-calmodulin regulates receptor-operated Ca(2+) entry activity of TRPC6 in HEK-293 cells. *Cell Calcium*, **32** (4), 201-207
- Boulay, G., Zhu, X., Peyton, M., Jiang, M., Hurst, R., Stefani, E., Birnbaumer, L. (1997): Cloning and expression of a novel mammalian homolog of Drosophila transient receptor potential (Trp) involved in calcium entry secondary to activation of receptors coupled by the Gq class of G protein. *J.Biol.Chem.*, **272** (47), 29672-29680
- Brillantes, A.B., Ondrias, K., Scott, A., Kobrinsky, E., Ondriasova, E., Moschella, M.C., Jayaraman, T., Landers, M., Ehrlich, B.E., Marks, A.R. (1994): Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell*, **77** (4), 513-523
- Bukrinsky, M.I. (2002): Cyclophilins: unexpected messengers in intercellular communications. *Trends Immunol.*, **23** (7), 323-325
- Cameron, A.M., Steiner, J.P., Sabatini, D.M., Kaplin, A.I., Walensky, L.D., Snyder, S.H. (1995): Immunophilin FK506 binding protein associated with inositol 1,4,5-trisphosphate receptor modulates calcium flux. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **92** (5), 1784-1788
- Campbell, N.A. und Reece, J.B. (2006): Biologie. Pearson Education Deutschland GmbH, München
- 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** (9), 1327-1333
- 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** (5747), 490-493
- Chow, J., Norng, M., Zhang, J., Chai, J. (2007): TRPV6 mediates capsaicin-induced apoptosis in gastric cancer cells--Mechanisms behind a possible new "hot" cancer treatment. *Biochim.Biophys.Acta*, **1773** (4), 565-576
- Cipriani, R. und Farias, M.L. (2005): [Osteoporosis after solid organs transplantation]. *Arq Bras.Endocrinol.Metabol.*, **49** (3), 369-377

- Clapham, D.E. (1995): Calcium signaling. *Cell*, **80** (2), 259-268
- Clapham, D.E., Montell, C., Schultz, G., Julius, D. (2003): International Union of Pharmacology. XLIII. Compendium of voltage-gated ion channels: transient receptor potential channels. *Pharmacol.Rev.*, **55** (4), 591-596
- Clarson, L.H., Roberts, V.H., Hamark, B., Elliott, A.C., Powell, T. (2003): Store-operated Ca²⁺ entry in first trimester and term human placenta. *J.Physiol*, **550** (Pt 2), 515-528
- Corteling, R.L., Li, S., Giddings, J., Westwick, J., Poll, C., Hall, I.P. (2004): Expression of transient receptor potential C6 and related transient receptor potential family members in human airway smooth muscle and lung tissue. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*, **30** (2), 145-154
- Dalrymple, A., Slater, D.M., Beech, D., Poston, L., Tribe, R.M. (2002): Molecular identification and localization of Trp homologues, putative calcium channels, in pregnant human uterus. *Mol.Hum.Reprod.*, **8** (10), 946-951
- 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** (5-6), 497-507
- Derler, I., Hofbauer, M., Kahr, H., Fritsch, R., Muik, M., Kepplinger, K., Hack, M.E., Moritz, S., Schindl, R., Groschner, K., Romanin, C. (2006): Dynamic but not constitutive association of calmodulin with rat TRPV6 channels enables fine tuning of Ca²⁺-dependent inactivation. *J.Physiol*, **577** (Pt 1), 31-44
- Dietrich, A. und Gudermann, T. (2007): TRPC6. *Handb.Exp.Pharmacol.*, (179), 125-141
- Dietrich, A., Schnitzler, M., Emmel, J., Kalwa, H., Hofmann, T., Gudermann, T. (2003): N-linked protein glycosylation is a major determinant for basal TRPC3 and TRPC6 channel activity. *J.Biol.Chem.*, **278** (48), 47842-47852
- Dörr, J. (2010): Untersuchung des TRPV5 Kalziumkanals und daran assoziierter Proteine mittels Affinitätschromatographien.
- Einarson, M.B. und Orlinick, J.R. (2002): Identification of Protein-Protein Interactions with Glutathion-S-Transferase Fusion Proteins. *Protein-Protein Interactions*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Erler, I. (2006): TRPV6 und TRPM8: Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen.
- 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** (33), 34456-34463
- Estacion, M., Li, S., Sinkins, W.G., Gosling, M., Bahra, P., Poll, C., Westwick, J., Schilling, W.P. (2004): Activation of human TRPC6 channels by receptor stimulation. *J.Biol.Chem.*, **279** (21), 22047-22056
- Fischer, G., Bang, H., Mech, C. (1984): [Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides]. *Biomed.Biochim.Acta*, **43** (10), 1101-1111
- Fischer, G., Wittmann-Liebold, B., Lang, K., Kiefhaber, T., Schmid, F.X. (1989): Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature*, **337** (6206), 476-478

