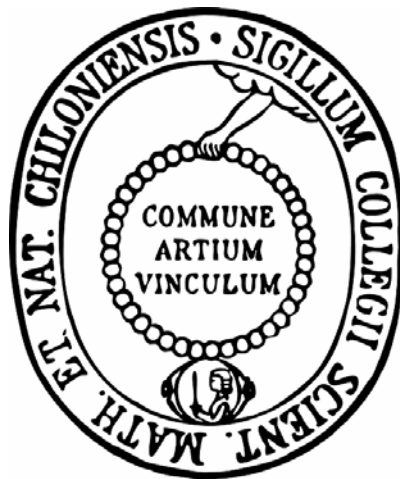


Untersuchung eines möglichen Interaktionspartners von Aquaporin-2



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von

Nadine Fricke

Kiel 2011

Referent:

Prof. Dr. Eric Beitz

Koreferent:

Prof. Dr. Rolf Mentlein

Tag der mündlichen Prüfung:

25.02.2011

Zum Druck genehmigt:

Prof. Dr. Lutz Kipp

(Dekan

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

IV

1	Einleitung	1
1.1	Aquaporine	3
1.2	Nephrogener Diabetes insipidus	5
1.3	Aquaporin 2	6
1.4	<i>Trafficking</i> von AQP2	8
1.5	Rolle der Phosphorylierung des AQP2 am Ser256	10
1.6	Vorarbeiten	11
1.6.1	Aha1	12
1.7	Zielsetzung der Arbeit	14
2	Material	15
2.1	Enzyme, Kits, Chemikalien und Verbrauchsmaterial	15
2.2	Geräte	17
2.3	Verwendete Plasmide	19
2.4	Oligonukleotide (Sequenzierprimer)	21
2.5	Verwendete <i>Escherichia coli</i> - Stämme	21
2.6	Verwendete Zelllinien	22
2.7	Verwendete siRNA-Oligonukleotide	22
2.8	Verwendete Antikörper	23
2.9	Puffer und Lösungen	25
2.9.1	Molekularbiologische Methoden	25
2.9.2	proteinbiochemische Methoden	26
3	Methoden	30
3.1	Molekularbiologische Methoden	30
3.1.1	Isolierung und Reinigung von DNA	30
3.1.2	Agarose-Flachbett-Gelelektrophorese	31
3.1.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	31
3.1.4	Restriktionsverdau von DNA	31
3.1.5	Ligation	32
3.1.6	Transformation kompetenter <i>Escherichia coli</i> Zellen	32

Inhaltsverzeichnis

3.1.7	Klonierungsarbeiten	33
3.1.8	DNA - Sequenzierung	34
3.2	<i>E. coli</i> Zellkultur	35
3.2.1	<i>E. coli</i> - Dauerkulturen.....	35
3.2.2	Expression von Proteinen in <i>E. coli</i>	35
3.2.3	Aufschluss von <i>E. coli</i> -Zellen	36
3.3	Zellkultur von eukaryotischen Zellen	36
3.3.1	Passagieren von Zellen.....	36
3.3.2	Dauerkulturen anlegen und auftauen	37
3.3.3	Transiente Transfektion	38
3.3.4	Stabile Transfektion von MDCK-II-Zellen	38
3.3.5	Aufschluss eukaryotischer Zellen.....	39
3.4	Proteinbiochemische Methoden	40
3.4.1	Proteingehaltsbestimmung nach Bradford	40
3.4.2	BCA-Assay.....	40
3.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	40
3.4.4	Clear native PAGE (CNP)	41
3.4.5	<i>Western-Blotting</i>	42
3.4.6	Peptidspotmembran-Assay	43
3.4.7	Recyclen von PVDF-Membranen.....	44
3.4.8	Indirekte Immunofluoreszenz	44
3.4.9	Konfokale Laserscanmikroskopie.....	45
3.4.10	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA).....	45
3.4.11	Koimmunpräzipitation.....	46
3.4.12	Ni ²⁺ -NTA Affinitätschromatographie	46
3.4.13	Glutathion-Affinitätschromatographie	47
3.4.14	Dialyse	47
3.4.15	Faktor Xa-Verdau.....	47
3.5	Statistische Auswertung	48
4	Ergebnisse	49
4.1	Bindet Aha1 direkt an AQP2?	49
4.1.1	Assays mit Lysaten AQP2 exprimierender eukaryotischer Zelllinien....	49
4.1.2	Rekombinante Expression und Aufreinigung von Aha1	52
4.1.3	<i>In vitro</i> Bindungsassays von 10xHis-Aha1 an AQP2.....	56

4.1.4	Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR) Spektroskopie.....	58
4.2	Einfluss von Aha1 auf das intrazelluläre <i>Trafficking</i> von AQP2 - Untersuchungen nach RNA-Interferenz.....	61
4.2.1	Einschätzung der Transfektionseffizienz.....	63
4.2.2	siRNA-Oligonukleotide.....	64
4.2.3	ELISA.....	72
4.2.4	siRNA-Plasmid.....	74
4.2.5	Etablierung stabil EGFPmAQP2wt und EGFPmAQP2-S256D exprimierender Zelllinien.....	78
5	Diskussion.....	82
5.1	Bindet Aha1 direkt an AQP2.....	83
5.2	Beeinflusst Aha1 das intrazelluläre Trafficking von AQP2.....	88
5.3	Fazit.....	95
6	Ausblick.....	96
7	Zusammenfassung.....	97
8	Summary.....	99
9	Literaturverzeichnis.....	100
10	Anhang.....	112
10.1	Peptidspotmembranen.....	112
10.2	Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide.....	115

Abkürzungsverzeichnis

ACE	<i>Angiotensin converting enzyme</i>
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AQP	Aquaporin
Aqua bidest.	gereinigtes Wasser
b	Basen
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
α	<i>chicken anti</i> (Antikörper aus Huhn)
CMV	Cytomegalie-Virus
CNP	<i>clear native PAGE</i>
Cy3/Cy5	Cyanin3/Cyanin5
α -	<i>donkey anti</i> (Antikörper aus Esel)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
EGFP	<i>enhanced</i> grün fluoreszierendes Protein
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
FSK	Forskolin
α -	<i>goat anti</i> (Antikörper aus Ziege)
GAPDH	Glyeraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
G _s	stimulierendes G-Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
HA	Hämagglutinin

HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
Hsc 70	<i>Heat shock cognate 70 kDa protein</i>
Hsp 70	<i>Heat shock 70 kDa protein</i>
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria Broth (<i>E. coli</i> -Nährmedium nach Luria und Burrous)
α -	<i>mouse anti</i> (Antikörper aus Maus)
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MDCK	<i>Madin Darby canine kidney</i>
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
Ni ²⁺ -NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBS-CM	PBS mit Calcium und Magnesium
PC	Phosphatidylcholin
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PE	Phosphatidylethanolamin
pI	isoelektrischer Punkt
POD	Peroxidase
P/S	Penicillin/Streptomycin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
α -	<i>rabbit anti</i> (Antikörper aus Hase)
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMB	3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

1 Einleitung

180 Liter. Jeden Tag.

Die Nieren sind der Hauptmotor für die Aufrechterhaltung des Wassergleichgewichts im menschlichen Körper. Der Mensch besteht zu 60 % aus Wasser, sein Blutplasma sogar zu 95 %. Ungefähr 300 mal am Tag durchströmt die gesamte Blutmenge eines Menschen seine Nieren, insgesamt etwa 1500 Liter. Dabei wirken die Nieren wie Filter, welche die Blutzellen zurückhalten und aus dem Plasma den Primärharn bilden. Das Blut wird im Glomerulus filtriert und die menschlichen Nieren bilden etwa 180 Liter Plasmafiltrat an einem Tag (Smith 1951).

Dieses Plasmafiltrat - auch Primärharn genannt - wird auf seinem Weg durch die Tubuli (Nierenkanälchen) zum Sekundärharn und besitzt bei Abgabe an die Harnblase nur noch 1 % seines Volumens. Neben der Filtration von Wasser können im Glomerulus auch Moleküle aus dem Blut filtriert oder aktiv sezerniert werden. Die Nieren regulieren somit neben dem Wasserhaushalt auch die renale Ausscheidung von Stoffwechselprodukten, therapeutisch eingesetzten Wirkstoffen und deren Abbauprodukten, harnpflichtigen Substanzen wie Harnstoff, Harnsäure und Kreatinin und den Elektrolythaushalt des Körpers.

Nicht nur durch ihre Wasserfiltration kommt den Nieren eine besondere Bedeutung bei der Regulation des Blutdrucks zu. Über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System beeinflussen sie diesen ebenfalls. Bei zu geringem Blutvolumen und somit Hypotonie verschlechtert sich die Versorgung der Organe, was zu Organversagen führen kann. Bei Abfall des Blutdrucks bzw. des Blutvolumens wird Vasopressin aus der Neurohypophyse ausgeschüttet und vermittelt die vermehrte Wasserrückresorption in den Nieren - das Blutvolumen steigt. Ein weiterer Mechanismus ist die Ausschüttung von Renin in den Nieren. Dadurch erhöht sich der Gefäßwiderstand vor allem in den Vasa efferentia. Der Druck in den Kapillarschlingen ist die treibende Kraft für die Filtration in Nieren und so kann die Filtration in den Nierenkörperchen trotz verminderter Nierendurchblutung aufrechterhalten werden. Hypertonie kann Organe und Blutgefäße schädigen und zu Folgeerkrankungen führen (Child 1938). Bei steigendem arteriellen Mitteldruck wird durch Druckdiurese in den Nieren und somit vermehrte Flüssigkeitsausscheidung der Blutdruck gesenkt.

Die renale Wasserrückresorption unterliegt der Steuerung durch Vasopressin, welches am V2-Rezeptor im Sammelrohr der Niere bindet und dort antidiuretisch wirkt. Inadäquate Vasopressinausschüttung führt zu übermäßiger Wasserrückresorption und Hyponatriämie. Dieser Effekt kann bei bei Krebserkrankungen, Herzinsuffizienz, fortgeschrittener Nierenfunktionsstörung, chronisch erhöhtem Blutdruck, dem Schwartz-Bartter-Syndrom und unter Behandlung mit Lithium auftreten. Chronische Hyponatriämie kann zu Apathie, Konzentrationsstörungen, Erinnerungsschwäche, Desorientiertheit und verlangsamter Reaktionsgeschwindigkeit führen, akute Hyponatriämie zu Bewusstseinsstrübung bis hin zum Koma. Besonders bei Herzinsuffizienz steht Hyponatriämie in engem Zusammenhang mit Morbidität und Mortalität. Konventionelle Therapien der Hyponatriämie bewegten sich bisher zwischen Behebung des Volumenmangels und Behandlung mit Demeclocyclinhydrochlorid oder Lithium. Beide induzieren einen leichten nephrogenen Diabetes insipidus. Doch diese Therapieansätze sind wegen potentieller Toxizität und inkonsistenter Effizienz nur unzureichend und spezifische Therapieansätze fehlten lange. Mit der Entwicklung und Zulassung (in Europa am 3. August 2009) von Tolvaptan - eines selektiven Vasopressinantagonisten am V2-Rezeptor - ist zum ersten Mal ein direkter Einfluss möglich. Klinische Studien konnten zeigen, dass Tolvaptan Therapiesicherheit bei nur geringen Nebenwirkungen wie Mundtrockenheit und Durstgefühl bietet (Schrier *et al.* 2006).

Tolvaptan bindet an den V2-Rezeptor in der basolateralen Membran der Sammelrohrzellen und verhindert somit den Einfluss von Vasopressin auf die Zellen. Bindet Vasopressin selbst an den V2-Rezeptor, löst es eine Signalkaskade aus, an deren Ende der vermehrte Einbau von Aquaporin-2 (AQP2) in die apikale Membran der Sammelrohrzellen und die erhöhte Rückresorption von Wasser aus dem Primärharn stehen - daher wirkt Vasopressin antidiuretisch. Somit wirkt Tolvaptan direkt diuretisch, ohne den Elektrolythaushalt zu beeinflussen. Das unter Vasopressin-Einfluss stehende AQP2 ist eines der 13 bisher im Menschen entdeckten Aquaporine. Aquaporine sind zelluläre Wasserkanäle. Da Wasser im gesamten Organismus eine wichtige Rolle spielt, sind Aquaporine in jedem Gewebe zu finden und gewährleisten in den Nieren deren hohe Wasserrückresorption.

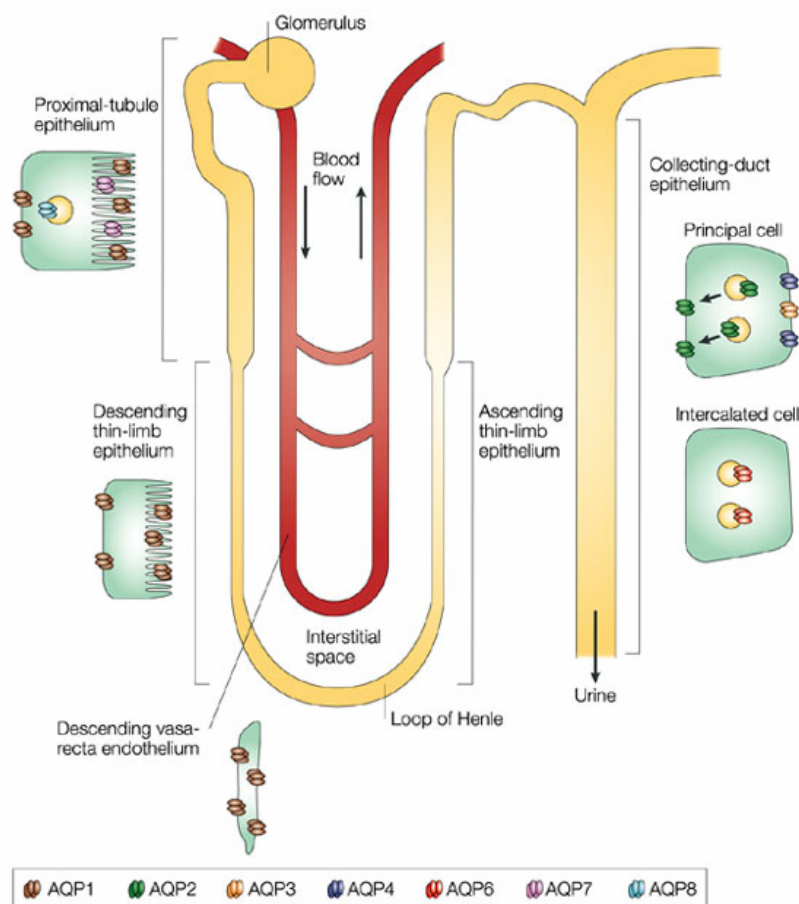
1.1 Aquaporine

Aquaporine lassen sich einteilen in orthodoxe Aquaporine, welche ausschließlich Wasser leiten (AQP0; 1, 2, 4, 5); Aquaglyceroporine, die neben Wasser auch kleine ungeladene Moleküle - wie Harnstoff oder Glycerol - leiten (AQP3, 7, 9, 10) und unorthodoxe Aquaporine (AQP6, 8, 11, 12) - diese besitzen eine noch nicht genauer klassifizierte Funktion (Zardoya 2005; Gonen und Walz 2006; Gorelick *et al.* 2006). Die in den Nieren exprimierten Aquaporine setzen sich aus allen drei Gruppen zusammen. Von den 13 humanen Aquaporinen werden acht Aquaporine im Nierengewebe exprimiert (AQP1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 11) (Nielsen 2002). Dies zeigt bereits die enorme Bedeutung der Niere für den Wasserhaushalt im Körper. Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über ihre Funktion und mögliche Beteiligung an Erkrankungen.

Tabelle 1.1: *Lokalisation, Funktion und evtl. Beteiligungen der menschlichen Aquaporine an Erkrankungen. Diese Tabelle beschränkt sich auf in den Nieren exprimierte Aquaporine (King et al. 2004, Nielsen et al. 2002, King et al. 2001, Manley et al. 2000, Verkman 2000, Borgnia et al. 1999, Yasui et al. 1999, Ishibashi et al. 1997, Ma et al. 1997, Deen et al. 1994, Preston et al. 1994, Fushimi et al. 1993, Nielsen et al. 1993).*

<i>Isoform</i>	<i>Lokalisation/Funktion</i>	<i>beteiligt an</i>
AQP1	Erythrozyten, Niere, Gehirn, Auge, Lunge, Endothel / Harnkonzentrierung, Blutsmolarität, Augeninnendruck	Katarakt, Tumoren, Sjögren-Syndrom
AQP2	Niere, Innenohr (?) / Harnkonzentrierung	Nephrogenem Diabetes insipidus, kongestiver Herzinsuffizienz, Morbus Menière
AQP3	Niere, Lunge, Auge, Kolon, Haut / Harnkonzentrierung, Epithelbefeuchtung, Wundheilung	Hauttumoren
AQP4	Gehirn, Niere, Lunge, Auge zerebrale Wasserhomöostase, Harnkonzentrierung, Augeninnendruck	Hirnödemen Neuromyelitis optica
AQP6	Niere / Säuresekretion (?)	
AQP7	Niere, Spermien, Adipozyten renale Glycerolabsorption, Spermienbeweglichkeit, Fettmetabolismus	Adipositas Unfruchtbarkeit
AQP8	Pankreas, Leber, Niere / H ₂ O ₂ -Transport (?)	
AQP11	Niere / Nierenentwicklung (?)	in k.o.-Maus: polyzystischer Niere

Die wichtigsten Aquaporine für die Resorption von Wasser aus dem Primärharn sind AQP1, AQP2, AQP3 und AQP4. AQP1 ist in Segmenten des proximalen Tubulus und des absteigenden Astes der Henle'schen Schleife lokalisiert (Nielsen *et al.* 1993c, Sabolic *et al.* 1992) und für den Hauptteil der renalen Wasserrückresorption (90%) verantwortlich. AQP2, AQP3 und AQP4 werden in den Hauptzellen des kortikalen, äußeren und inneren medulären Sammelrohrs exprimiert (Fushimi *et al.* 1993) (Abb. 1.1). AQP2 findet sich dort in der apikalen Plasmamembran sowie in subapikalen Vesikeln (Nielsen *et al.* 1993a) und unterliegt der Regulation durch Vasopressin über den V2-Rezeptor (Nielsen *et al.* 1995a, Sabolic *et al.* 1995, Yamamoto *et al.* 1995). AQP2 spielt eine Rolle bei klinischen Defekten wie Polyurie und nephrogenem Diabetes insipidus (Kwon *et al.* 2001, Loonen *et al.* 2008, Nielsen *et al.* 2002, Schrier 2008).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Abbildung 1.1: Schema der AQP-Expression in der Niere. (modifiziert nach: King *et al.* 2002)

1.2 Nephrogener Diabetes insipidus

Mutationen in den Genen für den V2-Rezeptor oder AQP2 führen zu nephrogenem Diabetes Insipidus (NDI). Der Haupteffekt von V2-Rezeptor-Mutationen besteht in der totalen oder partiellen Abwesenheit des V2-Rezeptors in der Plasmamembran der Sammelrohrzellen. Dadurch entsteht eine Resistenz gegenüber Vasopressin und dies führt zu Polyurie (erhöhtes Harnvolumen), Polydipsie (übersteigertes Durstempfinden) und Asthenurie (verringerte Harnkonzentration) unterschiedlicher Ausprägung (Bichet 1996). Therapeutisch wird neben ausreichender Wasserzufuhr eine kochsalz-, kalium- und eiweißarme Diät empfohlen, sowie die Gabe von Thiazid-Diuretika zusammen mit anti-inflammatorischen, nicht-steroidalen Wirkstoffen wie Amilorid und/oder Indometacin um die bei NDI entstehende Hypernatriämie auszugleichen.

Im AQP2-Gen liegen 5 % der NDI verursachenden und es sind über 30 verschiedene Mutationen bis heute bekannt. Viele der Mutationen liegen im C-Terminus des AQP2, was dazu führt, dass diese AQP2-Varianten in andere zelluläre Kompartimente sortiert werden (de Mattia *et al.* 2004; Kamsteeg *et al.* 2003, Kuwahara *et al.* 2001, Marr *et al.* 2002, Mulders *et al.* 1998, Procino *et al.* 2003).

NDI kann auch erworben werden. Der erworbene NDI kann zum Beispiel durch längerfristige Behandlung von bipolaren Störungen mit Lithium verursacht sein. Lithium reduziert die Expression von AQP2 und AQP3 im Sammelrohr (nach 28 Tagen Lithium-Behandlung reduzierte sich die AQP2-Menge auf 30 %). Es wird vermutet, dass Lithium die V2-Rezeptor-abhängige Adenylatzyklase 6 (AC6) inhibiert. Diese Inhibition führt zu einer relativen Vasopressin-Resistenz, Polyurie und NDI bei 20 bis 30 % der mit Lithium behandelten Patienten (Christensen *et al.* 1985, Kwon *et al.* 2000, Marples *et al.* 1995). Bei erworbenem NDI werden Thiazide und Amilorid eingesetzt, welche auch die Expression von AQP2 erhöhen sollen (Bedford *et al.* 2008, Kim *et al.* 2004). Auch Wirkstoffe, welche auf das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System wirken, werden genutzt: Captopril (ACE-Hemmer) und Spironolacton (Mineralokortikoid-Rezeptor Blocker). Auch sie erhöhen die Menge an AQP2 innerhalb der Zellen des Sammelrohrs (Nielsen *et al.* 2006).

Aus der intensiven Forschung zur selektiven Beeinflussung der Wasserpermeabilität des Sammelrohrs und der enormen Bedeutung des Wasserhaushaltes für die

grundlegenden Lebensfunktionen lässt sich erschließen, wie wichtig Erkenntnisse im Zusammenspiel von Vasopressin und AQP2 in den Zellen des Sammelrohres sind.

1.3 Aquaporin 2

Vor allem in der Einstellung der Wasserhomöostase bei Säugetieren konnte ein starker Einfluss von AQP2 festgestellt werden: Mutationen im AQP2-Gen oder Expressionsreduktion bei Ratten führten zu einem schweren NDI (Kwon *et al.* 2000, Marples *et al.* 1995). AQP2 ist durch den Einfluss des Vasopressin ein wichtiger Parameter bei der kurzfristigen Beeinflussung der Wasserpermeabilität (Nielsen *et al.* 1995a, Sabolic *et al.* 1995, Yamamoto *et al.* 1995) und somit von großem klinischen Interesse. Abbildung 1.2 zeigt die Vorgänge in den Sammelrohrzellen mit und ohne Vasopressin am V2-Rezeptor. In Abbildung 1.2 A ist vereinfacht der Ruhezustand der Zellen dargestellt. AQP2 wird exprimiert, nach Abschnürung in Golgi-Vesikeln zur apikalen Zellmembran transportiert. Dort befinden sich also Speichervesikel mit AQP2, welche im subapikalen Bereich der Zellen verbleiben. In Abbildung 1.2 B ist die Signalkaskade dargestellt, welche Vasopressin auslöst. Bindet Vasopressin, wird die Konzentration an cAMP, einem *second messenger*, in der Zelle erhöht. Dies führt, über die Aktivierung von Proteinkinasen, zur Phosphorylierung verschiedener Proteine. Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert den C-Terminus von AQP2 in den Speichervesikeln und initiiert das *Trafficking* zur apikalen Membran.

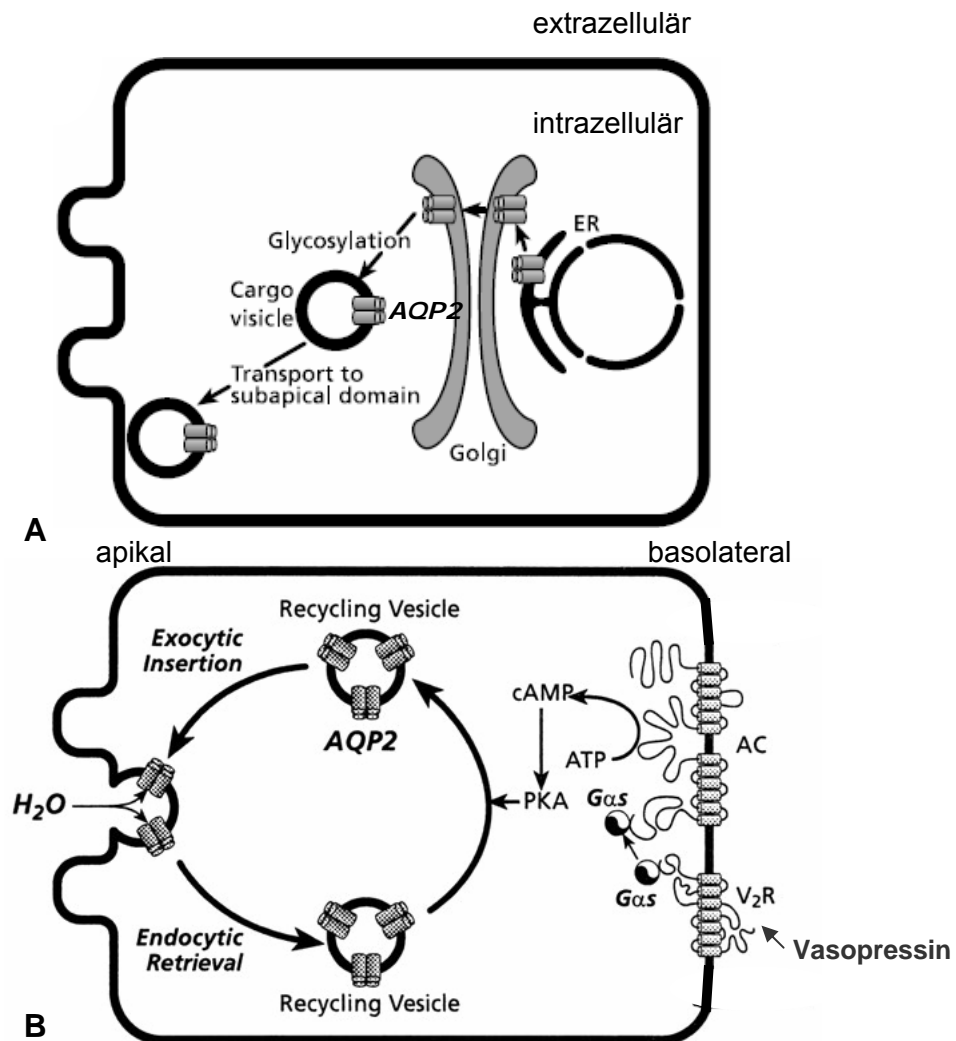


Abbildung 1.2: A: Vereinfachtes Schema der Basalexpression von AQP2 in den Sammelrohrzellen der Niere. B: Vereinfachtes Schema der Signalkaskade nach Vasopressin-Einwirkung auf die basolaterale Membran der Sammelrohrzellen der Niere. ER: Endoplasmatisches Retikulum; V₂R: Vasopressin-Rezeptor 2; AC: Adenylatzyklase, (modifiziert nach Nielsen *et al.* 2002).

Es gilt als gesichert, dass die Phosphorylierung des AQP2 ein maßgeblicher Auslöser für den vermehrten Einbau des AQP2 in die apikale Zellmembran ist. Dazu werden AQP2-Speichervesikel (Kachadorian *et al.* 1975, Wade *et al.* 1981) an die Membran rekrutiert und verschmelzen mit dieser (Abb. 1.2 B). Diese Antwort auf Vasopressin ist 5 bis 30 Minuten nach Bindung des Vasopressin an den V₂-Rezeptor zu beobachten (Kuwahara und Verkman 1989, Wall *et al.* 1992). Die Phosphorylierung von AQP2 als Initialisierung seines Traffickings erhöht die Wasserpermeabilität des Sammelrohrs und ist für die Physiologie der Niere von großem Interesse.

1.4 *Trafficking* von AQP2

Trafficking, also sortieren und gezielter Transport von Proteinen zur Zellmembran wird auf zwei verschiedenen Wegen bewerkstelligt. Unreguliert verläuft der sogenannte konstitutive Weg, während durch verschiedene Stimulationen der regulierte Pfad initiiert wird. Auch AQP2 unterliegt diesen beiden Wegen für seinen Transport zur apikalen Zellmembran in der Niere. Vesikulär gespeichertes AQP2 wird unter basalen Bedingungen nur zu einem sehr geringen Teil in die apikale Zellmembran integriert (Katsura *et al.* 1996). Das konstitutive *Trafficking* von AQP2 spielt daher eine eher untergeordnete Rolle für die Wasserrückresorption im Sammelrohr.

Der regulierte Pfad des AQP2 *Traffickings* hingegen beeinflusst die Wasserdurchlässigkeit der Sammelrohrzellen. Diese Induktion beginnt mit Bindung von Vasopressin an den V2-Rezeptor der basolateralen Zellmembran. Der V2-Rezeptor ist ein G_S-Protein-gekoppelter Rezeptor. Nach Bindung des Vasopressin stimuliert das G-Protein die membrangebundene Adenylatzyklase in der Nähe des V2-Rezeptors und diese stellt aus ATP cAMP bereit. cAMP aktiviert direkt Proteinkinase A. Proteinkinase A phosphoryliert Ser256 am C-Terminus von AQP2 in den Speichervesikeln und initiiert den Transport dieser zur apikalen Zellmembran (Katsura *et al.* 1997). Dass AQP2 gespeichert in den intrazellulären Vesikeln vorliegt und nach Initiierung durch Vasopressin zur Zellmembran translokalisiert, ähnelt dem *Trafficking* des Glukosetransporters GLUT4. GLUT4 wird in Adipozyten, nach Bindung von Insulin an Insulinrezeptoren, von seinen intrazellulären Speichervesikeln zur Zellmembran transportiert (Watson und Pessin 2001). Auch die Endozytose von AQP2 ist ähnlich wie die des GLUT4 und verläuft Clathrin-vermittelt (Strange *et al.* 1988, Brown *et al.* 1988, Robinson *et al.* 1992).

An der Signalkaskade, welche Vasopressin auslöst, sind viele Zellkompartimente und Proteine beteiligt. Einige Proteine, welche an der Translokation der AQP2-Speichervesikel nach Aktivierung des V2-Rezeptors durch Vasopressin beteiligt sind, wurden bereits identifiziert: AKAPs (*A kinase anchoring proteins*), welche PKA an AQP2-tragende Membranen anbinden und anscheinend erst die Phosphorylierung des AQP2 ermöglichen (Klussmann und Rosenthal 2001). Auch Phosphodiesterase 4 wurde an AQP2-Vesikeln detektiert und scheint lokal cAMP-Level über die Beeinflussung der gebundenen PKA zu modulieren (Stefan *et al.* 2007). Teile des

Zytoskeletts wie G-Aktin und Tropomyosin-5 sind Bestandteile eines AQP2-bindenden Proteinkomplexes (Noda *et al.* 2004, 2005, Noda und Sasaki 2006). Dynactin und Dynein sind in Assoziation mit AQP2-Vesikeln detektiert worden und vermitteln entlang der Mikrotubuli den Transport der Vesikel (Marples *et al.* 1998). VAMP-2 (Vesicle-associated membrane protein 2) wurde an AQP2-Vesikel assoziiert detektiert (Nielsen *et al.* 1995) und Syntaxin-4 wird mit der Endozytose von AQP2 in Verbindung gebracht (Valenti *et al.* 1998) (Abb. 1.4). SNARE-Proteine (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*) kolokalisieren ebenfalls mit AQP2-Vesikeln (Nielsen *et al.* 1995, Franki *et al.* 1995), während Hsc70 und Hsp70 direkt an AQP2 binden und sein *Trafficking* regulieren (Lu *et al.* 2007).

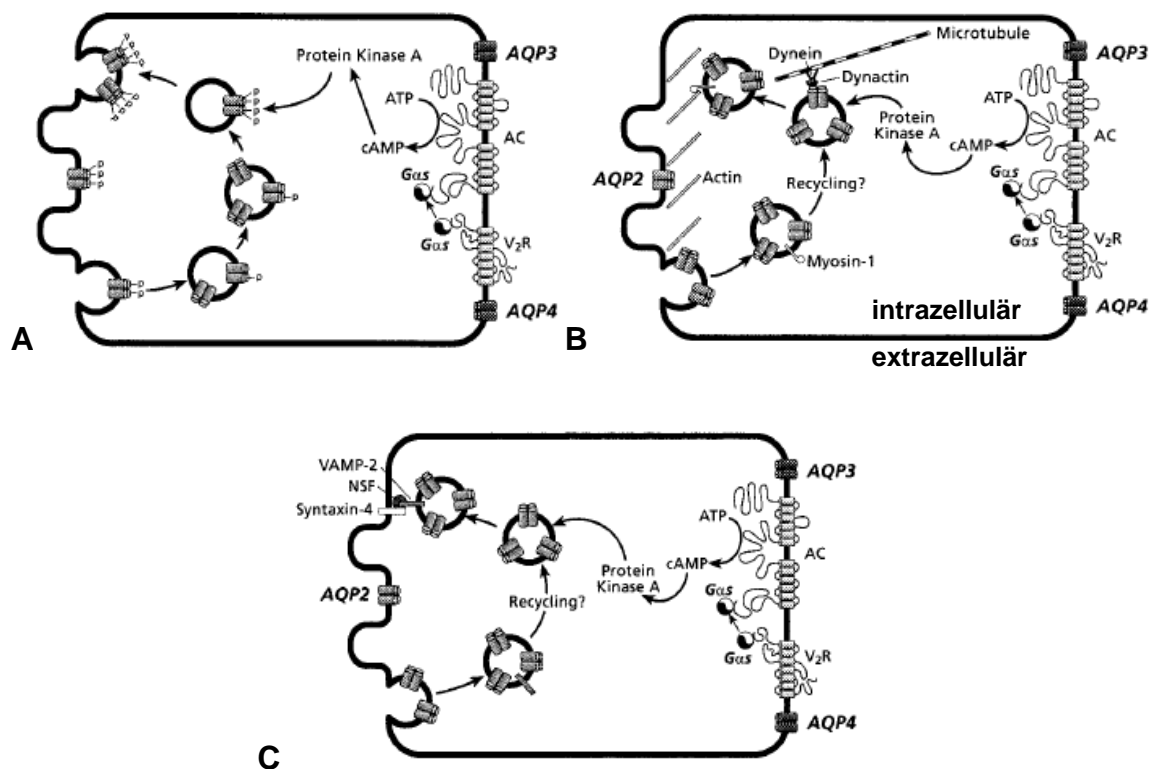


Abbildung 1.4: Signalkaskaden und einige Moleküle beteiligt an der Regulation des AQP2-Traffickings. A: Signalkaskade aus V2-Rezeptor, AC (Adenylatzyklase), PKA phosphoryliert AQP2 am Ser256. B: Teile des Zytoskeletts (Dynein, Dynactin, Myosin-1) sind Bestandteil des Trafficking-Apparates. C: der Mechanismus des Dockens und Verschmelzens der AQP2-Vesikel könnte durch Vesikel-Rezeptoren (VAMP-2, Syntaxin-4) vermittelt werden. (Modifiziert nach Nielsen *et al.* 2002)

All diese Proteine sind direkt oder indirekt beteiligt am Transport der AQP2-Speichervesikel zur apikalen Zellmembran nach Vasopressin-Einwirkung und Phosphorylierung des AQP2 am Ser256 (Katsura *et al.* 1997). Doch noch immer ist

ungeklärt, welchen Effekt die Phosphorylierung des AQP2 auf molekularer Ebene auslöst. Bisher bekannt ist nur ihr Einfluss auf die Exo- und Endozytose im AQP2-*Trafficking* und es ist klar, dass ohne die Phosphorylierung am Ser256 eine Translokation des AQP2 als Reaktion auf Vasopressin nicht stattfinden kann (Moeller *et al.* 2009).

1.5 Rolle der Phosphorylierung des AQP2 am Ser256

Durch Mutationsanalysen in verschiedenen Nierenzelllinien konnte die Relevanz der Phosphorylierung an Ser256 für das *Trafficking* von AQP2 nachgewiesen werden. Mutiert man Ser256 zu Alanin, kann dieses AQP2-S256A nicht durch PKA phosphoryliert werden. AQP2-S256A ändert seine Lokalisation nach Vasopressin-Einwirkung nicht (Katsura *et al.* 1997, van Balkom *et al.* 2002). Dahingegen liegt das zu AQP2-S256D mutierte Protein, welches die phosphorylierte Form vorspiegelt, konstitutiv in der apikalen Plasmamembran vor - unabhängig vom cAMP-Level (van Balkom *et al.* 2002). Phosphoproteomanalysen (eine Kombination aus Phosphopeptid-anreicherung und Massenspektrometrie nutzend) konnten zeigen, dass Ser256 nicht die einzig phosphorylierte Aminosäure ist, Ser261, Ser264 und Thr269 konnten ebenso phosphoryliert detektiert werden, die Bedeutung dieser Phosphorylierungsstellen ist jedoch noch unklar (Hoffert *et al.* 2006). Nicht nur die Phosphorylierung von AQP2 durch Kinasen ist von Bedeutung für seine zelluläre Lokalisation, auch Phosphatasen scheinen eine wichtige Rolle einzunehmen. Hemmt man die Serin-/Threonin-Phosphatasen 1 und 2A durch Okadainsäure, so wird selbst nach Inhibierung der PKA die Translokation von AQP2 und sein Einbau in die Plasmamembran gesteigert (Valenti *et al.* 2000). All diese Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen legen nahe, dass es einen direkten Einfluss eines Interaktionspartners basierend auf der Phosphorylierung geben könnte. Direkte Interaktionspartner des AQP2, welche zwischen der unphosphorylierten und der phosphorylierten Form des Proteins differenzieren und ausschließlich mit der phosphorylierten Form interagieren, wären ein wichtiges Bindeglied zwischen phosphoryliertem AQP2 und dessen physiologischen Effekten.