- Fixemer, T., Wissenbach, U., Flockerzi, V., Bonkhoff, H. (2003): Expression of the Ca²⁺-selective cation channel TRPV6 in human prostate cancer: a novel prognostic marker for tumor progression. *Oncogene*, **22** (49), 7858-7861
- Flockerzi, V. (2009): Calciumstoffwechsel. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 10. Auflage, Elsevier, Urban & Fischer Verlag,
- Fuchs, G. und Schlegel, H.G. (2006): Allgemeine Mikrobiologie. Thieme Verlag, Stuttgart
- Fudge, N.J. und Kovacs, C.S. (2010): Pregnancy up-regulates intestinal calcium absorption and skeletal mineralization independently of the vitamin D receptor. *Endocrinology*, **151** (3), 886-895
- Galat, A. (2003): Peptidylprolyl cis/trans isomerases (immunophilins): biological diversity--targets--functions. *Curr.Top.Med.Chem.*, **3** (12), 1315-1347
- Giannini, S., Nobile, M., Ciuffreda, M., Iemmolo, R.M., Dalle, C.L., Minicuci, N., Casagrande, F., Destro, C., Gerunda, G.E., Sartori, L., Crepaldi, G. (2000): Long-term persistence of low bone density in orthotopic liver transplantation. *Osteoporos.Int.*, **11** (5), 417-424
- Gkika, D., Topala, C.N., Hoenderop, J.G., Bindels, R.J. (2006): The immunophilin FKBP52 inhibits the activity of the epithelial Ca²⁺ channel TRPV5. *Am.J.Physiol Renal Physiol*, **290** (5), F1253-F1259
- Goel, M., Garcia, R., Estacion, M., Schilling, W.P. (2001): Regulation of Drosophila TRPL channels by immunophilin FKBP59. *J.Biol.Chem.*, **276** (42), 38762-38773
- Hall, R.A. (2004): Studying Protein-Protein Interactions via Blot Overlay or Far Western. *Protein-protein interactions: methods and applications*, Humana Press, Clifton, New Jersey
- Handschumacher, R.E., Harding, M.W., Rice, J., Drugge, R.J., Speicher, D.W. (1984): Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science*, **226** (4674), 544-547
- Harlow, E. und Lane, D. (1988): Antibodies - a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York,
- Hellwig, N., Albrecht, N., Harteneck, C., Schultz, G., Schaefer, M. (2005): Homo- and heteromeric assembly of TRPV channel subunits. *J.Cell Sci.*, **118** (Pt 5), 917-928
- Hengst, P. (1999): Pregnancy after kidney transplantation. *Der Gynäkologe*, **32** (6)
- Henry Gray (2000): Anatomy of the Human Body. BARTLEBY.COM, New York
- Herrmann, J.M., Westermann, B., Neupert, W. (2001): Analysis of protein-protein interactions in mitochondria by coimmunoprecipitation and chemical cross-linking. *Methods Cell Biol.*, **65**, 217-230
- Hirnet, D., Olausson, J., Fecher-Trost, C., Bödding, M., Nastainczyk, W., Wissenbach, U., Flockerzi, V., Freichel, M. (2003): The TRPV6 gene, cDNA and protein. *Cell Calcium*, **33** (5-6), 509-518
- Hisatsune, C., Kuroda, Y., Nakamura, K., Inoue, T., Nakamura, T., Michikawa, T., Mizutani, A., Mikoshiba, K. (2004): Regulation of TRPC6 channel activity by tyrosine phosphorylation. *J.Biol.Chem.*, **279** (18), 18887-18894

- Hoenderop, J.G. und 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. (2002): 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** (11), 1398-1406
- 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** (7), 1342-1349
- Hoenderop, J.G., Nilius, B., Bindels, R.J. (2005): Calcium absorption across epithelia. *Physiol Rev.*, **85** (1), 373-422
- Hoenderop, J.G., van der Kemp, A.W., Hartog, A., van Os, C.H., Willems, P.H., Bindels, R.J. (1999): The epithelial calcium channel, ECaC, is activated by hyperpolarization and regulated by cytosolic calcium. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **261** (2), 488-492
- Hoenderop, J.G., van der Kemp, A.W., Urben, C.M., Strugnell, S.A., Bindels, R.J. (2004): Effects of vitamin D compounds on renal and intestinal Ca²⁺ transport proteins in 25-hydroxyvitamin D₃-1alpha-hydroxylase knockout mice. *Kidney Int.*, **66** (3), 1082-1089
- 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** (Pt 3), 747-761
- Hoenderop, J.G., Voets, T., Hoefs, S., Weidema, F., Prenen, J., Nilius, B., Bindels, R.J. (2003): Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6. *EMBO J.*, **22** (4), 776-785
- Hofmann, T., Obukhov, A.G., Schaefer, M., Harteneck, C., Gudermann, T., Schultz, G. (1999): Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature*, **397** (6716), 259-263
- Hofmann, T., Schaefer, M., Schultz, G., Gudermann, T. (2002): Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **99** (11), 7461-7466
- Horton, H.R., Moran, L.A., Scrimgeour, K.G., Perry, M.D., Rawn, J.D. (2008): Biochemie. Pearson Education Deutschland GmbH, München
- Huybers, S., Naber, T.H., Bindels, R.J., Hoenderop, J.G. (2007): Prednisolone-induced Ca²⁺ malabsorption is caused by diminished expression of the epithelial Ca²⁺ channel TRPV6. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol*, **292** (1), G92-G97
- Inoue, R., Okada, T., Onoue, H., Hara, Y., Shimizu, S., Naitoh, S., Ito, Y., Mori, Y. (2001): The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular alpha(1)-adrenoceptor-activated Ca(2+)-permeable cation channel. *Circ.Res.*, **88** (3), 325-332
- Jung, S., Strotmann, R., Schultz, G., Plant, T.D. (2002): TRPC6 is a candidate channel involved in receptor-stimulated cation currents in A7r5 smooth muscle cells. *Am.J.Physiol Cell Physiol*, **282** (2), C347-C359
- Kalinke, S. (2009): Untersuchung von Proteinkomplexen mittels Affinitätschromatographie und Blue-Native-Gelelektrophorese.

- Karas, M. und Hillenkamp, F. (1988): Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.*, **60** (20), 2299-2301
- Karlson, P., Doenecke, D., Koolman, J., Fuchs, G., Gerok, W. (2005): Karlsons Biochemie und Pathobiochemie. Thieme Verlag, Stuttgart
- Karp, G. (2009): Molekulare Zellbiologie. Springer Verlag, Berlin
- Kennedy, B.G., Torabi, A.J., Kurzawa, R., Echtenkamp, S.F., Mangini, N.J. (2010): Expression of transient receptor potential vanilloid channels TRPV5 and TRPV6 in retinal pigment epithelium. *Mol. Vis.*, **16:665-75.**, 665-675
- Kim, J., Choi, T.G., Ding, Y., Kim, Y., Ha, K.S., Lee, K.H., Kang, I., Ha, J., Kaufman, R.J., Lee, J., Choe, W., Kim, S.S. (2008): Overexpressed cyclophilin B suppresses apoptosis associated with ROS and Ca²⁺ homeostasis after ER stress. *J. Cell Sci.*, **121** (Pt 21), 3636-3648
- Kim, J.Y. und Saffen, D. (2005): Activation of M1 muscarinic acetylcholine receptors stimulates the formation of a multiprotein complex centered on TRPC6 channels. *J. Biol. Chem.*, **280** (36), 32035-32047
- Kuro-o, M. (2010): Klotho. *Pflugers Arch.*, **459** (2), 333-343
- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227** (5259), 680-685
- Lafond, J., Goyer-O'Reilly, I., Laramée, M., Simoneau, L. (2001): Hormonal regulation and implication of cell signaling in calcium transfer by placenta. *Endocrine.*, **14** (3), 285-294
- Lambers, T.T., Weidema, A.F., Nilius, B., Hoenderop, J.G., Bindels, R.J. (2004): Regulation of the mouse epithelial Ca²⁺ channel TRPV6 by the Ca²⁺-sensor calmodulin. *J. Biol. Chem.*, **279** (28), 28855-28861
- Lee, B.M., Lee, G.S., Jung, E.M., Choi, K.C., Jeung, E.B. (2009): Uterine and placental expression of TRPV6 gene is regulated via progesterone receptor- or estrogen receptor-mediated pathways during pregnancy in rodents. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, **7**, 49-
- Lee, G.S. und Jeung, E.B. (2007): Uterine TRPV6 expression during the estrous cycle and pregnancy in a mouse model. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **293** (1), E132-E138
- Lehen'kyi, V., Beck, B., Polakowska, R., Charveron, M., Bordat, P., Skryma, R., Prevarskaya, N. (2007a): TRPV6 is a Ca²⁺ entry channel essential for Ca²⁺-induced differentiation of human keratinocytes. *J. Biol. Chem.*, **282** (31), 22582-22591
- Lehen'kyi, V., Flourakis, M., Skryma, R., Prevarskaya, N. (2007b): TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca²⁺/NFAT-dependent pathways. *Oncogene*, **26** (52), 7380-7385
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M. (2005): Lehninger Biochemie. Springer Verlag, Berlin
- Lessan-Pezeshki, M. (2002): Pregnancy after renal transplantation: points to consider. *Nephrol. Dial. Transplant.*, **17** (5), 703-707
- Li, S., Westwick, J., Poll, C. (2003): Transient receptor potential (TRP) channels as potential drug targets in respiratory disease. *Cell Calcium*, **33** (5-6), 551-558