1.6 Vorarbeiten

Es wurden 2007 von Lu *et al.* mit Hsc70 und Hsp70 direkte Bindungspartner von AQP2 entdeckt. Mit solchen Erkenntnissen kann das *Trafficking* von AQP2 weiter aufgeklärt werden, doch die genaue Rolle der Phosphorylierung - was durch sie nachfolgend ausgelöst wird - bleibt weiter unklar. Einen Interaktionspartner des AQP2 zu identifizieren, welcher an das am Ser256 phosphorylierte AQP2 bindet, könnte diese Lücke schließen und einen Einblick in eine allgemeine Funktion von Phosphorylierungen geben. Um diesen Aspekt zu analysieren, wurde im Vorfeld dieser Arbeit ein *Yeast-2-Hybrid-Screening* durchgeführt, bei dem der C-Terminus S256D-mutierten AQP2s als Köder eingesetzt wurde (Abb. 1.5). Bei einem *Yeast-2-Hybrid-Screening* werden die zwei Hälften eines Transkriptionsfaktors auf DNA-Ebene mit verschiedenen Proteinen fusioniert. Eine Hälfte bildet ein Fusionsprotein mit dem so genannten *bait* (Köder), dem Protein, für welches ein Bindungspartner identifiziert werden soll. Die andere Hälfte bildet Fusionsproteine mit möglichen Bindungspartnern (*prey*, Opfer).

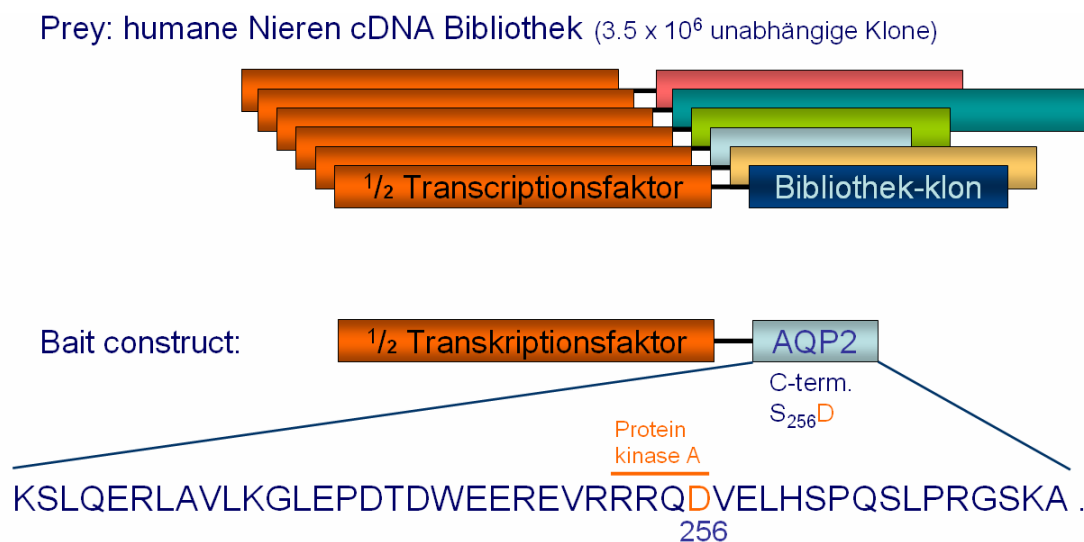


Abbildung 1.5: *Yeast-2-Hybrid-Screening: schematische Darstellung der Erstellung von bait und prey, um Bindungspartner für den C-Terminus von AQP2-S256D zu finden.*

In den Vorarbeiten bestand das *bait* aus einer Peptidsequenz des AQP2 C-Terminus, dessen S256 zu D256 verändert wurde. Damit repräsentierte es phosphoryliertes AQP2. Als *prey* wurde eine Bibliothek humaner Nieren-cDNA eingesetzt (Abb. 1.5).

Dabei wurde für ein Protein eine Bindung an den C-Terminus des AQP2-S256D nachgewiesen: Aha1.

1.6.1 Aha1

Aha1 erhielt seinen Namen abgeleitet von seiner bisher bekannten einzigen Funktion: *activator of hsp90 ATPase activity*. Zuerst als p38 bezeichnet, wurde schnell deutlich, dass dieses in Eukaryoten ubiquitär exprimierte Protein eine Funktion als Cochaperon besitzt - es stimuliert die ATPase Aktivität des Hitzeschockprotein 90 nach direkter Bindung an dieses (Mayer *et al.* 2002).

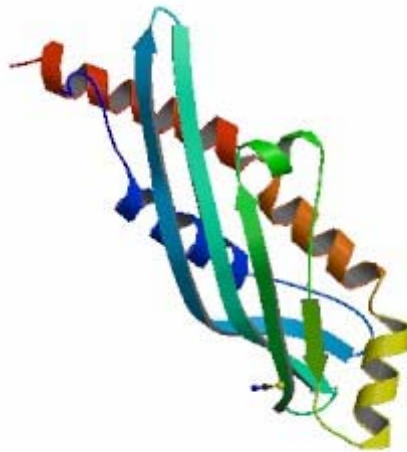


Abbildung 1.6: Kristallstruktur von Aha1 aus *Plasmodium falciparum* (Vernimont *et al.* 2010, Quelle: RCSB Protein Data Bank).

Aha1 liegt vorwiegend cytosolisch vor, doch es wird weiterhin vermutet, dass es auch am endoplasmatischen Retikulum assoziiert ist und mit diesem vorübergehend interagiert. Sevier und Machamer fanden 2001 Aha1 in dem Pellet microsomalier Membranen von HeLa-Zellen und spekulierten auf Präzipitation des Aha1. Durch die Einwirkung von Triton X-100 auf diese Aha1-haltigen Pellets konnten sie Aha1 allerdings aus diesen entfernen und schlussfolgerten, Teile des Aha1 lägen membrangebunden vor.

Durch die Arbeitsgruppe um Enno Klussmann, unserem Kooperationspartner am FMP Berlin, konnten AQP2-Vesikel aus MDCK-II-Zellen präzipitiert werden. In diesen wurde Aha1 detektiert (Abb. 1.7). Versuche in MDCK-II-Zellen zeigten, dass Aha1 nach Vasopressin-Einwirkung in der Zellmembran detektiert werden kann (Abb. 1.8).

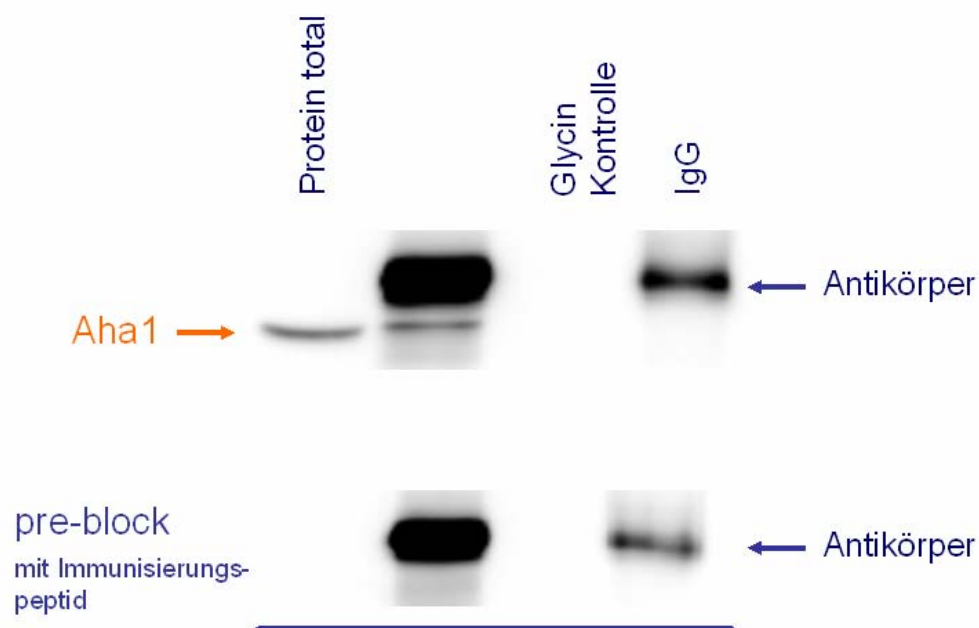


Abbildung 1.7: Western-blotting der Vesikel-Präzipitation aus MDCK-II-Zellysat. Eingesetzt wurden Protein-G-Sepharosebeads mit Antikörper gegen AQP2 bzw. Glycin beladen. Detektiert wurde nach Elektrolot mit einem Antikörper gegen Aha1.

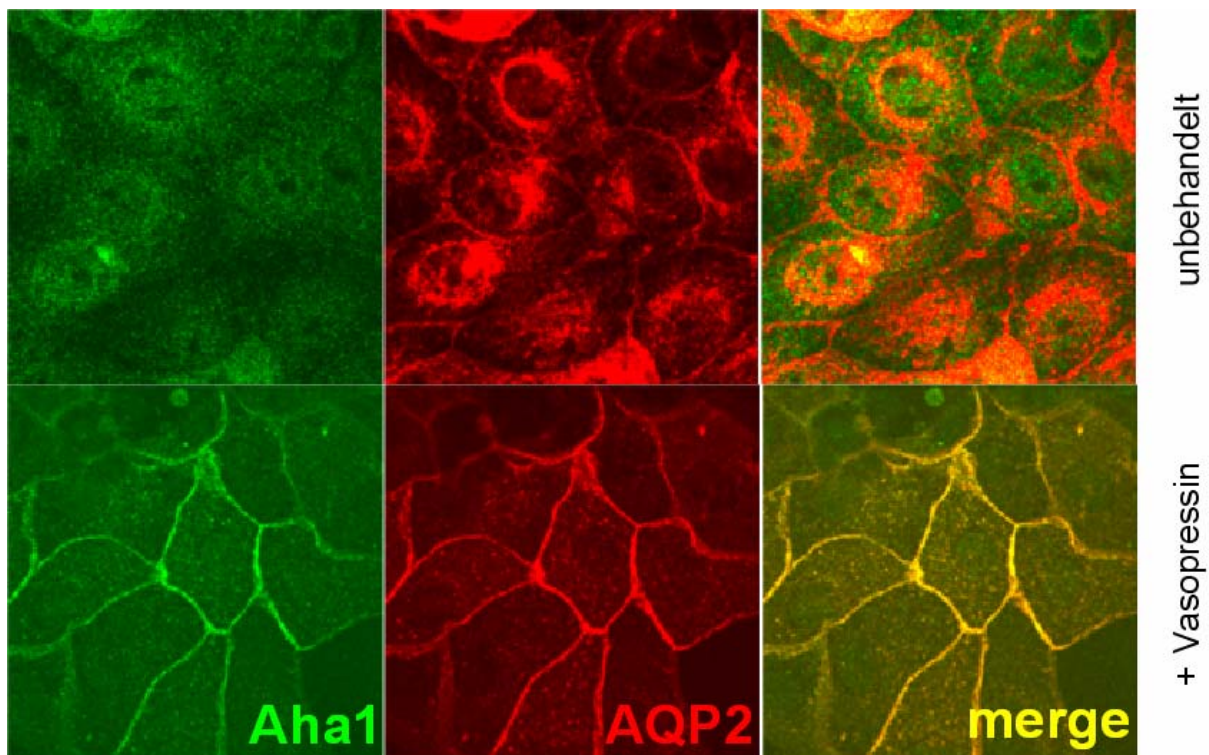


Abbildung 1.8: Konfokale Laserscanmikroskopie-Aufnahmen einer Immunofluoreszenz in MDCK-II-Zellen. Grün: Aha1; rot: AQP2, gelb: Kolokalisation von Aha1 und AQP2.

Die Expression in diversen Geweben (z.B. Gehirn, Herz, Skelettmuskulatur, Niere und in geringen Mengen in Leber und Plazenta), die eventuelle Assoziation mit dem ER und die Ergebnisse aus den Vorversuchen machten Aha1 zu einem interessanten Ziel weiterer Forschung. Aha1 kann die Lücke zwischen der Phosphorylierung des AQP2 und den bereits bekannten *Trafficking*-Parametern schließen und somit einen direkten Interaktionspartner des AQP2 darstellen.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Intrazelluläres *Trafficking* von AQP2 ist seit Jahren Gegenstand der Forschung - besonders im Hinblick auf die Funktion der Niere, sowie der generellen Bedeutung intrazellulären *Traffickings* für den zellulären Stoffwechsel. Generelle Informationen über beteiligte Proteine - sei es über direkte Protein-Protein-Bindung, sei es über Wechselwirkungen über weitere Proteine - könnten im gesamten Forschungsbereich des Protein-*Traffickings* Auswirkungen haben. Ein Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung von Methoden zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen im Arbeitskreis. Bindungs-Assays für Aha1 und AQP2 können direkt Aussagen zu einer möglichen Bindung von Aha1 an den C-Terminus des AQP2 liefern. Die Untersuchung der Auswirkungen des Aha1 auf das *Trafficking* von AQP2 ist ein weiterer Aspekt dieser Arbeit. Um das intrazelluläre *Trafficking* von AQP2 direkt untersuchen zu können, muss eine eukaryotische Zellkultur mit Nierenzelllinien im Arbeitskreis aufgebaut und genutzt werden.

Die Auswirkungen eines Proteins innerhalb des eukaryotischen zellulären Systems lassen sich mit RNAi-Technologie analysieren. Daher besteht ein Teil der Arbeit darin, die RNAi-Technologie im Arbeitskreis zu etablieren und speziell für Aha1 zu entwickeln und zu optimieren.

2 Material

2.1 Enzyme, Kits, Chemikalien und Verbrauchsmaterial

AGFA Healthcare, Mortsel, Belgien

Fixierer G354 und Entwickler G153

Alomone labs, Jerusalem, Israel

primär-Antikörper gegen AQP2 (*rabbit*)

Amersham Biosciences, GE Healthcare, München

Hyperfilme, ECL plus Western Blotting Detektion System, PVDF-Blottingmembran Hybond™-P, Thermo Sequenase™ Primer Cycle Sequencing Kit

Beckman Coulter, Krefeld

Ultrazentrifugenröhrchen Polycarbonat

Biochrome AG, Berlin

DMEM-Medium, Penicillin/Streptomycin, Fötales Kälberserum, Trypsin/EDTA-Lösung

Biontix, Martinsried

Metafectene Transfektionsreagenz

Bio-Rad, München

Bio-Rad Proteinassay Reagenz

Fermentas, St. Leon-Rot

dNTPs, Restriktionsendonukleasen mit Reaktions-Puffern, T4-Ligase, λ -DNA

Genaxxon BioScience, Ulm

Albumin Fraction V, Ampicillin-Natriumsalz, dNTPs, SDS, TEMED, 10x PCR-Puffer

Greiner bio one, Frickenhausen

Verbrauchsmaterial der Eukaryotenzellkultur

Invitrogen, Darmstadt

Sekundärantikörper, fluoreszenzmarkiert

Jackson Immuno Research Europe Ltd, Suffolk, UK

Goat Anti-Mouse IgG-Antikörper

Sekundärantikörper, fluoreszenzmarkiert (2.8)

Macherey-Nagel, Düren

Nucleotrap®, Nucleobond®PC500

Merck, Darmstadt

APS, Titrisol® Natriumhydroxid, Titrisol® Salzsäure

MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich

Ethidiumbromidtabletten

MWG-Biotech, Ebersberg

Oligonukleotide, IRD 800-gekoppelte Sequenzierprimer

National Diagnostics, Atlanta, USA

SequaGel[®] XR, SequaGel[®] *Complete Buffer Reagent*

New England Biolabs, Frankfurt am Main

Restriktionsendonukleasen, T4-Ligase

Peqlab Biotechnologie, Erlangen

peqGold Protein-Marker I, peqGold *prestained* Protein-Marker III

Promega, Mannheim

Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA *Purification Kit*

Qiagen, Hilden

Ni-NTA-Agarose, Faktor Xa, Faktor X_a-*removal resin*

Roche, Mannheim

Anti-GFP (Mischung zweier monoklonaler Antikörper aus der Maus), *complete EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets*

Roth, Karlsruhe

Rotiphorese[®]-Gel40, Roti[®]-Blue 5x Konzentrat, Rotiphorese[®] Blau R, alle weiteren hier nicht aufgeführten Chemikalien

Santacruz, CA, USA

primär-Antikörper, sekundär-Antikörper (2.8)

Sarstedt, Nürnberg

Labor-Verbrauchsmaterial (Plastikwaren)

Schleicher & Schuell, Dassel

Whatman Chromatographie Papier 3MM

Sigma-Aldrich Corporation, München

APS, Mineralöl, Polyethylenglycol 3350

Stratagene, Wadbronn

E. coli XL 1 Blue MRF⁻-Bakterienzellen

Südlaborbedarf, Gauting

Hi Yield[®] PCR *Clean-Up & Gel-Extraction Kit*

2.2 Geräte

Beckman Coulter, Krefeld

Ultrazentrifuge Optima™ XL-80 K; 50.2 Ti Rotor Festwinkel

Biacore international SA, Uppsala, Schweden

Das Biacore 3000

Binder, Tuttlingen

APT.line™ C150

Bio-Rad, München

Elektroblot Trans-Blot® SD *semidry transfer cell*

Cawo Photochemisches Werk, Schrobenhausen

Entwicklungsmaschine Cawomat 2000 IR; ABS-Kassette

Clemens, Waldbüttelbrunn

PCR-Cycler Dualblock Peqlab Primus HT2 und MWG Primus 25 mit HT Manager Software

Eppendorf, Hamburg

BioPhotometer, Mikrozentrifuge 5415R

Greiner, Frickenhausen

Glasgeräte

Heraeus Instruments, Osterode

Laborzentrifuge Multifuge 1S-R mit Rotoren 75002006/75002000, Biofuge pico, herasafe 12 Sterilbank

Herolab, Wiesloch

UV-Transilluminator UVT-20 S/M

Infors, München

Inkubator Minitron mit integriertem Schüttler

Intavis Bioanalytical Instruments AG, Köln

AutoSpot-Roboter ASS 222

Leica, Wetzlar

konfokales Laserscan-Mikroskop TCS SP

LI-COR Biosciences, Bad Homburg

Sequenzierer LI-COR DNA Sequencer Model 4200, BaselmagIR V.4.2. Software

Mettler-Toledo, Giessen

Pipetten RAININ Classic™

New Brunswick Scientific, Wesseling-Berzdorf

Tiefkühlschrank Innova U535

Peqlab, Erlangen

SDS-PAGE-Kammer PerfectBlue® vertikales Doppelgelsystem Twin S

Raytest, Straubenhardt

Gel-Dokumentations-System Raytest IDA

Roche, Mannheim

Lumi-Imager F1

Savant Instruments, Farmingdale, USA

Vakuumentrifuge DNA Speedvac® DNA110

SCHOTT Instruments, Mainz

Digital-Labor-pH-Meter Lab 850

SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation, Barsbüttel

Reinstwasseranlage

Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Hochdruck-Homogenisator French Press *cell disrupter* FA-078 mit French Press Zelle FA-032, *Cryo 1 °C Freezing Container* (Nalgene)