- 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.*,
- Mariller, C., Allain, F., Kouach, M., Spik, G. (1996): Evidence that human milk isolated cyclophilin B corresponds to a truncated form. *Biochim.Biophys.Acta*, **1293** (1), 31-38
- Marshall, T. (1983): Artefacts associated with Nonidet P-40 upon sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gelelectrophoresis of protein. *Electrophoresis*, **4** (6), 436-438
- McKay, D.B. und Josephson, M.A. (2008): Pregnancy after kidney transplantation. *Clin.J.Am.Soc.Nephrol.*, **3 Suppl 2:S117-25.**, S117-S125
- McPherson, P.S. und Campbell, K.P. (1993): The ryanodine receptor/Ca²⁺ release channel. *J.Biol.Chem.*, **268** (19), 13765-13768
- Meyer, M.B., Watanuki, M., Kim, S., Shevde, N.K., Pike, J.W. (2006): The human transient receptor potential vanilloid type 6 distal promoter contains multiple vitamin D receptor binding sites that mediate activation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in intestinal cells. *Mol.Endocrinol.*, **20** (6), 1447-1461
- Möller, C.C., Wei, C., Altintas, M.M., Li, J., Greka, A., Ohse, T., Pippin, J.W., Rastaldi, M.P., Wawersik, S., Schiavi, S., Henger, A., Kretzler, M., Shankland, S.J., Reiser, J. (2007): Induction of TRPC6 channel in acquired forms of proteinuric kidney disease. *J.Am.Soc.Nephrol.*, **18** (1), 29-36
- Montell, C. (2005): The TRP superfamily of cation channels. *Sci.STKE.*, **2005** (272), 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** (2), 229-231
- Montell, C. und Rubin, G.M. (1989): Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*, **2** (4), 1313-1323
- Moreau, R., Daoud, G., Bernatchez, R., Simoneau, L., Masse, A., Lafond, J. (2002): Calcium uptake and calcium transporter expression by trophoblast cells from human term placenta. *Biochim.Biophys.Acta*, **1564** (2), 325-332
- Müller, C.S., Haupt, A., Bildl, W., Schindler, J., Knaus, H.G., Meissner, M., Rammner, B., Striessnig, J., Flockerzi, V., Fakler, B., Schulte, U. (2010): Quantitative proteomics of the Cav2 channel nano-environments in the mammalian brain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **107** (34), 14950-14957
- Niemeyer, B.A. (2005): Structure-function analysis of TRPV channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.*, **371** (4), 285-294
- Niemeyer, B.A., Bergs, C., Wissenbach, U., Flockerzi, V., Trost, C. (2001): Competitive regulation of Ca^T-like-mediated Ca²⁺ entry by protein kinase C and calmodulin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **98** (6), 3600-3605
- Nijenhuis, T., Hoenderop, J.G., Bindels, R.J. (2005): TRPV5 and TRPV6 in Ca(2+) (re)absorption: regulating Ca(2+) entry at the gate. *Pflugers Arch.*, **451** (1), 181-192

- Nilius, B., Owsianik, G., Voets, T., Peters, J.A. (2007): Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev.*, **87** (1), 165-217
- Nilius, B., Prenen, J., Hoenderop, J.G., Vennekens, R., Hoefs, S., Weidema, A.F., Droogmans, G., Bindels, R.J. (2002): Fast and slow inactivation kinetics of the Ca²⁺ channels ECaC1 and ECaC2 (TRPV5 and TRPV6). Role of the intracellular loop located between transmembrane segments 2 and 3. *J.Biol.Chem.*, **277** (34), 30852-30858
- Nilius, B., Vennekens, R., Prenen, J., Hoenderop, J.G., Droogmans, G., Bindels, R.J. (2001): The single pore residue Asp542 determines Ca²⁺ permeation and Mg²⁺ block of the epithelial Ca²⁺ channel. *J.Biol.Chem.*, **276** (2), 1020-1025
- Nilius, B. und Voets, T. (2005): TRP channels: a TR(I)P through a world of multifunctional cation channels. *Pflugers Arch.*, **451** (1), 1-10
- Nilius, B., Voets, T., Peters, J. (2005): TRP channels in disease. *Sci.STKE.*, **2005** (295), re8-
- Obata, Y., Yamamoto, K., Miyazaki, M., Shimotohno, K., Kohno, S., Matsuyama, T. (2005): Role of cyclophilin B in activation of interferon regulatory factor-3. *J.Biol.Chem.*, **280** (18), 18355-18360
- Owsianik, G., Talavera, K., Voets, T., Nilius, B. (2006): Permeation and selectivity of TRP channels. *Annu.Rev.Physiol.*, **68:685-717.**, 685-717
- Pedersen, S.F., Owsianik, G., Nilius, B. (2005): TRP channels: an overview. *Cell Calcium*, **38** (3-4), 233-252
- 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., Tsukaguchi, H., Brown, E.M., Hediger, M.A. (1999): Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption. *J.Biol.Chem.*, **274** (32), 22739-22746
- Peng, J.B., Chen, X.Z., Berger, U.V., Weremowicz, S., Morton, C.C., Vassilev, P.M., Brown, E.M., Hediger, M.A. (2000): Human calcium transport protein CaT1. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **278** (2), 326-332
- Phelps, C.B., Huang, R.J., Lishko, P.V., Wang, R.R., Gaudet, R. (2008): Structural analyses of the ankyrin repeat domain of TRPV6 and related TRPV ion channels. *Biochemistry*, **47** (8), 2476-2484
- Phillips, A.M., Bull, A., Kelly, L.E. (1992): Identification of a Drosophila gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the trp phototransduction gene. *Neuron*, **8** (4), 631-642
- Prevarskaya, N., Zhang, L., Barritt, G. (2007): TRP channels in cancer. *Biochim.Biophys.Acta*, **1772** (8), 937-946
- Price, E.R., Jin, M., Lim, D., Pati, S., Walsh, C.T., McKeon, F.D. (1994): Cyclophilin B trafficking through the secretory pathway is altered by binding of cyclosporin A. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **91** (9), 3931-3935
- Price, E.R., Zydowsky, L.D., Jin, M.J., Baker, C.H., McKeon, F.D., Walsh, C.T. (1991): Human cyclophilin B: a second cyclophilin gene encodes a peptidyl-prolyl isomerase with a signal sequence. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **88** (5), 1903-1907

- Rahfeld, J.U., Schierhorn, A., Mann, K., Fischer, G. (1994): A novel peptidyl-prolyl cis/trans isomerase from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.*, **343** (1), 65-69
- Ramsey, I.S., Delling, M., Clapham, D.E. (2006): An introduction to TRP channels. *Annu.Rev.Physiol*, **68**, 619-647
- Rehm, H. (2006): Der Experimentator: Proteinbiochemie / Proteomics. Spektrum Akademischer Verlag,
- Reiser, J., Polu, K.R., Moller, C.C., Kenlan, P., Altintas, M.M., Wei, C., Faul, C., Herbert, S., Villegas, I., Vila-Casado, C., McGee, M., Sugimoto, H., Brown, D., Kalluri, R., Mundel, P., Smith, P.L., Clapham, D.E., Pollak, M.R. (2005): TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nat.Genet.*, **37** (7), 739-744
- Riccio, A., Medhurst, A.D., Mattei, C., Kelsell, R.E., Calver, A.R., Randall, A.D., Benham, C.D., Pangalos, M.N. (2002): mRNA distribution analysis of human TRPC family in CNS and peripheral tissues. *Brain Res.Mol.Brain Res.*, **109** (1-2), 95-104
- Richter, G. (2003): Praktische Biochemie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Rycyzyn, M.A. und Clevenger, C.V. (2002): The intranuclear prolactin/cyclophilin B complex as a transcriptional inducer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **99** (10), 6790-6795
- Schägger, H., Cramer, W.A., von, J.G. (1994): Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal.Biochem.*, **217** (2), 220-230
- Schägger, H. und von Jagow G. (1991): Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal.Biochem.*, **199** (2), 223-231
- Schalkowsky, P. (2009): Untersuchung von affinitätsgereinigten Membranproteinkomplexen mittels Blue-Native-Gelelektrophorese und "Tube-Gel Digestion".
- Schindl, R. und Romanin, C. (2007): Assembly domains in TRP channels. *Biochem.Soc.Trans.*, **35** (Pt 1), 84-85
- Schmidt, R.F. (2001): Physiologie kompakt. Springer Verlag, Berlin
- Schmidt, R.F. (2000): Physiologie des Menschen. Springer-Verlag, Berlin
- Schoeber, J.P., Topala, C.N., Lee, K.P., Lambers, T.T., Ricard, G., van der Kemp, A.W., Huynen, M.A., Hoenderop, J.G., Bindels, R.J. (2008): Identification of Nipsnap1 as a novel auxiliary protein inhibiting TRPV6 activity. *Pflugers Arch.*,
- Schoeber, J.P., Topala, C.N., Wang, X., Diepens, R.J., Lambers, T.T., Hoenderop, J.G., Bindels, R.J. (2006): RGS2 inhibits the epithelial Ca²⁺ channel TRPV6. *J.Biol.Chem.*, **281** (40), 29669-29674
- Sel, S., Rost, B.R., Yildirim, A.O., Sel, B., Kalwa, H., Fehrenbach, H., Renz, H., Gudermann, T., Dietrich, A. (2008): Loss of classical transient receptor potential 6 channel reduces allergic airway response. *Clin.Exp.Allergy*, **38** (9), 1548-1558
- Shi, J., Mori, E., Mori, Y., Mori, M., Li, J., Ito, Y., Inoue, R. (2004): Multiple regulation by calcium of murine homologues of transient receptor potential proteins TRPC6 and TRPC7 expressed in HEK293 cells. *J.Physiol*, **561** (Pt 2), 415-432