Zeiss, Jena

konfokales Laserscan-Mikroskop LSM 510

2.3 Verwendete Plasmide

Plasmide für *Escherichia coli*

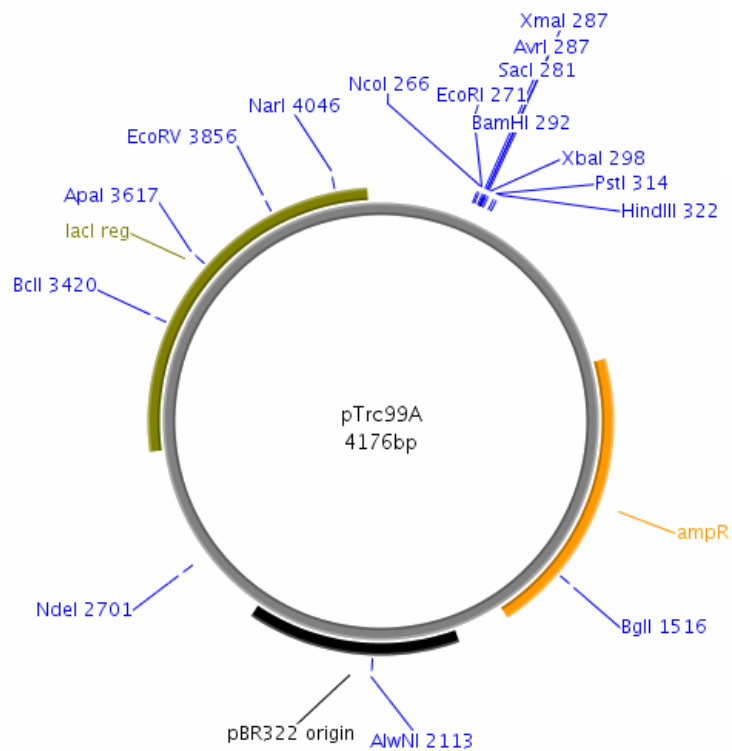


Abbildung 2.1: pTrc99A

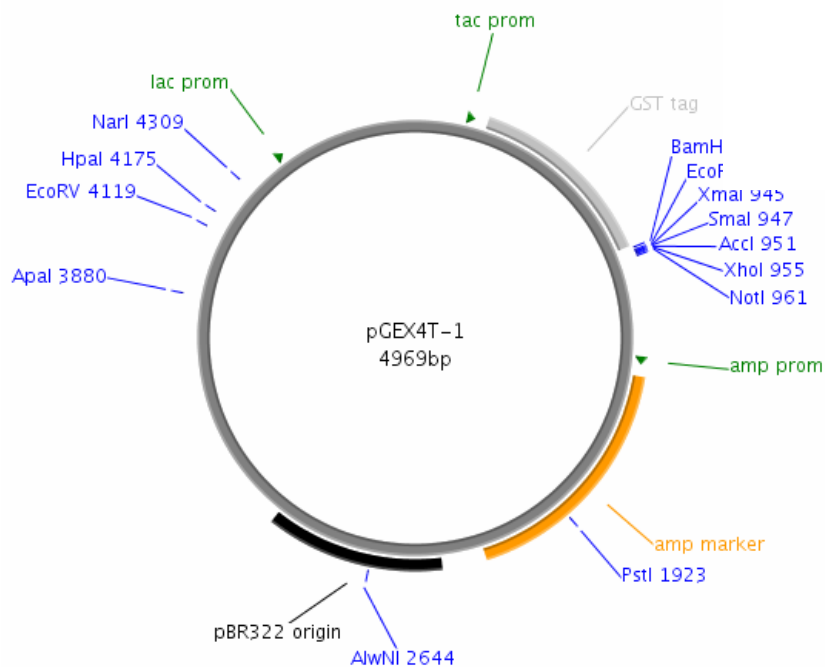


Abbildung 2.2: pGEX4T-1

Plasmide für Säugerzelllinien

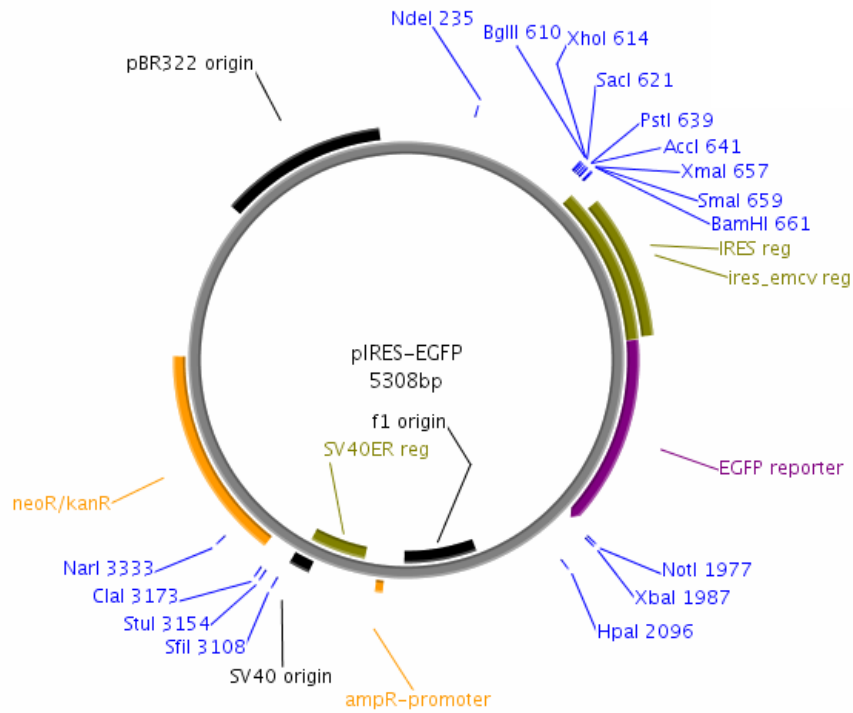


Abbildung 2.3: *pIRES-EGFP*

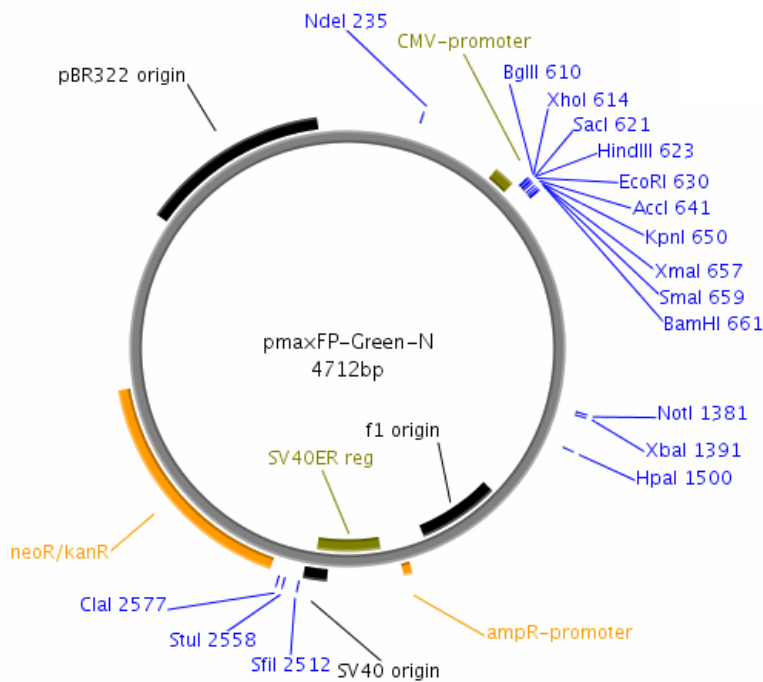


Abbildung 2.4: *pmaxFP-Green-N*

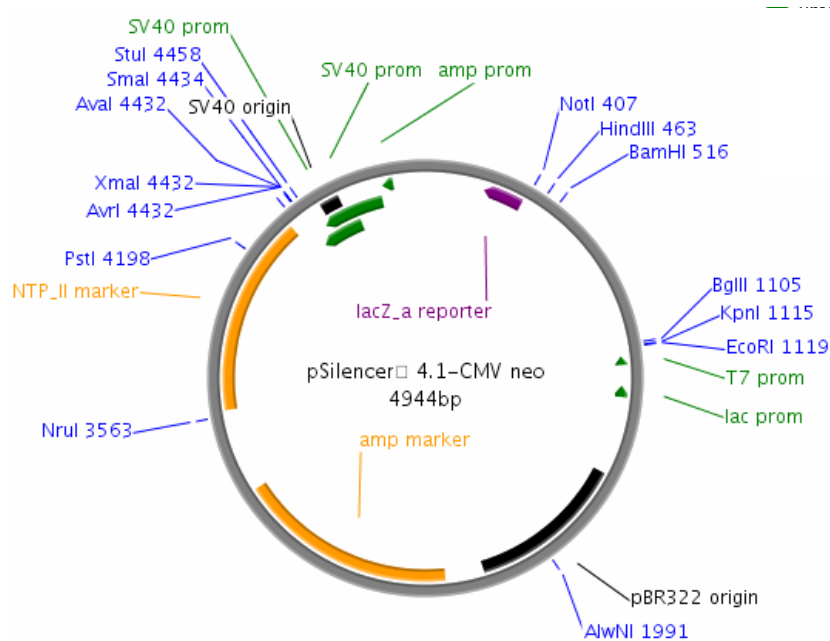


Abbildung 2.5: *pSilencer™* 4.1-CMVneo

2.4 Oligonukleotide (Sequenzierprimer)

Die Sequenzierprimer wurden am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRD 800 markiert. Ihre Sequenz entspricht der Sequenz, welche der Hersteller des Vektors empfiehlt.

psilencer_sense 5' - AGGCGATTAAGTTGGGTA - 3'
 psilencer_antisense 5' - CGGTAGGCGTGTACGGTG - 3'

2.5 Verwendete *Escherichia coli* - Stämme

DH5α F⁻ ϕ 80*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17*(rk⁻, mk⁺) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1* λ- Hanahan, 1983
 XL1-Blue MRF['] *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F['] proAB *lacIq*ΔM15 Tn10 (Tet_r)] von Stratagene
 BL21(DE3)pRep4 F⁻ *ompT hsdSB* (r_B⁻m_B⁻) *gal dcm* (DE3) pRep4 (Neo)

2.6 Verwendete Zelllinien

HEK293	HEK293, Niere / Mensch, erhalten vom Institut für Physiologie, CAU Kiel
HEK293-AQP2wt	HEK293, Niere / Mensch, exprimiert AQPwt, erhalten vom FMP Berlin
HEK293-AQP2wtHA	HEK293, Niere / Mensch, exprimiert AQPwt mit einem HA-tag an einem extrazellulären <i>loop</i> des AQP2, erhalten vom FMP Berlin
MDCK	CCL-34 MDCK (NBL-2) Niere / Hund, LOT: 58078518 (ATCC®)

2.7 Verwendete siRNA-Oligonukleotide

Kontroll-siRNA (MWG)

sense	5' [Cy5] [AGGUAGUGUAAUCGCCUUG] _{RNA}	[TT] _{DNA}
antisense	5' [Cy5] [CAAGGCGAUUACACUACCU] _{RNA}	[TT] _{DNA}

siRNA aha1 (Dharmacon)

sense	5' [AUUGGUCCACGGAUAAGCU] _{RNA}	[TT] _{DNA}
antisense	5' [AGCUUAUCCGUGGACCAAU] _{RNA}	[TT] _{DNA}

siRNA aha2 (Dharmacon)

sense	5' [GUGAGUAAGCUUGAUGGAG] _{RNA}	[TT] _{DNA}
antisense	5' [CUCCAUCAAGCUUACUCAC] _{RNA}	[TT] _{DNA}

In der Arbeit wurden siRNA aha1 und siRNA aha2 als Mischung eingesetzt und werden im Folgenden als si1&2 bezeichnet.

siRNA anti-Aha1 (MWG)

sense	5' [Cy3] [AAAUCUCGCGGCCUUAUGA] _{RNA}	[TT] _{DNA}
antisense	5' [UCAUUAAGGCCACGAGAUUU] _{RNA}	[TT] _{DNA}

Diese siRNA-Oligonukleotide wurden nach Holmes *et al.* 2008 erstellt und werden daher in dieser Arbeit als siRNA-holmes bezeichnet.

Oligo 1 (invitrogen)

sense 5' [CCACUUGUAAGAUCACUCUUAAGGA]_{RNA} [TT]_{DNA}
 antisense 5' [UCCUUAAGAGUGAUCUUACAAGUGG]_{RNA} [TT]_{DNA}

Oligo 2 (invitrogen)

sense 5' [ACUGGACGGAGAGAGAUGCUUCAAA]_{RNA} [TT]_{DNA}
 antisense 5' [UUUGAAGCAUCUCUCUCCGUCCAGU]_{RNA} [TT]_{DNA}

Oligo 3 (invitrogen)

sense 5' [UCGCAAAGGGAAACUUAUCUUCUUU]_{RNA} [TT]_{DNA}
 antisense 5' [AAAGAAGAUAGUUUCCCUUUGC GA]_{RNA} [TT]_{DNA}

2.8 Verwendete Antikörper

Primärantikörper:

mα-GFP	Mischung zweier monoklonaler Antikörper (Maus) gegen GFP (0,4 µg/µl) (Roche, Mannheim)
ra-Aha1-N	polyklonaler Antikörper (Hase) gerichtet gegen AS-Sequenz AKWGEGDPRWIVEERADAT am N-Terminus von Aha1 (0,4 µg/µl)
ra-Aha1-C	polyklonaler Antikörper (Hase) gerichtet gegen AS-Sequenz LEADRGGKFHMVDGNVSGEF am C-Terminus von Aha1 (0,4 µg/µl)
gα-AQP2 (C-17)	polyklonaler Antikörper (Ziege) gegen einen Teil des C-Terminus humanen AQP2s (0,2 µg/µl) (Santacruz, CA, USA)
ra-AQP2 (H-40)	polyklonaler Antikörper (Hase) gegen AS 232-271 des humanen AQP2 (0,2 µg/µl) (Santacruz, CA, USA)
ra-AQP2 (A002)	polyklonaler Antikörper (Hase) gegen AS 254-271 des murinen (Ratte) AQP2 (Alomone labs, Jerusalem, ISR)
mα-GAPDH	polyklonaler Antikörper (Maus) (Calbiochem, Merck, Darmstadt)

2 Material

r α -HA (HA.11) polyklonaler Antikörper (Hase) gegen die AS-Sequenz CYPYDVPDYASL (Convance, Princeton, USA)

Sekundärantikörper

g α -rabbit polyklonaler Antikörper POD-konjugiert (0,4 μ g/ μ l)
(Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK)

g α -mouse polyklonaler Antikörper POD-konjugiert (0,4 μ g/ μ l)
(Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK)

d α -goat polyklonaler Antikörper POD-konjugiert (Esel) (4 μ g/ μ l)
(Santacruz, CA, USA)

Fluoreszenz-markierte Sekundärantikörper

d α -rabbit-Cy2 polyklonaler Antikörper, Cyanin2 konjugiert (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK)

d α -rabbit-Cy3 polyklonaler Antikörper, Cyanin3 konjugiert (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK)

d α -goat-Cy5 polyklonaler Antikörper, Cyanin5 konjugiert (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK)

c α -rabbit-Alexa488 polyklonaler Antikörper (Ziege), Alexa Fluor® 488 konjugiert (2 μ g/ μ l) (Invitrogen, Darmstadt)

d α -goat-Alexa568 polyklonaler Antikörper (Esel), Alexa Fluor® 568 konjugiert (2 μ g/ μ l) (Invitrogen, Darmstadt)

2.9 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden vor der Verwendung sterilfiltriert (0,2 µm Porenweite) oder autoklaviert (20 min, 121°C, 1 bar). Für Verdünnungen wurde autoklaviertes Wasser verwendet, welches über Umkehrosmose, Filtration und anschließendes Autoklavieren gereinigt wurde.

2.9.1 Molekularbiologische Methoden

Agarose-Gelelektrophorese von DNA

50x TAE-Puffer

2 M	Tris/Acetat pH 8,0
0,05 M	EDTA

10x Ladepuffer orange

0,4 %	Orange G
30 %	Glycerol
0,1 M	EDTA

Ethidiumbromidlösung

10 mg	Ethidiumbromid
1,0 ml	Aqua bidest.

Bakterien-Nährmedien

LB-Medium

10 g/l	Trypton
10 g/l	NaCl
5 g/l	Hefeextrakt

Antibiotika in LB-Medium und LB-Agar

100 µg/ml	Ampicillin
50 µg/ml	Kanamycin

LB-Agar

15 g/l	Bacto™ Agar in LB-Medium
--------	-----------------------------

1,5x LM-Medium

15 g/l	Trypton
15 g/l	NaCl
7,5 g/l	Hefeextrakt

TSS-Lösung

15 ml	1,5x LB-Medium
4 ml	PEG (3350) 50%
0,4 ml	1 M MgCl ₂
1 ml	DMSO

DNA-Sequenzierung

10x TBE-Puffer

0,89 M	Tris
0,89 M	Borsäure
0,02 M	Na ₂ -EDTA
	pH 8,3

2.9.2 proteinbiochemische Methoden

SDS-PAGE

4x Trenngelpuffer

0,4 %	SDS
1,5 M	Tris·HCl, pH 8,8

4x Sammelgelpuffer

0,4 %	SDS
0,5 M	Tris·HCl, pH 6,8

1x Kathodenpuffer

192 mM	Glycin
0,1 %	SDS
25 mM	Tris·HCl, pH 8,3

4x SDS-Probenpuffer (reduzierend)

8 %	SDS
1 M	Tris·HCl, pH 6,8
0,4 M	DTT
40 %	Glycerol
0,02 %	Bromphenolblau

clear native-PAGE

6x native-Probenpuffer

60 %	Glycerol
0,1 %	Bromphenolblau

1x Kathodenpuffer

192 mM	Glycin
25 mM	Tris·HCl, pH 8,8

Ponceau S-Färbelösung

1 %	Poncheau S
3 %	Eisessig

Gel-Färbelösung

45 %	Methanol
9 %	Eisessig
45,8 %	Wasser
0,2 %	Blau R

Gel-Entfärbelösung

10 % Eisessig
 30 % Methanol
 60 % Wasser

Western-blotting**5x Transferpuffer**

192 mM Glycin
 25 mM Tris·HCl, pH 8,3
 1 % SDS

1x Transferpuffer

20 % 5x Transferpuffer
 20 % Methanol
 60 % Wasser

10x TBS

1,5 M NaCl
 0,1 M Tris·HCl, pH 7,4

1x TBST

0,5 % Tween20
 in 1x TBS

MTBST

3 % Milchpulver
 in 1x TBST

Ablösepuffer

62,5 mM Tris·HCl pH 6,7
 100 mM 2-Mercapto-
 ethanol
 2 % SDS

ELISA**PBS-CM**

0,1 mM CaCl₂
 1,0 mM MgCl₂
 in 1x PBS

Blockier-, Inkubationspuffer

1 % BSA
 in PBS-CM

Koimmunpräzipitation**Zelilysepuffer**

20 mM K₂HPO₄
 150 mM NaCl
 5 mM EDTA
 5 mM EGTA
 pH 7,4 (HCl)
 frisch: Proteaseinhibitor
 und 1 mM PMSF

2 Material

für nicht-nativen Aufschluss zusätzlich:

0,5 %	Triton-X-100 oder
0,5 %	Dodecyl- β -D-Maltosid

Immunofluoreszenz

Forskolinlösung

10 mM	Forskolin
	in Ethanol

Fixierpuffer

3 %	Paraformaldehyd
	in 1x PBS

Permeabilisierungspuffer

0,1 %	Triton-X-100
	in 1x PBS

Blockierpuffer

3 %	BSA (Fraktion V)
	in 1x PBS

Mountingmedium

25 %	Glycerol
10 %	Mowiol 4-88
0,1 M	TrisHCl, pH 8,5

Waschpuffer (1xPBS)

137 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
10 mM	Na ₂ HPO ₄
2 mM	NaH ₂ PO ₄
	pH 7,4 (HCl)

Affinitätschromatographie

Zellysepuffer E. coli

20 mM	K ₂ HPO ₄
150 mM	NaCl
20 mM	Imidazol
2 mM	2-Mercaptoethanol
2 mM	Benzamidin
	pH 8,0
frisch	1 mM PMSF zugeben

Wasch- und Elutionspuffer His-tag

100-400 mM	Imidazol
	in Zellysepuffer

Waschpuffer GST-tag

1x	PBS
0,1 %	Triton X-100

Elutionspuffer GST-tag

50 mM	Tris·HCl pH 8,0
10 mM	red. Glutathion
	frisch zugesetzt

Proteinase-Behandlung*Faktor Xa Reaktionspuffer*

20 mM	Tris·HCl
50 mM	NaCl
1 mM	CaCl ₂
	pH 6,5 (HCl)

Zellkultur*Kulturmedium*

DMEM mit	
5-10 %	FCS
1 %	P/S-Lösung

Kryomedium

80 %	DMEM
10 %	DMSO
10 %	FCS

Transfektionsmedium

DMEM mit	
1 %	P/S-Lösung

Selektionsmedium

400 µg/ml	G418
in Kulturmedium	

Extraktionspuffer (nativ)

440 mM	Saccharose
75 mM	K ₂ HPO ₄
2 mM	EDTA
0,1 mM	PMSF
	pH 7,2

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Isolierung und Reinigung von DNA

Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Einzelklone oder eine bereits existierende Dauerkultur wurden in LB-Medium mit Selektionsantibiotikum überführt und über Nacht (10-16 h) bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Kultur wurde bei 13.000 x g pelletiert und das erhaltene Zellpellet für die Plasmidpräparation verwendet. Für 5 ml Kulturen wurde das *Wizard-Plus-Purification-Kit*[®] entsprechend der Herstellervorschrift verwendet. Abwandlungen von der Herstellervorschrift waren das Verzicht auf die Zugabe alkalischer Protease und die Eluierung der isolierten Plasmid-DNA mit 50 µl Wasser, statt der angegebenen 100 µl. Für 50-100 ml Kulturen wurde das *NucleoBond*[®] Midi-Präparationskit verwendet.