- Shin, J.M. und Sachs, G. (1996): Dimerization of the gastric H⁺, K⁽⁺⁾-ATPase. *J.Biol.Chem.*, **271** (4), 1904-1908
- Sibley, C., Glazier, J., D'Souza, S. (1997): Placental transporter activity and expression in relation to fetal growth. *Exp.Physiol*, **82** (2), 389-402
- Siekierka, J.J., Hung, S.H., Poe, M., Lin, C.S., Sigal, N.H. (1989): A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin. *Nature*, **341** (6244), 755-757
- Singh, U., Sun, T., Looman, C., Heuchel, R., Elliott, R., Freichel, M., Meissner, M., Flockerzi, V., Fundele, R. (2007): Expression and function of the gene encoding the voltage-dependent calcium channel beta3-subunit in the mouse placenta. *Placenta*, **28** (5-6), 412-420
- Sinkins, W.G., Goel, M., Estacion, M., Schilling, W.P. (2004): Association of immunophilins with mammalian TRPC channels. *J.Biol.Chem.*, **279** (33), 34521-34529
- Sopjani, M., Kunert, A., Czarkowski, K., Klaus, F., Laufer, J., Foller, M., Lang, F. (2010): Regulation of the Ca⁽²⁺⁾ channel TRPV6 by the kinases SGK1, PKB/Akt, and PIKfyve. *J.Membr.Biol.*, **233** (1-3), 35-41
- Spik, G., Haendler, B., Delmas, O., Mariller, C., Chamoux, M., Maes, P., Tartar, A., Montreuil, J., Stedman, K., Kocher, H.P., . (1991): A novel secreted cyclophilin-like protein (SCYLP). *J.Biol.Chem.*, **266** (17), 10735-10738
- Sternfeld, L., Anderie, I., Schmid, A., Al-Shaldi, H., Krause, E., Magg, T., Schreiner, D., Hofer, H.W., Schulz, I. (2007): Identification of tyrosines in the putative regulatory site of the Ca²⁺ channel TRPV6. *Cell Calcium*, **42** (1), 91-102
- Sternfeld, L., Krause, E., Schmid, A., Anderie, I., Latas, A., Al-Shaldi, H., Kohl, A., Evers, K., Hofer, H.W., Schulz, I. (2005): Tyrosine phosphatase PTP1B interacts with TRPV6 in vivo and plays a role in TRPV6-mediated calcium influx in HEK293 cells. *Cell Signal.*, **17** (8), 951-960
- Stettin, D., Ströhle, A., Wolters, M., Hahn, A. (2005): Ernährung und Osteoporose - Bedeutung von Calcium und Vitamin D. *Deutsche Apotheker Zeitung*, **145** (15), 74-80
- Stevens, F.C. (1983): Calmodulin: an introduction. *Can.J.Biochem.Cell Biol.*, **61** (8), 906-910
- Stumpf, T. (2006): Anreicherung und Charakterisierung des TRPV6-Membranproteins aus humaner Plazenta.
- 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** (26), 18086-18098
- Suzuki, Y., Kovacs, C.S., Takanaga, H., Peng, J.B., Landowski, C.P., Hediger, M.A. (2008a): Calcium channel TRPV6 is involved in murine maternal-fetal calcium transport. *J.Bone Miner.Res.*, **23** (8), 1249-1256
- Suzuki, Y., Landowski, C.P., Hediger, M.A. (2008b): Mechanisms and regulation of epithelial Ca²⁺ absorption in health and disease. *Annu.Rev.Physiol*, **70**, 257-271
- Takahashi, N., Hayano, T., Suzuki, M. (1989): Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature*, **337** (6206), 473-475

- Thiebaud, D., Krieg, M.A., Gillard-Berguer, D., Jacquet, A.F., Goy, J.J., Burckhardt, P. (1996): Cyclosporine induces high bone turnover and may contribute to bone loss after heart transplantation. *Eur.J.Clin.Invest.*, **26** (7), 549-555
- Thyagarajan, B., Lukacs, V., Rohacs, T. (2008): Hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate mediates calcium-induced inactivation of TRPV6 channels. *J.Biol.Chem.*, **283** (22), 14980-14987
- Trost, C., Marquart, A., Zimmer, S., Philipp, S., Cavalie, A., Flockerzi, V. (1999): Ca²⁺-dependent interaction of the trpl cation channel and calmodulin. *FEBS Lett.*, **451** (3), 257-263
- van Abel M., Huybers, S., Hoenderop, J.G., van der Kemp, A.W., van Leeuwen, J.P., Bindels, R.J. (2006): Age-dependent alterations in Ca²⁺ homeostasis: role of TRPV5 and TRPV6. *Am.J.Physiol Renal Physiol*, **291** (6), F1177-F1183
- 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** (8), 2102-2109
- van Abel, M., Hoenderop, J.G., van der Kemp, A.W., van Leeuwen, J.P., Bindels, R.J. (2003): Regulation of the epithelial Ca²⁺ channels in small intestine as studied by quantitative mRNA detection. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol*, **285** (1), G78-G85
- 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** (23), 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** (1), 303-312
- 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 Ca(2+) channels (TRPV5 and TRPV6) requires association of the S100A10-annexin 2 complex. *EMBO J.*, **22** (7), 1478-1487
- van de Graaf, S.F., Hoenderop, J.G., van der Kemp, A.W., Gisler, S.M., Bindels, R.J. (2006b): Interaction of the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6 with the intestine- and kidney-enriched PDZ protein NHERF4. *Pflugers Arch.*, **452** (4), 407-417
- 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** (7), 4077-4086
- Venkatachalam, K. und 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 Ca(2+) channel. *J.Biol.Chem.*, **275** (6), 3963-3969
- Vennekens, R., Voets, T., Bindels, R.J., Droogmans, G., Nilius, B. (2002): Current understanding of mammalian TRP homologues. *Cell Calcium*, **31** (6), 253-264

- Vikis, H.G. und Guan, K. (2004): Glutathione-S-Transferase-Fusion Based Assays for Studying Protein-Protein Interactions. *Protein-protein interactions: methods and applications*, Humana Press, Clifton, New Jersey
- Voets, T., Janssens, A., Droogmans, G., Nilius, B. (2004): Outer pore architecture of a Ca²⁺-selective TRP channel. *J.Biol.Chem.*, **279** (15), 15223-15230
- Wang, P. und Heitman, J. (2005): The cyclophilins. *Genome Biol.*, **6** (7), 226-
- Welsch, U. und Sobotta, J. (2006): Lehrbuch Histologie. Elsevier, München
- Winn, M.P., Conlon, P.J., Lynn, K.L., Farrington, M.K., Creazzo, T., Hawkins, A.F., Daskalakis, N., Kwan, S.Y., Ebersviller, S., Burchette, J.L., Pericak-Vance, M.A., Howell, D.N., Vance, J.M., Rosenberg, P.B. (2005): A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science*, **308** (5729), 1801-1804
- Wissenbach, U., Niemeyer, B., Himmerkus, N., Fixemer, T., Bonkhoff, H., Flockerzi, V. (2004a): TRPV6 and prostate cancer: cancer growth beyond the prostate correlates with increased TRPV6 Ca²⁺ channel expression. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **322** (4), 1359-1363
- Wissenbach, U., Niemeyer, B.A., Fixemer, T., Schneidewind, A., Trost, C., Cavalie, A., Reus, K., Meese, E., Bonkhoff, H., Flockerzi, V. (2001): Expression of CaT-like, a novel calcium-selective channel, correlates with the malignancy of prostate cancer. *J.Biol.Chem.*, **276** (22), 19461-19468
- Wissenbach, U., Niemeyer, B.A., Flockerzi, V. (2004b): TRP channels as potential drug targets. *Biol.Cell*, **96** (1), 47-54
- Wittig, I. (2008): Native Elektrophorese von Membranproteinen. *BioSpektrum*, **14** (5), 499-501
- Wong, F., Schaefer, E.L., Roop, B.C., LaMendola, J.N., Johnson-Seaton, D., Shao, D. (1989): Proper function of the Drosophila trp gene product during pupal development is important for normal visual transduction in the adult. *Neuron*, **3** (1), 81-94
- Yu, H., Wakim, B., Li, M., Halligan, B., Tint, G.S., Patel, S.B. (2007): Quantifying raft proteins in neonatal mouse brain by 'tube-gel' protein digestion label-free shotgun proteomics. *Proteome.Sci.*, **5:17.**, 17-
- Yu, Y., Fantozzi, I., Remillard, C.V., Landsberg, J.W., Kunichika, N., Platoshyn, O., Tigno, D.D., Thistlethwaite, P.A., Rubin, L.J., Yuan, J.X. (2004): Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **101** (38), 13861-13866
- Zhang, Q. (2008): Localisation and Characterisation of the TRPV6 Calcium Channel Protein in Human Placenta.
- Zhang, Q., Schulenburg, T., Tan, T., Lang, B., Friauf, E., Fecher-Trost, C. (2010): Proteome analysis of a plasma membrane-enriched fraction at the placental feto-maternal barrier. *Proteomics.Clin.Appl.*, **4** (5), 538-549
- Zhuang, L., Peng, J.B., Tou, L., Takanaga, H., Adam, R.M., Hediger, M.A., Freeman, M.R. (2002): Calcium-selective ion channel, CaT1, is apically localized in gastrointestinal tract epithelia and is aberrantly expressed in human malignancies. *Lab Invest*, **82** (12), 1755-1764

Danksagung

An erster Stelle danke ich Frau Jun. Prof. Dr. Claudia Fecher Trost für die Möglichkeit die Ergebnisse und Hinweise aus meiner Diplomarbeit in einer Promotion weiterzuverfolgen. Der Danke gilt hierbei insbesondere für die Überlassung des Promotionsthemas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Geräte, die Betreuung während meiner praktischen Arbeit und die Geduld und Diskussionsbereitschaft während der schriftlichen Ausarbeitung der Dissertation, die schlussendlich zum positiven Abschluss dieses Lebensabschnitts geführt hat.