Extraktion von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden mit einem Skalpell aus dem Agarosegel geschnitten und mit dem *Hi Yield*[®] *Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit* entsprechend der Herstellerangaben aus Agarosegelen extrahiert. Zur Elution wurde zwischen 15 und 30 µl Wasser eingesetzt. Wenn eine Aufkonzentrierung von Nöten war, wurde diese mit der *SpeedVac*[®] durchgeführt.

PCR-Produkt-Aufreinigung

Mit dem *Hi Yield*[®] *Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit* konnten auch die PCR-Produkte aufgereinigt werden. Die Durchführung war entsprechend der Herstellerangaben.

3.1.2 Agarose-Flachbett-Gelelektrophorese

Die Agarosekonzentration wurde abhängig von den zu erwartenden Fragmentgrößen gewählt:

≥ 800 bp	1 % Agarose
500 bis 1000 bp	2 % Agarose
< 500 bp	3 % Agarose

Die Agarose wurde in TAE-Puffer resuspendiert und in der Mikrowelle geschmolzen. Vor dem Ausgießen wurde 1 µl 1% Ethidiumbromidlösung pro 50 ml Agaroseansatz zugegeben (0,2 µg/ml). Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer verwendet. Die Proben wurden mit 1/10 Volumen 10x Ladepuffer versetzt und bei 100 V elektrophoretisch getrennt. *Pst* I-verdaute λ-DNA diente als Größenmarker. Detektiert wurde unter UV-Licht mit einer Anregungswellenlänge von 366 nm.

3.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren in Lösung wurde photometrisch bei $\lambda = 260$ nm bestimmt und wie folgt berechnet:

$$c [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = A_{260 \text{ nm}} \cdot f \cdot \text{Verdünnung}$$

$$f = 0,02 \quad \text{bei Oligonukleotiden, Einzelstrang-DNA}$$

$$f = 0,04 \quad \text{bei Plasmiden, Doppelstrang-DNA}$$

Zusätzlich wurde durch Absorptionsmessung bei 230 nm auf Verunreinigung durch Kohlenhydrate und bei 280 nm auf Verunreinigung durch Proteine getestet. Das Verhältnis von $A_{260 \text{ nm}}/A_{230 \text{ nm}}$ für reine DNA liegt über 2. Das Verhältnis von $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ für reine DNA liegt über 1,8.

3.1.4 Restriktionsverdau von DNA

Der Verdau mit Endonukleasen wurde in 10 µl-Ansätzen durchgeführt. 0,5-2 µg DNA wurden mit 1 U Enzym/ µg DNA mindestens eine Stunde inkubiert. Die Wahl von Puffer und Inkubationsbedingungen erfolgte nach Herstellerangaben. Bei Temperaturabweichungen und inkompatiblen Pufferbedingungen wurde in mehreren Schritten gearbeitet.

3.1.5 Ligation

Zur Ligation betrug das molare Verhältnis zwischen Vektor und *insert* 1:4. Es wurde in einem Ligationsansatz von 10 µl gearbeitet. 50-100 ng Vektor pro Ligation wurden mit 1 µl T4-Ligase im entsprechenden Puffer über Nacht bei 16°C inkubiert.

3.1.6 Transformation kompetenter *Escherichia coli* Zellen

Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen: PEG-DMSO-Methode (nach Chung *et al.* 1989)

Eine einzelne *E. coli*-Kolonie wurde in 6 ml LB-Medium inklusive des entsprechenden Antibiotikums überführt und bei 37°C und 180 U/min über Nacht inkubiert. 1 ml der über-Nacht-Kultur wurde in 100 ml LB-Medium gegeben und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,4 unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Diese Bakteriensuspension wurde in zwei Falcon Röhrchen für mindestens 10 min auf Eis gehalten. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (2000 x g, 4°C, 10 min). Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in jeweils 5 ml eiskalter TSS-Lösung aufgenommen, vorsichtig durch leichtes Schütteln resuspendiert und vereinigt. Erneut wurde die Suspension zentrifugiert (2 000 x g, 4°C, 10 min), der Überstand verworfen, das Zellpellet in 10 ml eiskalter TSS-Lösung resuspendiert und für 10 min auf Eis gehalten. Die kompetenten Zellen wurden zu je 100 µl aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Standardtransformation von *E. coli* Zellen: PEG-DMSO-Methode

Der Ligationsansatz konnte direkt zu gerade auftauenden kompetenten Zellen gegeben werden. Die Zellen wurden 30 min auf Eis gehalten. Anschließend für 1 min bei 42°C inkubiert und nochmals für 10 min auf Eis gehalten. Es wurden 600 µl LB-Medium hinzugegeben und der Ansatz für 60 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen gesammelt (13 000 x g, 15 s), 600 µl des Überstandes verworfen und der Rückstand in den verbliebenen 100 µl resuspendiert. Diese Mischung wurde dann auf LB-Agarplatten mit dem selektiven Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Schnelltransformation von *E. coli* Zellen

50 ng Plasmid wurden zu 100 µl kompetenten *E. coli* Zellen gegeben und diese Mischung 15 min auf Eis gehalten. Der Transformationsansatz wurde auf Agarplatten mit Selektionsantibiotikum ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

3.1.7 Klonierungsarbeiten

Der folgende Teil der verwendeten Plasmide lag bereits im Arbeitskreis vor: pTrc99A-10xHis-hAha1, pGEX4T-1-hAha1, pIRESneo-EGFP-mAQP2wt, pIRESneo-EGFP-mAQP2-S256A und pIRESneo-EGFP-mAQP2-S256D. Sie wurden im Arbeitskreis beziehungsweise beim Kooperationspartner FMP Berlin erzeugt. pmaxFP-Green-N wurde von der Firma Amaxa bezogen.

Die Konstrukte für dauerhaft in Säugerzellen exprimierte shRNA (*short hairpin RNA*) wurden im Rahmen dieser Arbeit generiert. Mit pSilencer™4.1-CMVneo lässt sich in Säugerzelllinien shRNA exprimieren, welche innerhalb der Zelle zu siRNA prozessiert wird. Da die *inserts*, welche für shRNA kodieren, kurz sind (65 Basen), wurden sie als Einzelstränge im Arbeitskreis synthetisiert. Abbildung 3.1 zeigt die DNA-Sequenz der synthetisierten Einzelstränge. Die Sequenzen bestehen aus den terminalen Schnittstellen für *BamH I* und *HinD III*, gefolgt von den 25 Basen langen siRNA-kodierenden Abschnitten. In der Mitte der synthetisierten Oligonukleotide liegt die Sequenz, welche nach Transkription der DNA einen *loop* bildet.

Oligo 2

```
5' -GATCCACTGGACGGAGAGAGATGCTTCAAATTCAAGAGATTTGAAGCATCTCTCTCCGTCCAGTA-3'
3' -GTGACCTGCCTCTCTCTACGAAGTTTAAGTTCTCTAAACTTCGTAGAGAGAGGCAGGTCATTCGA-5'
```

Oligo 3

```
5' -GATCCTCGCAAAGGGAAACTTATCTTCTTTTTCAAGAGAAAAGAAGATAAGTTTCCCTTTGCGAA-3'
3' -GAGCGTTTCCCTTTGAATAGAAGAAAAGTTCTCTTTTCTTCTATTCAAAGGGAAACGCTTTCGA-5'
```

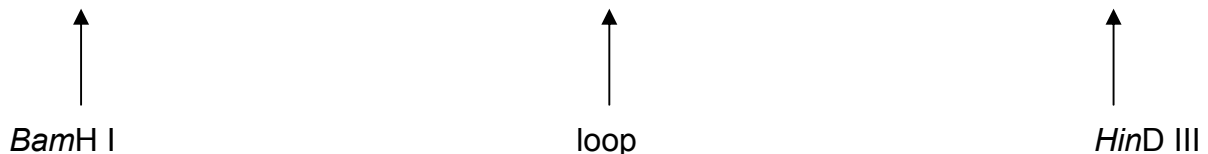


Abbildung 3.1: DNA-Sequenzen der *inserts* in pSilencer™4.1-CMVneo. Fett hinterlegt sind die Sequenzabschnitte, welche für siRNA-Oligonukleotide kodieren.

Diese komplementären Einzelstränge wurden zu Doppelsträngen angelagert. Dafür wurden je 2 µg Einzelstrang-DNA mit *DNA-annealing-solution* (im pSilencer4.1-CMVneo-kit enthalten) auf 50 µl aufgefüllt und 3 min bei 90°C inkubiert. Der Ansatz wurde abgekühlt, bei 60 °C (der annealing-Temperatur der Einzelstränge) ein Plateau von 5 min gehalten und weiter bis auf 30°C herunter gekühlt.

Dieser Schritt wurde auf einem 3 % Agarosegel überprüft und anschließend die Oligonukleotide in mit *BamH I* und *HinD III* geschnittenem linearem pSilencer™4.1-CMVneo ligiert. Nach Transformation (3.1.6) von *E. coli* (DH5α) wurden Kolonien gepickt, die isolierte Plasmid-DNA (3.1.1) sequenziert (3.1.9) und zur stabilen Transfektion von Säugetierzellen (3.3.4) verwendet.

3.1.8 DNA - Sequenzierung

Die DNA wurde nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode unter Verwendung von ddNTPs sequenziert. Die Probenvorbereitung für die Sequenzierung erfolgt mit Hilfe des Thermo Sequenase™ Primer Cycle Sequencing Kits.

Es wurde ein Mastermix hergestellt mit 1 - 2 pmol DNA, 1 µl Fluoreszenz-markierter Primer und mit Wasser zu einem Endvolumen von 13 µl aufgefüllt. In PCR-Gefäßen wurden je 1,5 µl der ddNTPs/dNTPs-Mischung vorgelegt und mit je 3 µl des Mastermixes versetzt, diese Reaktionsansätze wurden mit einem Tropfen *Mineral Oil* überschichtet und in den Thermocycler gesetzt. Für die Amplifikation wurde das folgende Cycler-Programm verwendet.

Tabelle 3.1: *PCR-Programm für die DNA-Sequenzierung nach Didesoxy-Kettenabbruch-Methode.*

	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95 °C	120 s
20 Zyklen:		
Denaturierung	95 °C	30 s
Primer-Anlagerung	55 °C	30 s
Extension	72 °C	60 s
Kühlung bis zur weiteren Verarbeitung	4 °C	∞

Die PCR-Ansätze zur DNA-Sequenzierung wurden mit 5 µl Formamid-Puffer versetzt und von dieser Mischung jeweils 1 µl auf ein 6 % Polyacrylamidgel geladen. Die Elektrophorese erfolgte mittels des Licor DNA Sequencers 4200 bei 1500 V, als Laufpuffer diente TBE-Puffer. Die Auswertung erfolgte am nächsten Tag mit der BaselmagIR V 4.2. Software.

Tabelle 3.2: *Zusammensetzung des 6 % Polyacrylamidgels für die Auftrennung der mit Didesoxy-Kettenabbruch-Methode erzeugten DNA-Abschnitte.*

30 ml	SequaGel XR 7,5 %
7,5 ml	SequaGel Complete buffer reagent
400 µl	DMSO
300 µl	10 % APS

3.2 *E. coli* Zellkultur

3.2.1 *E. coli* - Dauerkulturen

Zur Lagerung von Plasmiden wurden Dauerkulturen angelegt. 500 µl einer Flüssigkultur wurden mit 1 ml 80 % Glycerol versetzt und bei -80°C gelagert.

3.2.2 Expression von Proteinen in *E. coli*

Aus Einzelklonen angeimpfte frisch transformierte *E. coli* BL-21 wurden in 5 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum gegeben und bei 37 °C inkubiert. Nach 10-12 h wurde sie mit Medium auf 50 ml erweitert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Um in größeren Mengen Protein zu erhalten, wurde eine 1-2 l Kultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,9 bei 37 °C inkubiert. Bei dieser OD₆₀₀ wurde die Proteinexpression, wenn nötig, induziert (für pTrc99A mit 100 µM IPTG). Anschließend wurde die Kultur bei 30 °C weiter inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 2 erreicht wurde. Die Zellen wurden pelletiert (10.000 x g, 4 °C, 20 min) und anschließend lysiert.

3.2.3 Aufschluss von *E. coli*-Zellen

Zu Beginn dieser Arbeit wurden *E. coli* mittels *acid washed glassbeads* mechanisch zerkleinert. Da die Effizienz dieser Methode sehr gering ist, wurden sie im Weiteren stets mit Hilfe einer French-Press aufgeschlossen. Bei ca. 1380 bar wurden resuspendierte *E. coli*-Zellen in je 2 Durchgängen lysiert. Es wurde ausschließlich bei 4 °C gearbeitet.

3.3 Zellkultur von eukaryotischen Zellen

MDCK-II-Zellen (NBL-2, ATCC-Nummer: CCL-34™)

Die MDCK-II-Zelllinie wurde aus Epithelialgewebe der Niere eines weiblichen Cocker Spaniel 1958 durch S.H. Madin and N.B. Darby abgeleitet. Sie besitzt noch immer eine ähnliche Morphologie wie epitheliale Zellen und wächst stark adhärent. Ihre Verdopplungszeit beträgt 14-21 h (Madin und Darby 1958).

HEK-293

Die HEK-293 Zelllinie leitet sich aus menschlichen Nierenzellen ab. 1973 transformierte F. Graham humane embryonale Nierenzellen mit durch Scherkraft fragmentierter DNA von Adenovirus Typ-5. Eine der wenigen dabei erhaltenen transformierten Zellklone führte zur Etablierung der 293-Zelllinie. Es handelt sich um eine semi-adhärente Zelllinie. Ihre Verdopplungszeit beträgt 24-36 h (Graham *et al.* 1977)

Die Kultivierung beider Zelllinien erfolge bei 37 °C, 5 % CO₂ und Feuchtigkeits-sättigung. Sie wurden in Zellkulturflaschen mit Beschichtung in DMEM mit 5-10 % FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin gehalten. Alle verwendeten Lösungen wurden vor Verwendung sterilfiltriert oder autoklaviert und auf 37 °C vorerwärmt.

3.3.1 Passagieren von Zellen

Beide Zelllinien wachsen adhärent. Bei optischer Konfluenz wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. HEK-293-Zellen ließen sich bei Zugabe frischen Mediums mit diesem resuspendieren. MDCK-II-Zellen mussten zur Ablösung

15 min mit Trypsin-EDTA-Lösung (0,1 ml/cm² Zellrasen) bei 37 °C inkubiert werden. Um die Reaktion anschließend zu stoppen, wurde Trypsin-EDTA durch Zugabe von Medium 1:10 verdünnt und die Zellen resuspendiert. In der gewünschten Verdünnung wurden die Zellen in neue Kulturgefäße passagiert.

3.3.2 Dauerkulturen anlegen und auftauen

Anlegen von Dauerkulturen (Kryokonservierung)

Optisch konfluente Monolayer wurden nach Ablösen der Zellen in 1 ml/10cm² Zellrasen Kryomedium resuspendiert und in Kryoröhrchen aliquotiert. Diese wurden in einem *Cryo 1 °C Freezing Container* (Nalgene) mit einem Temperaturgradienten von 1 °C/h auf –80 °C gekühlt und anschließend zur Dauerlagerung in die Gasphase eines Flüssigstickstofftanks überführt.

Auftauen von Dauerkulturen

Kryokulturen wurden bei 37 °C im Wasserbad zügig aufgetaut und die Zellsuspension sofort mit Kulturmedium zehnfach verdünnt, um die zellschädigenden Effekte des im Kryomedium enthaltenen DMSO zu minimieren. In Zellkulturflaschen überführt wurden die Zellen vor der Verwendung für Versuche mindestens zweimal passagiert.

Bestimmung der Zellzahl

Die zu bestimmende Zellsuspension wurde 1:4 mit 0,4 % Trypanblaulösung gemischt und nach 3 min Inkubation bei 37 °C die lebenden Zellen in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Zellzahl/ml ergab sich aus dem Mittelwert vier großer Quadrate und dem Kammerfaktor.

Beschichtung mit Poly-L-Lysin

Glasdeckgläschen (rund, 12 mm Durchmesser) wurden zur besseren Zellhaftung mit Poly-L-Lysin beschichtet. Je 130 µl 1x Poly-L-Lysin-Lösung (25 µg/ml) wurden auf jedes Deckgläschen gegeben. Nach 60 min Einwirkzeit wurde die Lösung entfernt und nach Trocknung die Deckgläschen verwendet.

3.3.3 Transiente Transfektion

Damit sich die Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, wurden optisch konfluente Zellen am Vortag der Transfektion abgelöst und $1 \cdot 10^5$ Zellen/cm² ausgesät. Plasmid-DNA bzw. siRNA wurden mittels kationischer Lipide (Metafectene, Promega) in die Zellen eingebracht. Zuvor wurde das Medium gegen serumfreies Medium gewechselt, da Serum die Transfektionseffizienz herabsetzen kann. Plasmid-DNA wurde 50 pM eingesetzt, siRNA 5-100 nM. Experimente mit HEK-293-Zellen wurden 24, 48 bzw. 72 Stunden nach der Transfektion ausgewertet. MDCK-II-Zellen zeigten Empfindlichkeit gegenüber den Transfektionslipiden und so wurde nach 4-8 Stunden das Medium gegen frisches Kulturmedium ausgetauscht. Experimente mit MDCK-II-Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion ausgewertet. Als Kontrolle der Transfektionseffizienz für siRNA Oligonukleotide diente Cy3-markierte siRNA, für Plasmid-DNA pmaxFP-Green-N (amaxa) und mAQP2EGFP-kodierende Plasmid-DNA.

3.3.4 Stabile Transfektion von MDCK-II-Zellen

Aufgrund der allgemein schlechten Transfektionseffizienz bei MDCK-II-Zellen wurden diese Zellen für weitere Versuche als stabil transfizierte Zelllinien hergestellt.

MDCK-II-Zellen wurden wie bei der transienten Transfektion beschrieben vorbereitet und mit Plasmid-DNA transfiziert. Die Selektion begann 24 Stunden nach der Transfektion. Die Zellen wurden passagiert und in starker Zellsuspensionsverdünnung (1:100-1:10000) mit dem Selektionsmedium erneut ausgesät. Sowohl *pSilencerTM-4.1CMVneo* als auch *pIRESEGFNeo* tragen eine Neomycin-Resistenzkassette und so wurde G418 als Selektionsantibiotikum eingesetzt. Nach Ermittlung der optimalen Konzentration wurden 400 µg G418 je ml Medium eingesetzt. Sichtbare Klonkolonien wurden gepickt. Dazu wurden Metallringe durch Silikonfett abgedichtet und um die Klonkolonien der Petrischalen gelegt. Die Kolonien konnten dann passagiert und in 24-well-Platten einzeln ausgesät werden. Zellen mit *pIRESEGFNeo* konnten anhand der Fluoreszenz des EGFP detektiert werden. Die Selektion wurde fortgesetzt bis im Fluoreszenzmikroskop ausschließlich Zellen sichtbar waren, welche auch EGFP-Fluoreszenz zeigten. *pSilencerTM-4.1CMVneo* enthält kein Gen für ein

Fluoreszenzprotein. Bei Zellen, die mit *pSilencerTM4.1CMVneo* transfiziert wurden, wurden mehrere Passagier- und Verdünnungszyklen durchgeführt und der *Knockdown* mittels *Western-blotting* überprüft.

Stabil transfizierte MDCK-II-Zellen wurden einer Periode ohne Selektionsdruck unterworfen, um ausschließlich Zellen mit integriertem Plasmid zu erhalten. Danach wurden sie weiter in Medium mit G418 gehalten, sonst entsprach ihre Kultivierung der untransfizierter Zellen.

3.3.5 Aufschluss eukaryotischer Zellen

Nachdem Zellen abgelöst und in Medium resuspendiert waren, wurden sie pelletiert (10.000 x g, 4 °C, 10 min). Je nach Zellmenge wurde in wenig PBS resuspendiert und die Zellmembran mittels mehrfachem Einfrieren und Auftauen (-80 °C / 37 °C) lysiert. Zwischen den einzelnen Gefrierphasen wurde das Lysat mehrfach durch eine Kanüle (0,4 mm Durchmesser) resuspendiert und dabei Scherkräften unterworfen.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

Alle proteinbiochemischen Arbeiten wurden (wenn nicht ausdrücklich anders beschrieben) bei 4 °C oder auf Eis durchgeführt.

3.4.1 Proteingehaltsbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Lösungen wurde das Bio-Rad® Proteinassay Reagenz gemäß den Herstellervorschriften verwendet. Dabei wurden 0,8-8 µl Proteinprobe mit Wasser auf 800 µl aufgefüllt und mit 200 µl Bio-Rad-Reagenz versetzt. Die Ansätze wurden gründlich gemischt und nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur bei einer Wellenlänge von 595 nm vermessen. Als Kalibrierstandards dienten unterschiedliche Mengen an BSA.

3.4.2 BCA-Assay

Das *BCA Protein Assay-Kit* (Pierce) wurde herstellergemäß mit 10 µl Proteinlösung durchgeführt und die entstandenen gefärbten Lösungen bei 562 nm gegen den jeweiligen Probenpuffer als Leerwert vermessen. Als Standard dienten verschiedene Konzentrationen von BSA im jeweiligen Probenpuffer.

3.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Es wurden ein Sammelgel mit 5 % Acrylamid/Bisacrylamid und Trenngele mit 10-15 % Acrylamid/Bisacrylamid verwendet. In Tabelle 3.3 sind Volumina für zwei Minigele angegeben. Die Proteinproben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und inkubiert. Sollten Membranproteine untersucht werden, wurde 45 min bei 40°C inkubiert, für die Untersuchung cytosolischer Proteine 15 min bei 95°C. Als Molekulargewichtsmarker dienten der *prestained peqGOLD Protein-Marker III* (Größenbereich 19-118 kDa) oder der *unstained peqGOLD Protein-Marker I* (Größenbereich 14-116 kDa). Nach dem Auftragen der Proben wurde die Elektrophorese bei 30 mA/Minigel durchgeführt. Nach Beendigung des Laufes wurden die Trenngele entweder direkt gefärbt oder für *Western-blotting* verwendet.

Die Anfärbung der SDS-Gele erfolgte mittels Coomassie-Brilliant-Blau (Rotiphorese® Blau R) für 1 h, die Entfärbung fand über Nacht statt.

Tabelle 3.3: *Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele bei SDS-PAGE*

	Trenngel		Sammelgel
	10 %	12,5 %	5 %
Aqua dest.	5 ml	4 ml	2,4 ml
4x Trenngelpuffer	3 ml	3 ml	
4x Sammelgelpuffer			1 ml
Acrylamid-Lösung	4 ml	5 ml	0,6 ml
TEMED	10 µl	10 µl	6 µl
10 % APS	80 µl	80 µl	25 µl

3.4.4 Clear native PAGE (CNP)

Native Gelelektrophorese wurde in den selben Apparaturen wie SDS-PAGE durchgeführt. Die Zusammensetzung der diskontinuierlichen Gele zeigt Tabelle 3.4. Die CNP ist ein Trennsystem für native Proteinkomplexe, bei welcher auf denaturierende ionische Detergenzien wie SDS im Laufpuffer und Gel verzichtet wird. Die Triebkraft für die gerichtete Migration der Komplexe zur Anode entsteht allein durch die Eigenladung der Proteine. Proteine mit einem $pI < 7,0$ wandern zur Anode und werden somit aufgetrennt, während Proteine mit einem $pI > 7,0$ in den Kathodenpuffer wandern und verloren gehen. Alle Proteine, die mittels CNP untersucht werden sollten, besitzen einen theoretischen $pI < 7,0$ (Wittig und Schägger 2008). Die Probenvorbereitung verlief ebenfalls nativ: Eukaryotische Zellen wurden nach der Ernte aufgeschlossen und homogenisiert (3.3.5), anschließend zentrifugiert ($1000 \times g$, 10 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$). Das Pellet wurde in PBS pH 7,4 (mit oder ohne 0,5 % n-Octyl- β -d-glucopyranosid) aufgenommen und bei $8 \text{ }^\circ\text{C}$ für 45 min schüttelnd resuspendiert, währenddessen wurden die Membranproteine solubilisiert. Nach einer weiteren Zentrifugation ($100.000 \times g$, 60 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) wurden Pellet (Zellkerne, größere Membranfragmente) und Überstand (solubilisierte Membranproteine) getrennt bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Zur Verwendung in der CNP wurden diese Proben mit nativem Probenpuffer versetzt und mindestens 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend konnten sie auf die Gele aufgebracht werden. Der Gellauf erfolgte bei 4 °C.

Tabelle 3.4: *Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele der CNP*

	Trenngel 8 %	Sammelgel 4 %
30 % Acrylamid-Lösung	2,9 ml	0,8 ml
60 % Glycerin-Lösung	5,3 ml	2,0 ml
1,5 M Tris·HCl pH 8,8	2,8 ml	
0,5 M Tris·HCl pH 6,8		1,5 ml
Aqua dest.		1,7 ml
TEMED	55 µl	30 µl
10 % APS	44 µl	24 µl

3.4.5 Western-Blotting

Mit Hilfe des *Western-blots* und anschließender Immundetektion konnten einzelne Proteine spezifisch nachgewiesen werden.

Proteintransfer

Beim *Western-blotting* werden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran per Elektrotransfer überführt und immobilisiert. Die Membran wurde auf Gelgröße zugeschnitten und in Methanol aktiviert. Ebenfalls auf Gelgröße zugeschnittene 6 Whatmanpapiere wurden zusammen mit der aktivierten Membran in Transferpuffer inkubiert. In einer *semidry*-Zelle wurden die Membran und das SDS-Gel zwischen Whatmanpapieren aufgeschichtet. Der Proteintransfer auf die PVDF-Membran erfolgte bei 2,5 mA/cm² für eine Stunde.

Ponceau S-Färbung

Der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurde mittels Ponceau-Rot überprüft. Nach 5 min Inkubation wurde Farbstoffüberschuss vorsichtig mit Wasser entfernt. War das ElektrobloTTen erfolgreich, so konnten Proteinbanden visuell detektiert werden.

Immundetektion geblotteter Proteine

Nach Immobilisierung der Proteine wurden unspezifische Proteinbindungsstellen der PVDF-Membran blockiert. Dazu wurde sie mit MTBS-T-Puffer inkubiert. Anschließend wurde die Blockierlösung verworfen und die Membran mit dem Primär-Antikörper in MTBST-Puffer für 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Unspezifisch gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit TBST-Puffer, jeweils 15 min, entfernt. Mit dem HRP-konjugierten Sekundär-Antikörper in MTBST-Puffer wurde 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBST-Puffer für jeweils 15 min wurde mittels Chemilumineszenzreaktion detektiert. Das *ECL Plus Western Blot Detektion System* wurde nach Herstellerangaben angewendet. Die Chemilumineszenz wurde durch Belichtung von ECL-Hyperfilmen oder im Lumi-Imager F1TM (Software: LumiAnalyst) detektiert, die Belichtungsdauer richtete sich hierbei nach der gewünschten Intensität der Banden. Die Chemilumineszenz der Membranen wurde durch das Programm LumiAnalystTM in Form von *Biochemical light units* (BLU) quantifiziert.

3.4.6 Peptidspotmembran-Assay

Peptidsequenzen von AQP2 mit einer Länge von je 25 Aminosäuren wurden durch automatisierte Synthese mit einem AutoSpot-Roboter ASS 222 auf Whatman 50 Zellulosemembranen synthetisiert (Abteilung Peptidchemie, FMP Berlin). Seitenkettenschutzgruppen wurden durch Zugabe von Trifluoressigsäure in Dichlormethan entfernt. N-terminal beginnend wurden 25mere auf Zellulosemembranen synthetisiert (mit jeweils 20 überlappenden Aminosäuren). Im Anschluß wurden die Membranen nach einem einstündigen Blockierschritt im Blockierbuffer (MTBST) mit gereinigten Proteinen für die Dauer von einer Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde nach drei Waschschritten mit TBST die Immundetektion durchgeführt.

Die parallele Synthese von Peptiden an Zellulosemembranen wird als SPOT-Synthese (Frank 2002, Wenschuh *et al.* 2000) bezeichnet, da die Synthese der einzelnen Peptide auf kleine kreisförmige Bereiche der Membran (Spots) begrenzt ist. Die Peptide sind durch den C-Terminus mit der Membran verbunden. Um hydrophobe Peptide auf der Membran für wässrige Lösungen zugänglich zu machen, wurde die Membran für 10 min mit Methanol behandelt und anschließend drei mal 10 min mit TBST gewaschen. Die Blockierung freier Proteinbindestellen auf der Membran erfolgte durch Inkubation mit MTBST für 3 h bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit 10 µg/ml des zu untersuchenden Proteins in MTBST über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schwenken. Nach drei Waschstufen, für jeweils 10 min mit TBST, folgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper α -Aha1-N beziehungsweise α -Aha1-C und die weitere Detektion wie unter 3.4.5 (Immundetektion) beschrieben.

Um die Membranen ein zweites Mal zu verwenden, wurden die gebundenen Proteine durch zweistündige Inkubation mit Ablösepuffer von der Membran gelöst, die Membranen in Aqua dest. gespült und getrocknet im Kühlschrank gelagert.

3.4.7 Recyclen von PVDF-Membranen

Um PVDF-Membranen nach der einmaligen Durchführung eines *Western-blotting*s mit einem anderen Primärantikörper detektieren zu können, wurden Membranen von Immunglobulinen befreit. 50 ml Stripping-Puffer wurden unter Schütteln 30 min auf 70 °C vorgewärmt und kurz vor Zugabe der Membran mit 150 mg DTT versetzt. Die Membran wurde 30 min bei 70 °C inkubiert, drei mal mit TBST gewaschen und erneut einem *Western-blotting*, beginnend mit dem Blockierschritt, unterzogen.

3.4.8 Indirekte Immunofluoreszenz

Zellen wurden auf Glasdeckgläschen (beschichtet mit Poly-L-Lysin) angezchtet. Zur Aktivierung der Proteinkinase A wurde mit 20 µM Forskolin 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach waschen mit PBS wurden die Zellen 15 min bei Raumtemperatur fixiert (3 % Paraformaldehyd in PBS) um zelluläre Strukturen zu erhalten. Die Reaktion wurde durch Inkubation mit Ammoniumacetat (50 mM in PBS) beendet. Permeabilisiert wurde nach 2-fachem Waschen mit PBS durch Einwirkung von Triton-X-100 (0,1 % in 1x PBS) für 5 min bei Raumtemperatur. Erneutes Waschen mit PBS (zwei mal

kurz, drei mal 10 min) schloss sich an. Um die unspezifischen Bindestellen für Antikörper abzusättigen, wurden die Zellen mit Blockierlösung 1 h bei leichtem Schwenken inkubiert. Die Primär- und Sekundärantikörper wurden in Blockierlösung vorbereitet und je 40 µl auf ein Deckgläschen gegeben. Nach jeder Antikörperinkubation (1 h bei 37 °C, feuchtgehalten) wurden die Deckgläschen drei mal mit PBS gewaschen und mit je einem Tropfen Molviol (Roth) auf Objektträger aufgebracht. Die Präparate wurden über Nacht bei 4 °C liegend aushärten gelassen und danach weiter bei 4 °C gelagert. Die Auswertung erfolgte mittels konfokaler Laserscanmikroskopie.

3.4.9 Konfokale Laserscanmikroskopie

Konfokale Laserscanmikroskopie wurde an immunodetektierten Zellen oder mit GFP-Fusionsproteinen transfizierten Zellen durchgeführt. Die Proben wurden in xy-Modus detektiert. Für den z-Achsen-Scan wurden Bereiche von 10-15 µm gewählt - dies entspricht dem mittleren Zelldurchmesser der mikroskopierten Zellen. Alle Abbildungen in dieser Arbeit zeigen exemplarisch repräsentative Bilder, die aus mindestens drei unabhängigen Experimenten resultierten.

3.4.10 *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

Für die Lokalisation der Proteinen in der Zellmembran wurden Zellen in beschichteten 12-well-Platten gezüchtet. Zur Aktivierung der Proteinkinase A wurde mit 20 µM Forskolin 30 min bei 37 °C inkubiert. Die well-Platten wurden auf Eis gestellt, das Medium von den Zellen gesaugt und alle weiteren Arbeiten im 4 °C-Raum durchgeführt. Je well wurde mit 500 µl Blockierlösung für 45 min inkubiert um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen. Der Primär- und Sekundärantikörper wurde in Blockierlösung vorbereitet und je 600 µl in ein well gegeben. Nach jeder Antikörperinkubation (3 h bei 4 °C, schwenkend) wurden die 12-well-Platten ausgeleert und drei mal mit PBS-CM und anschließend 1-mal mit TBST gewaschen. Da der Sekundärantikörper an POD gekoppelt war, wurden 400 µl TMB je well zur Entwicklung verwendet (für 10 min bei 37 °C) und diese Reaktion mit 1 M HCl (200 µl/well) gestoppt. Von den nunmehr je 600 µl wurden 200 µl vorsichtig in eine 96-well-Platte transferiert und in einem Plattenreader bei 400 nm vermessen.

3.4.11 Koimmunpräzipitation

Mit spezifischen Antikörpern können Proteine aus Lösungen präzipitiert und somit angereichert werden. Dazu koppelt man den Antikörper an Protein-G-Sepharose und inkubiert diese mit der Proteinlösung. Protein-A und Protein-G besitzen eine hohe Affinität zur Fc-Domäne der meisten Säugerringlobuline. Nach der Bindung an Protein-G steht der F_{ab}-Teil der Immunglobuline für die Antigenbindung weiter zur Verfügung. Besteht eine stabile Protein-Protein-Interaktion, können die Bindungspartner kopräzipitiert werden. Alle Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Zellen wurden nach Aufschluss mit Lysispuffer und Homogenisierung mittels Kanülen abzentrifugiert (12000 x g, 10 min). Der Überstand wurde mit Protein-G-Sepharose (20 µg/ml Überstand) und Antikörper (2 µg/ml Überstand) versetzt und über Nacht unter Schwenken inkubiert. Nach Entfernen den Überstandes wurde die Sepharose vier mal mit je 400 µl Lysepuffer gewaschen (30 s bei 1000 x g abzentrifugiert) und anschließend mit SDS-Probenpuffer aufbereitet. Der SDS-Probenpuffer enthielt danach alle angereicherten Proteine.

3.4.12 Ni²⁺-NTA Affinitätschromatographie

Über einen N-terminalen 10xHis-*tag* konnten rekombinant exprimierte Proteine aus *E. coli* aufgereinigt werden. Durch Zellyse (3.3.2) erhaltene Proteinlösung wurde mit Ni²⁺-NTA-Agarose versetzt (1 ml/l Zellkultur) und über Nacht bei 4 °C unter Schwenken inkubiert. Nach diesem Bineschritt wurde die Suspension auf eine Säule mit Filterfritte gegeben und mit Imidazol-haltigem Puffer gewaschen, bzw. das Protein daraus eluiert:

waschen mit 15-fachem Säulenvolumen 50 mM Imidazol-Waschpuffer His-*tag*

waschen mit 10-fachem Säulenvolumen 100 mM Imidazol-Waschpuffer His-*tag*

waschen mit 10-fachem Säulenvolumen 150 mM Imidazol-Waschpuffer His-*tag*

Elution mit 0,5-fachem Säulenvolumen 400 mM Imidazol-Elutionspuffer His- *tag*

Die Reinheit der Proteinlösung wurde mittels SDS-PAGE (3.4.3) überprüft, die korrekte Identität durch *Western-blotting*. Der Proteingehalt der Eluate wurde mittels Bradford-Assay (3.4.1) ermittelt.