Herrn Prof. Dr. E. Friauf danke ich für die Möglichkeit einige Proben mittels ESI-Massenspektrometrie analysieren zu lassen, sowie die Übernahme des Zweitgutachtens.

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

Weiterhin gilt der Dank der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. V. Flockerzi, Pharmakologie, Universität des Saarlandes für die Bereitstellung der cDNS-Konstrukte, der TRPC6-Antikörper, der verschiedenen Mäusegewebe und der transfizierten HEK- und COS-Zellen. Bedanken möchte ich mich hierbei insbesondere auch bei Dr. Ulrich Wissenbach und Dr. Marcel Meissner.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Martin Jung, medizinische Biochemie, Universität des Saarlandes danke ich für die Zurverfügungstellung des TRPV6-Peptidblots.

Herrn Prof. Dr. G. Niedner-Schatteburg danke ich für die Erlaubnis, das MALDI-ToF-Massenspektrometer für meine Proteinanalysen benutzen zu dürfen. Seinen Mitarbeitern Frau Dr. Stefanie Jaberg und Herrn Dipl.-Wirtschaftschem. Heinrich Kampschulte danke ich für die freundliche Betreuung und Unterstützung am Gerät, die postwendende Behebung von Problemchen und die manchmal schwierige Organisation des Belegungsplanes.

Herrn Dr. Thomas Schulenburg (AG Tierphysiologie, TU Kaiserslautern) danke ich für die Unterstützung bei der Messung und Auswertung einiger Proteinproben mittels ESI-Massenspektrometrie.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Proteinfunktion/Proteomics danke ich für Ihre Unterstützung und Mitarbeit, für die tolle Atmosphäre innerhalb und außerhalb des Labors, für eine wunderbare Zeit mit vielen Erinnerungen und Anekdoten.

Im Einzelnen sind dies meine Doktorantenkollegen Herr Dr. Qi Zhang und Frau Dr. Janka Dörr; die Diplomanden Frau Dipl. Biol. Simone Kalinke, Frau Dipl. Biol. Barbara Lang, Herr Dipl. Biol. Pascal Schalkowsky, Frau Dipl. Biol. Nicole Seißler und Herr Dipl. Biol. Tao Tan; die Bachelorstudentin Miriam Freyler, der Forschungspraktikant Daniel Utzschneider, die Vielzahl an technischen Assistentinnen, namentlich Frau Sandra Bergstein, Frau Dagmar Groß, Frau

Christine Förster-Schorr und Frau Andrea Trinkaus, sowie die Sekretärinnen Frau Simone Adkins, Frau Renate Feth und Frau Gabriele Seidel.

Alle haben ihren Teil zum Gelingen dieser Promotion beigetragen. Die individuellen Eigenschaften und Leistungen eines Jeden hier aufzuzählen, würde den Rahmen dieser Danksagung sprengen. Deswegen einfach DANKE an ALLE für ALLES!

Zu guter Letzt gilt mein besonderer Dank meiner Familie und meinen Freunden.

Meinen Eltern, meiner Schwester und meinen beiden Omas danke ich für die Unterstützung, die Liebe und den Rückhalt in den letzten 30 Jahren.

Meiner Lieblingscousine Frau Dr. Melanie Stumpf danke ich für die Korrektur dieser Arbeit und dafür, dass Sie Vorbild und Vorreiter für meinen akademischen Weg, aber auch für meinen persönlichen Weg in die neue Heimat Freiburg war.

Meinen Freunden danke ich für die Freundschaft und den Zusammenhalt ungeachtet der geographischen Distanzen, die das Leben mit sich bringt.

Lebenslauf

Name: Tobias Stumpf

Staatsangehörigkeit: deutsch

Studium

10/2001 – 05/2006 Studium der Biologie an der Technischen Universität Kaiserslautern

Abschluss: Diplom

11/2003 Vordiplom Biologie

06/2005 – 02/2006 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Proteinfunktion/Proteomics unter der Leitung von Jun. Prof. Dr. Claudia Fecher-Trost

Thema: „Anreicherung und Charakterisierung des TRPV6-Membranproteins aus humaner Plazenta“

Promotion

06/2006 – 10/2011 Promotion an der Technischen Universität Kaiserslautern, Fachbereich Biologie, Arbeitsgruppe Proteinfunktion/Proteomics unter der Leitung von Jun. Prof. Dr. Claudia Fecher-Trost