3.4.13 Glutathion-Affinitätschromatographie

Über einen N-terminalen *GST-tag* konnten rekombinant exprimierte Proteine aus *E. coli* aufgereinigt werden. Durch Zellyse (3.3.2) erhaltene Proteinlösung wurde mit Glutathion-Sepharose 4B versetzt (1 ml/l Zellkultur) und 1 h bei 4 °C unter Schwenken inkubiert. Nach diesem Bindschritt wurde die Suspension auf eine Säule mit Filterfritte gegeben und mit verschiedenen Puffern gewaschen, bzw. das Protein eluiert:

- waschen mit 20-fachem Säulenvolumen Waschpuffer GST-tag
- resuspendieren der Sepharose in einfachem Säulenvolumen Waschpuffer GST-tag
- waschen mit 30-fachem Säulenvolumen Waschpuffer GST-tag
- vier mal Elution mit einfachem Säulenvolumen Elutionspuffer GST-tag

Die Reinheit der Proteinlösung wurde mittels SDS-PAGE (3.4.3) überprüft, die korrekte Identität durch *Western-blotting*. Der Proteingehalt der Eluate wurde mittels Bradford-Assay (3.4.1) festgestellt.

3.4.14 Dialyse

Um die rekombinant hergestellten Proteine weiterverwenden zu können, musste der Puffer der Lösung an den folgenden Versuch angepasst werden. 1-2 ml der Proteinlösung wurden in einen Dialyseschlauch (MWCO 8.000-10.000) gegeben und bei 4 °C unter Rühren mehrfach mit dem neuen Puffer inkubiert:

- 1 l neuer Puffer für 1 h
- 1 l neuer Puffer für 1 h
- 1 l neuer Puffer über Nacht

3.4.15 Faktor Xa-Verdau

Um den 10xHis-tag an rekombinant exprimierten Proteinen wieder entfernen zu können, wurde Faktor Xa eingesetzt. Faktor Xa ist eine Protease des Blutgerinnungssystems, welche Proteine nach der spezifischen Erkennungssequenz Ile-Glu/Asp-Gly-Arg schneidet und somit in der Gerinnungskaskade Thrombin aus Prothrombin freisetzt. Da der Expressionsvektor ebenfalls diese Erkennungssequenz

zwischen dem His-*tag* und dem zu exprimierenden Protein kodiert, ist es möglich, die Histidin-Reste mit Hilfe des Faktor Xa abzuspalten.

0,05-1,0 U Faktor Xa wurden für 10 µg Protein eingesetzt, welches sich im Faktor Xa-Reaktionspuffer befand, und auf das 6-fache Volumen mit Faktor Xa-Reaktionspuffer aufgefüllt. Nach einer Inkubation über Nacht bei 4 °C wurde die Reaktion abgebrochen und deren Effizienz auf SDS-PAGE (3.4.3) überprüft.

3.5 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung von zwei miteinander zu vergleichenden Parameter fand der zweiseitige T-Test Anwendung. Der p-Wert für signifikante Unterschiede wurde auf $p = 0,05$ festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Bindet Aha1 direkt an AQP2?

Durch die Vorarbeiten im *Yeast-2-Hybrid-Screening* (1.6) wurde vermutet, dass Aha1 an den C-Terminus des AQP2-S256D bindet. Die Arbeitsgruppe um Enno Klusmann am FMP Berlin konnte Aha1 an AQP2-Vesikeln detektieren. Des Weiteren konnte Aha1, nach der Delokalisation der AQP2-Vesikel nach Vasopressin-Einwirkung auf MDCK-II-Zellen, ebenfalls an der Zellmembran gefunden werden. Daher stellte sich die Frage nach einer direkten Bindung von Aha1 an AQP2 in seiner am Ser256 phosphorylierten Form. Um *in vitro* Interaktionen und Bindungen zwischen Proteinen zu untersuchen, werden verschiedene Verfahren eingesetzt. Klassisch sind inzwischen unter anderem Peptidspotmembran-Assays und Koimmunopräzipitation. Um Proteinkomplexe - auch auf Protein-Protein-Bindungen oder -Interaktionen beruhen können - nachzuweisen, wird native-PAGE genutzt. Auf diese Weise wurden bereits Membranproteinkomplexe identifiziert (Wumeier *et al.* 2009).

4.1.1 Assays mit Lysaten AQP2 exprimierender eukaryotischer Zelllinien

Da AQP2 exprimierende HEK-293-Zellen (transient transfiziert) relativ leicht erzeugt werden konnten, wurden diese zur Gewinnung AQP2-haltiger Zelllysate genutzt. In *E. coli* rekombinant erzeugtes AQP2 ist nicht allen posttranslationalen Modifikationen unterworfen (Arya *et al.* 2008). In eukaryotischen Zellen hergestelltes Protein weist alle auch im Menschen vorhandenen Modifikationen auf.

Die HEK-293-Zellen wurden unter nativen Bedingungen aufgeschlossen (3.4.4). Das Zelllysate wurde zum einen auf *clear native* PAGE-Gele (3.4.4) aufgetragen und zum anderen einer Koimmunopräzipitation unterzogen um eine direkte Bindung zwischen Aha1 und AQP2 zu untersuchen.

Clear native PAGE

Die Detektion von Aha1 oder AQP2 im Western-blotting der CNP-Gele in Abbildung 4.1 zeigt Banden, welche der Größe der einzelnen Proteine entsprechen (38 kDa für Aha1 und 24 kDa für AQP2-Monomere). In keinem der Versuche konnten durch Western-blotting und Detektion mittels spezifischer Antikörper gegen Aha1 oder AQP2 Banden in Höhe eines Fusionsproteins (ca. 60 kDa) aus beiden Proteinen detektiert werden.

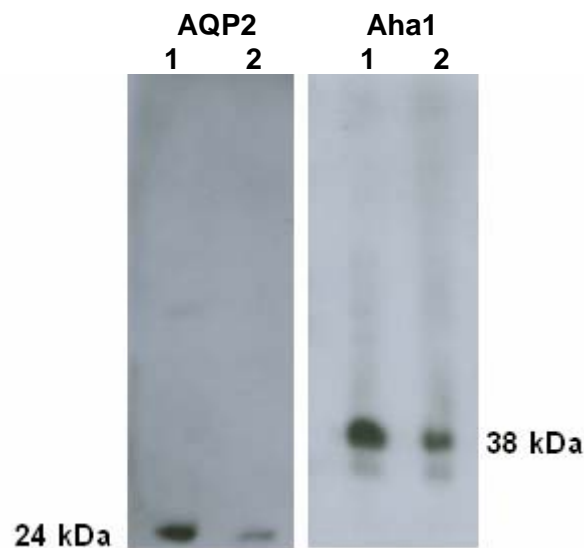


Abbildung 4.1: Clear native-PAGE: Lysate von AQP2 exprimierenden HEK-293-Zellen wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und per Western-blotting mit Antikörpern gegen AQP2 (links) und Aha1 (rechts) detektiert. Je Tasche wurden 10 μ l Lysat aufgetragen. 1: HEK-293-Zelllysat ohne Detergenz aufgeschlossen, 2: HEK-293-Zelllysat mit 0,5 % *n*-Octyl- β -*d*-glucopyranosid aufgeschlossen.

Koimmunpräzipitation

Durch Koimmunpräzipitation lassen sich Protein-Protein-Interaktionen nachweisen. Ausgehend von der einfachen Immunpräzipitation, bei welcher Proteine mittels spezifischer immobilisierter Antikörper aus Lösungen isoliert und somit angereichert werden können, nutzt man dies, um auch Interaktionspartner mit anzureichern. Hier wurden spezifische Antikörper gegen AQP2 eingesetzt und mit Lysaten von HEK-293-Zellen, welche transient mit AQP2-S256A und AQP2-S256D transfiziert worden waren, inkubiert. AQP2 wurde präzipitiert, was durch die Banden in Abbildung 4.2 A (Taschen 1-4) für AQP2 gezeigt ist. Die obersten Banden in den Taschen 1-6 entstanden durch den immobilisierten Antikörper auf der Protein-G-Sepharose.

Abbildung 4.2 B zeigt große Mengen Aha1 in den Zelllysaten (Taschen 7-9, Abb. 4.2 B) vor der Immunpräzipitation. Hier ist auch das typische Bandenmuster des Aha1 gut zu erkennen: es sind nach Immundetektion mit einem für Aha1 spezifischen Antikörper 2 Banden zu sehen. Eine entspricht mit 38 kDa dem Molekulargewicht, die zweite erscheint bei 50 kDa und ist noch nicht genauer charakterisiert. Die Proben nach der Immunpräzipitation, welche aus den immobilisierten Antikörper-AQP2-beads bestehen (Taschen 1-4, Abb. 4.2 B), zeigen kaum Signal für Aha1 - es ist genauso intensiv wie für die Zelllysate aus Zellen ohne AQP2 (Taschen 5/6, Abb. 4.2 B). Sowohl in Zelllysaten, welche AQP2-S256A enthielten, als auch in Zelllysaten mit AQP2-S256D konnte unter den gewählten Bedingungen kein Aha1 mit AQP2 koimmunpräzipitiert werden.

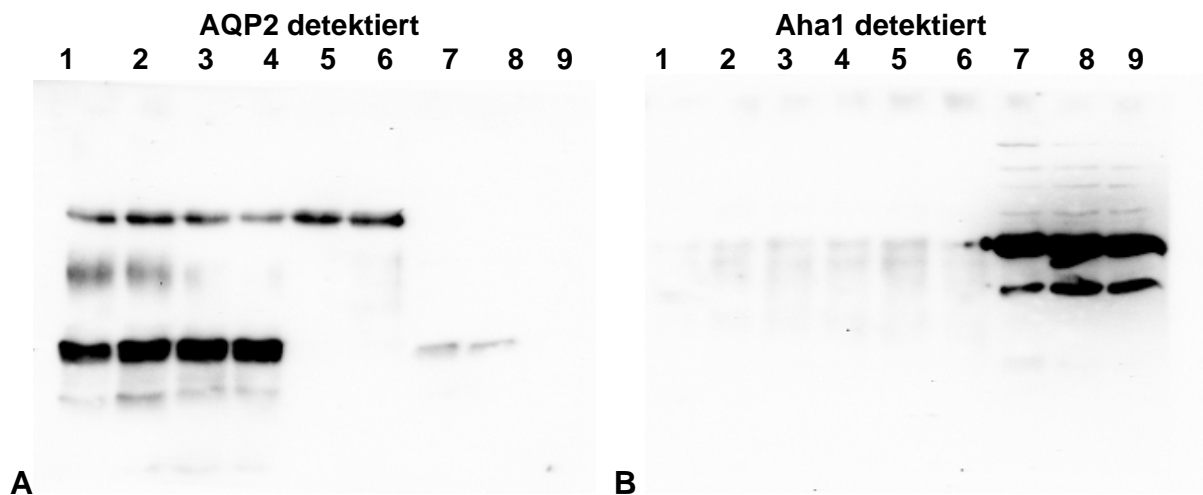


Abbildung 4.2: Immunpräzipitation von AQP2 aus Lysaten (Solubilisierung mit Dodecyl- β -D-Maltosid) von AQP2 exprimierenden HEK-293-Zellen. Zelllysate und durch SDS-Probenpuffer abgelöste Proteine nach der Immunpräzipitation wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblotting mit spezifischen Antikörpern gegen AQP2 (A) und Aha1 (B) detektiert. 1/2: Immunpräzipitation mit Lysaten AQP2-S256D exprimierender HEK-293-Zellen, 3/4: Immunpräzipitation mit Lysaten AQP2-S256A exprimierender HEK-293-Zellen, 5/6: Immunpräzipitation mit HEK-293-Zellen ohne AQP2, 7: Zelllysate AQP2-S256D exprimierender HEK-293-Zellen, 8: Zelllysate AQP2-S256A exprimierender HEK-293-Zellen, 9: Zelllysate von HEK-293-Zellen ohne AQP2 = Negativkontrolle (5 μ l Ansatz/Tasche)

4.1.2 Rekombinante Expression und Aufreinigung von Aha1

Um *in vitro* die mögliche Bindung von Aha1 an AQP2 untersuchen zu können, wurde Aha1 rekombinant in *E. coli* exprimiert. Die bisher bekannte posttranslationale Modifikation an Aha1 ist seine Acetylierung an Lys3 und Lys212. Da *E. coli* in der Lage ist, Proteine posttranslational zu acetylieren, stellte dies ein einfaches und effizientes Expressionssystem dar. Um das Protein anschließend aus dem von *E. coli* exprimierten Proteingemisch isolieren zu können, wurde mit Affinitäts-Tags gearbeitet.

Der Glutathion S-transferase- oder GST-tag

Dieser Anker hat ein Molekulargewicht von 25 kDa und wurde das erste Mal 1993 beschrieben (Davies *et al.* 1993). Er zählt zu den großen *tags* (*tags* mit über 60 Aminosäuren). In vielen Fällen erhöht der *tag* Stabilität und Löslichkeit des Proteins und wird häufig in Wechselwirkungsstudien zwischen DNA/Protein sowie Protein/Protein verwendet. GST-Fusionsproteine können in Bakterien, Hefen, Insektenzellen und Säugerzellen exprimiert werden.

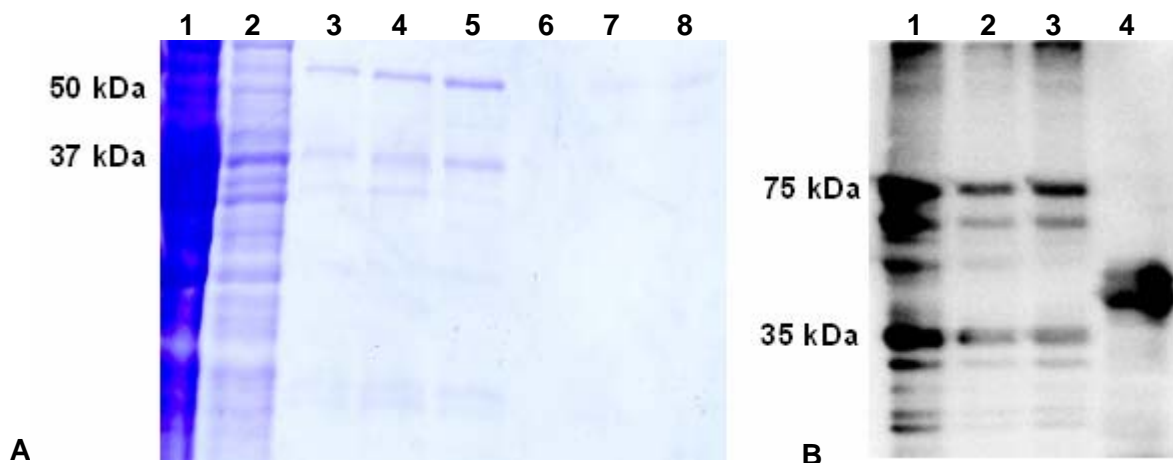


Abbildung 4.1: Exemplarische Auswertung einer rekombinanten Expression von GST-Aha1 in *E. coli* und Aufreinigung über Glutathion-Sepharose. Je 10 μ l der Fraktionen wurden unabhängig ihres Proteingehaltes im SDS-PAGE aufgetrennt (A) und per Western-blotting Aha1 detektiert (B).

A: SDS-PAGE; 1: Säulendurchlauf; 2: Waschschrift; 3-5: Elution mit Glutathion (10 mM); 6-8: Elution mit Glutathion (20 mM)

B: Western-blotting; 1: Säulendurchlauf; 2: Waschschrift; 3: Elution mit Glutathion (10 mM); 4: His-Aha1

Auf SDS-Gelen und in *Western-blotting* waren nach der Aufreinigung mittels Glutathion-Sepharose keine Proteine mit dem erwarteten Molekulargewicht von 63 kDa nachweisbar. In SDS-Gelen konnten Banden bei 50 und 37 kDa detektiert werden, in *Western-blotting* erschienen nach Detektion von Aha1 durch einen spezifischen Antikörper Doppelbanden bei ca. 35 kDa und 75 kDa (Abb. 4.1).

Der Poly-Histidin- oder His-tag

Dieser *tag* ist 6-10 Aminosäuren lang und damit unter 1 kDa groß (Hochuli *et al.* 1987). Der His-tag wird gewöhnlich zur Proteinaufreinigung eingesetzt.

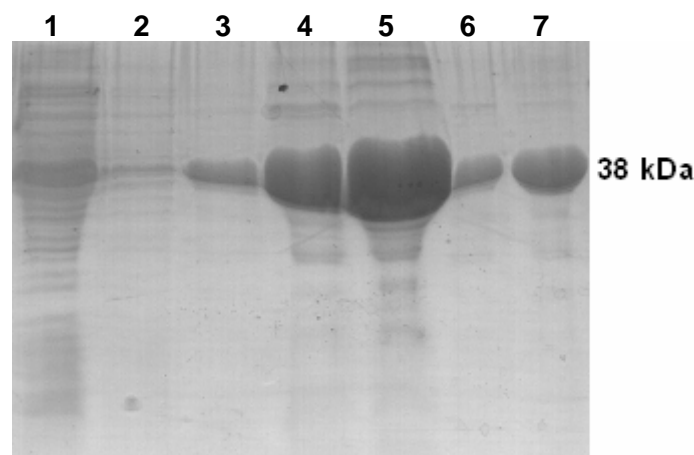


Abbildung 4.2: Exemplarische Auswertung im SDS-PAGE einer rekombinanten Expression von 10xHis-Aha1 in *E. coli* und der IMAC-Aufreinigung über Ni^{2+} -NTA-Agarose.

1: Durchfluss; 2: Waschschrift 50 mM Imidazol; 3: Waschschrift mit 100 mM Imidazol; 4-7: Elution mit 400 mM Imidazol. Je 5 μl der Fraktionen wurden aufgetragen.

Abbildung 4.2 zeigt das Bild einer SDS-PAGE nach einer erfolgreichen Aufreinigung von rekombinant exprimiertem Aha1. Im Anschluss an die Aufreinigung wurde ein Verdau durch Faktor Xa versucht, da sich zwischen dem rekombinanten Aha1 und dem His-tag eine Schnittstelle für diese Protease befand. Nach Einsatz verschiedener Mengen Faktor Xa und unterschiedlichen Inkubationsbedingungen (Variation von Zeit und Temperatur) konnte ausschließlich im Miniaturansatz (10 μg Aha1, 4 °C über Nacht) ein partieller Abverdau des tags erzielt werden. Vollständig umgesetzt wurde 10xHis-Aha1 in keinem der Versuche. Abbildung 4.3 zeigt das SDS-Gel eines Verdaus von 10 μg 10xHis-Aha1 und selbst bei 1,0 U Faktor Xa auf 10 μg Aha1 über Nacht wurde nur ein Teil des 10xHis-Aha1 vom His-tag befreit.

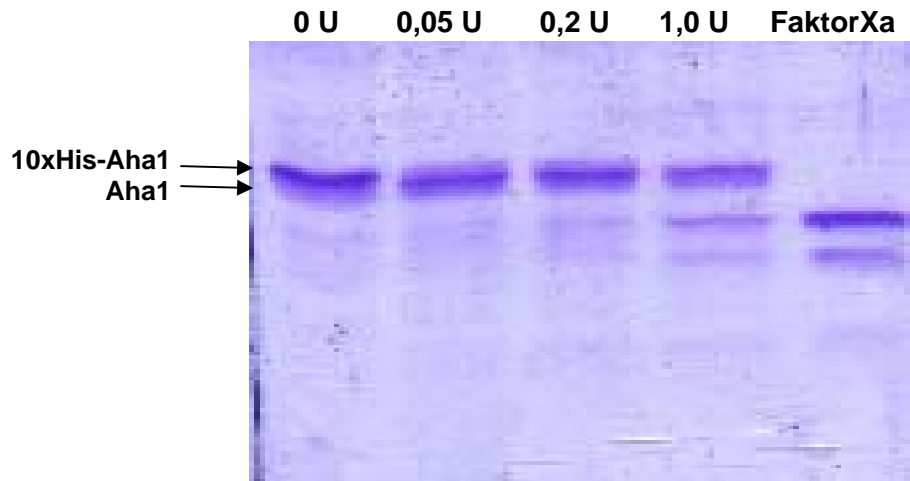


Abbildung 4.3: Exemplarisches SDS-Gel eines Verdau von 10 µg 10xHis-Aha1 mittels unterschiedlicher Mengen Faktor Xa über Nacht bei 4 °C. Je Tasche wurden 10 µl des Verdau-Mixes aufgetragen.

Um die Zugänglichkeit der Faktor Xa-Schnittstelle zu erhöhen, wurde der Einsatz von Faktor Xa auch bei noch an Ni²⁺-NTA-Agarose gebundenem 10xHis-Aha1 versucht. Die durch den Verdau mit Faktor Xa entstandenen 10xHis-Aha1-Eluate wurden auf die Effizienz des Verdau untersucht. Abbildung 4.4 zeigt SDS-Gel und *Western-blotting* eines solchen Verdau. Im SDS-Gel ist kaum Protein zu erkennen. Im *Western-blotting* ist für zwar für den Verdau eine zweite Bande unterhalb der 10xHis-Aha1-bande zu erkennen, doch da die Immundetektion um vieles sensitiver ist, zeigt dies die geringe Ausbeute an Aha1 ohne *His-tag*. Es wird bei direkt an Ni²⁺-NTA-Agarosebeads gebundenem 10xHis-Aha1 mehr Aha1 ohne *His-tag* detektiert, als bei Verdauen von bereits eluiertem 10xHis-Aha1, doch insgesamt ergaben die Experimente keinen ausreichenden Verdau durch Faktor Xa.

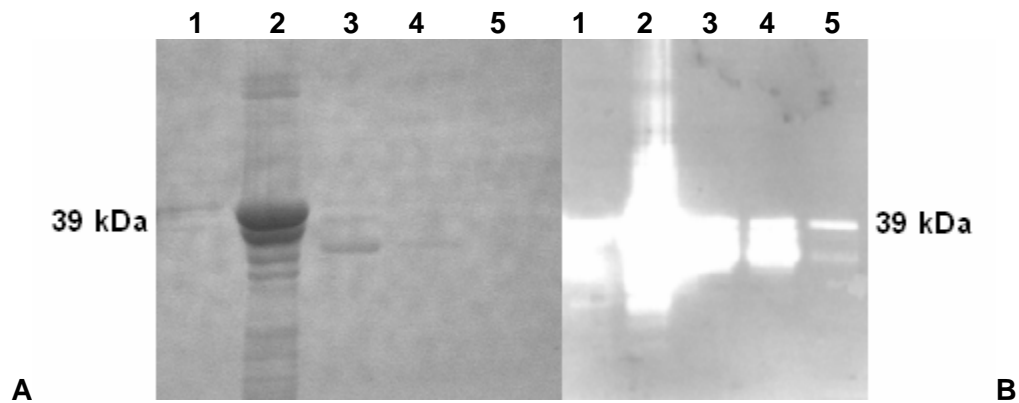


Abbildung 4.4: Auswertung eines Faktor Xa-Verdau von an Ni^{2+} -NTA-Agarose gebundenem 10xHis-Aha1. Je 5 μl der Fraktionen bzw. SDS-Probenpuffersuspensionen wurden im SDS-PAGE aufgetrennt (A) und per Western-blotting Aha1 detektiert (B - hier mit invertierten Farben abgebildet). 1: Waschschritt vor Verdau, 2: Ni^{2+} -NTA-Agarose nach Inkubation mit Faktor Xa, 3: Überstand der Ni^{2+} -NTA-Agarose nach Inkubation mit Faktor Xa, 4: Überstand nach Entfernung des Faktor Xa (Xa removal kit quiagen), 5: Xa removal beads

Auch Versuche mit höheren Mengen 10xHis-Aha1 und adäquat erhöhten Mengen Faktor Xa führten zu unvollständigem Verdau. Der Einsatz von Faktor Xa unterschiedlicher Hersteller führte nicht zu zufrieden stellenden Ergebnissen.

Aufgrund dieser Ergebnisse - keine erfolgreiche Expression von GST-Aha1, aber einer guten Expression und Aufreinigung des 10xHis-Aha1 - wurde Aha1 im Folgenden als 10xHis-Aha1 eingesetzt und der *His-tag* nicht entfernt.

4.1.3 *In vitro* Bindungsassays von 10xHis-Aha1 an AQP2

Mit rekombinantem 10xHis-Aha1 stand ein Werkzeug zur Verfügung die putative Bindung von Aha1 an AQP2 ausserhalb zellulärer Systeme zu untersuchen.

Peptidspotmembran-Assay

Whatman-Paper gekoppelte Peptide (25mer), welche der Sequenz des C-Terminus von hAQPwt, hAQP2-S256D und hAQP2-S256A entsprechen, wurden mit 10xHis-Aha1 inkubiert. Gebundenes 10xHis-Aha1 wurde durch α -Aha1-C detektiert und die Chemilumineszenz der *Spots* mit Lumianalyst (Roche) semiquantifiziert. Abbildung 4.6 zeigt die Sequenzen der Peptidspots und die dazugehörigen Chemilumineszenz-Signale der Peptidspotmembran. Die intensivsten Signale sind bei den Spots der Reihen 7 erkennbar. Schwächere Signale erscheinen in den Reihen 8. Ausgehend vom intensivsten Signal in der densitometrischen Auswertung (Spot 3 Reihe 7 hAQP2wt C-Terminus) wurden alle weiteren Spots prozentual in Relation gesetzt. Die mittleren Signalstärken der Spot-Reihen sind in der dritten Spalte dargestellt. Die stärkste Bindung von 10xHis-Aha1 ist in Reihe 7 für den C-Terminus von hAQP2wt zu sehen. Insgesamt war die Bindung von 10xHis-Aha1 an den Wildtyp von hAQP2 in diesem Assay am stärksten. Die mittlere Signalstärke für 10xHis-Aha1 an hAQP2-S256D ist um 6,25 % geringer als die für hAQP2wt. An hAQP2-S256A bindet 10xHis-Aha1 in diesem Assay am schwächsten. Die mittlere Signalstärke der Spots liegt 12,5 % unter der für hAQP2wt.

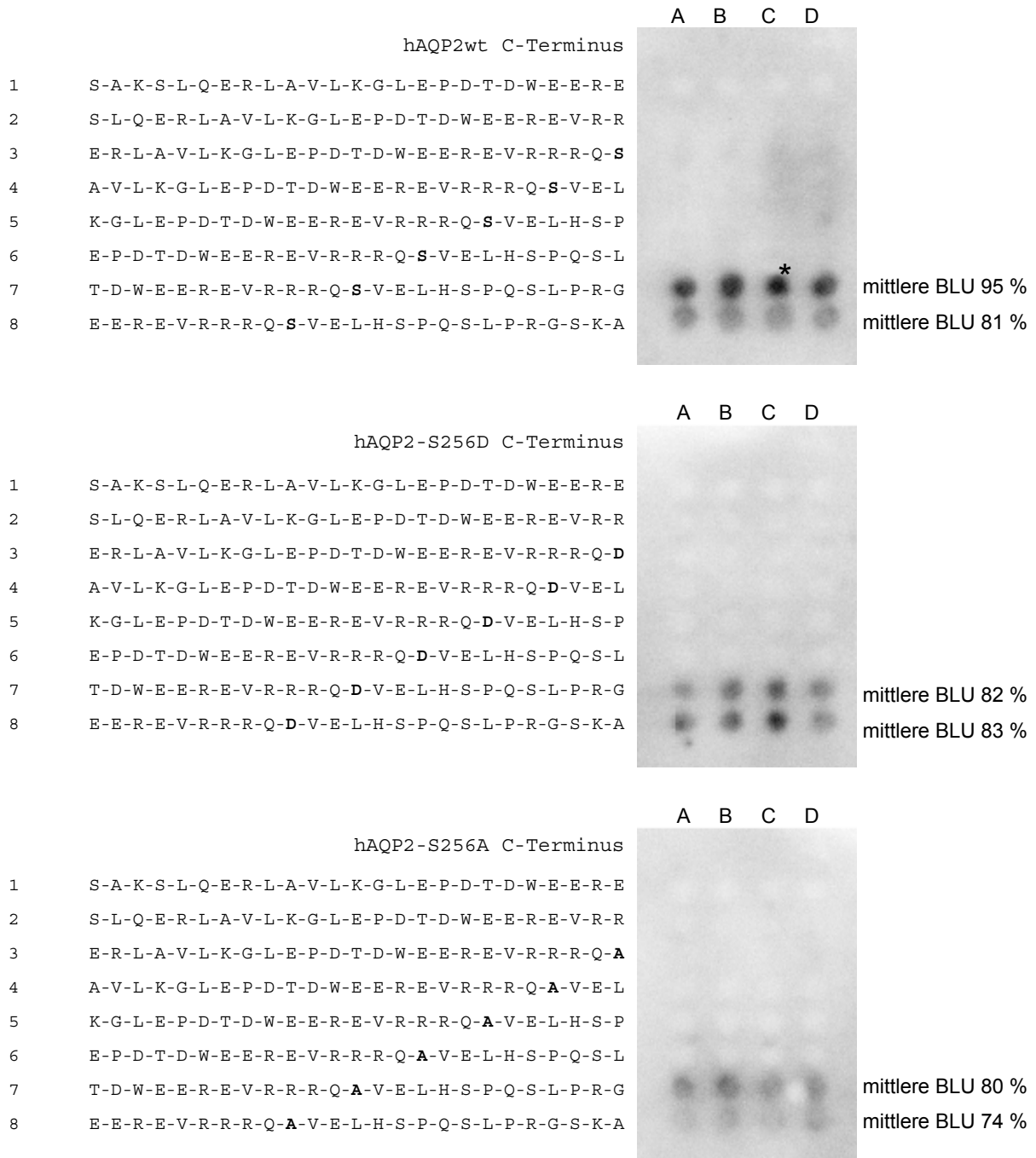


Abbildung 4.6: Auswertung eines Peptidspotmembran-Assays. Whatman-Paper gekoppelte Peptide (25mer), welche der Sequenz des C-Terminus von hAQPwt, hAQP2-S256D und hAQP2-S256A entsprechen, wurden mit 10xHis-Aha1 inkubiert. Gebundenes 10xHis-Aha1 wurde durch α -Aha1-C detektiert und die Chemilumineszenz der Spots mit Lumianalyst (Roche) semiquantifiziert. Spalte 1: Sequenzen der Peptide auf der Peptidspotmembran, Spalte 2: Chemilumineszenzsignale der Peptidspotmembran, Spalte 3: Mittelwerte der Signalstärken der Peptidspotreihen in % bezogen auf das stärkste Signal in Spot C7 (*) auf der Peptidspotmembran mit hAQP2wt.

4.1.4 Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR) Spektroskopie

SPR-Spektroskopie-Messungen wurden in Kooperation mit Dr. Henning Rosenfeld (GKSS Geesthacht) durchgeführt. SPR ist eine Biosensortechnologie, die auf der Detektion von Massenänderungen in einem evaneszenten Feld beruht. Biomoleküle wie Lipide, Proteine, Peptide und Nukleinsäuren können auf der Oberfläche von Sensorchips in einer Miniaturflusszelle immobilisiert werden. Mögliche Interaktionspartner werden über die Oberfläche dieses Sensorchips gespült und Wechselwirkungen mit den immobilisierten Molekülen werden detektierbar (Abb. 4.7).

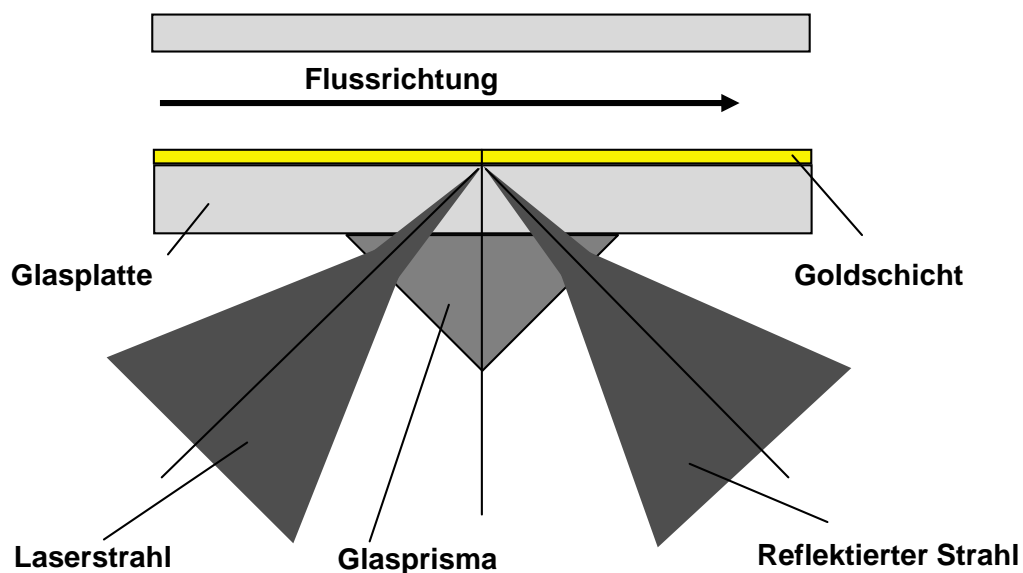


Abbildung 4.7: Schematische Darstellung des Aufbaus einer SPR-Apparatur.

Das verwendete Biacore 3000 misst Änderungen des Brechungsindex in Resonanzeinheiten (RU), 1 RU entspricht 0,0001 Grad Änderung des reflektierten Laserstrahls und einer Massenänderung von 1 pg/mm^2 und so kann Proteinabsorption an die Oberfläche gemessen werden. Abbildung 4.8 stellt schematisch den typischen Kurvenverlauf einer RU-Detektion während einer Messung mittels SPR dar. Die Basislinie steigt bei Bindung an die Oberfläche des Chips an und sinkt nach Ende der Injektion wieder ab. Gezielte Dissoziation lässt das Signal auf die Basislinie zurückkehren.

Es wurde ein L1-Chip verwendet, an dessen lipophile Anker (innerhalb einer carboxymethylierten Dextranschicht) Liposomen aus Phosphatidylcholin (PC) und

Phosphatidylethanolamin (PE) (8:2 w/w) angelagert wurden. Die Flussrate betrug 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. Rekombinantes 10xHis-Aha1 wurde mit 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in Flusspuffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl pH 7,4 und 0,5 % Surfactant P20) eingesetzt.

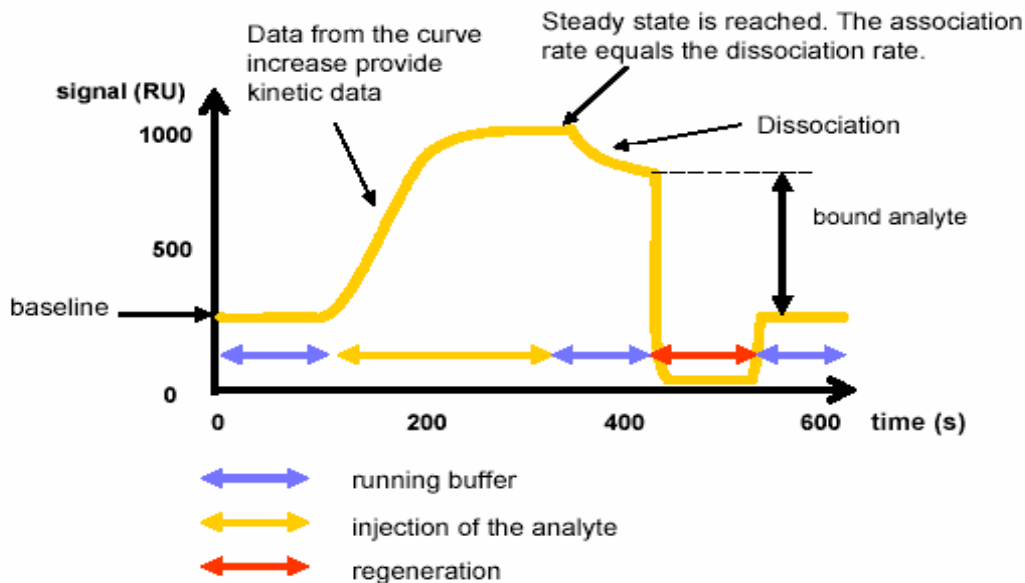


Abbildung 4.8: Schematische Darstellung eines „Sensogrammes“ (Klimka et al. 2005).

ausgehend von einer stabilen Basislinie steigt das Signal durch Bindung an der Oberfläche nach der Injektion an und erreicht ein neues Gleichgewicht. Nach Injektionsstopp beginnt die Dissoziationsphase und das Signal nimmt ab. Dauert die Dissoziation zu lange (durch stark bindende Moleküle), erfolgt ein Desorptionsschritt, bevor weitere Messungen stattfinden können.

Mithilfe der SPR wurde untersucht, inwieweit Aha1, welches an AQP2-Vesikeln detektiert wurde (Vorergebnisse des FMP Berlin, AG Klusmann, 1.6), an die Vesikellipide gebunden vorliegen könnte. Dazu wurden die Liposomen aus PC und PE mit 10xHisAha1 inkubiert. Abbildung 4.9 A zeigt den Verlauf einer Messung von 10xHis-Aha1: zu Beginn (bis ca. 1225 s) ist die Basislinie für den L1-Chip bei ca. 20000 RU zu sehen. Ab 1125 s fand die Beschichtung mit Liposomen statt und das Signal erhöhte sich von 20000 auf ca. 26000 RU.

Die Abnahmen des Signals bei 2012 s und 2177 s kommen durch Zugabe von NaOH zustande. NaOH wird eingesetzt, um eventuell auftretende Lipidmultilayer zu beseitigen. Bei 2294 s wurde 10xHis-Aha1 zugegeben und das Signal erhöhte sich um 235 RU (von 26318,8 RU auf 26553,9 RU).

4 Ergebnisse

Abbildung 4.9 B zeigt außerdem den Messabschnitt der 10xHis-Aha1 Zugabe genauer. Deutlich zu sehen ist der typische Kurvenverlauf einer Bindung in der SPR. 10xHis-Aha1 bindet also unter diesen Bedingungen an Liposomen. Der Abfall der Kurve ab 2536 s entstand durch den Desorptionsschritt mittels NaOH.

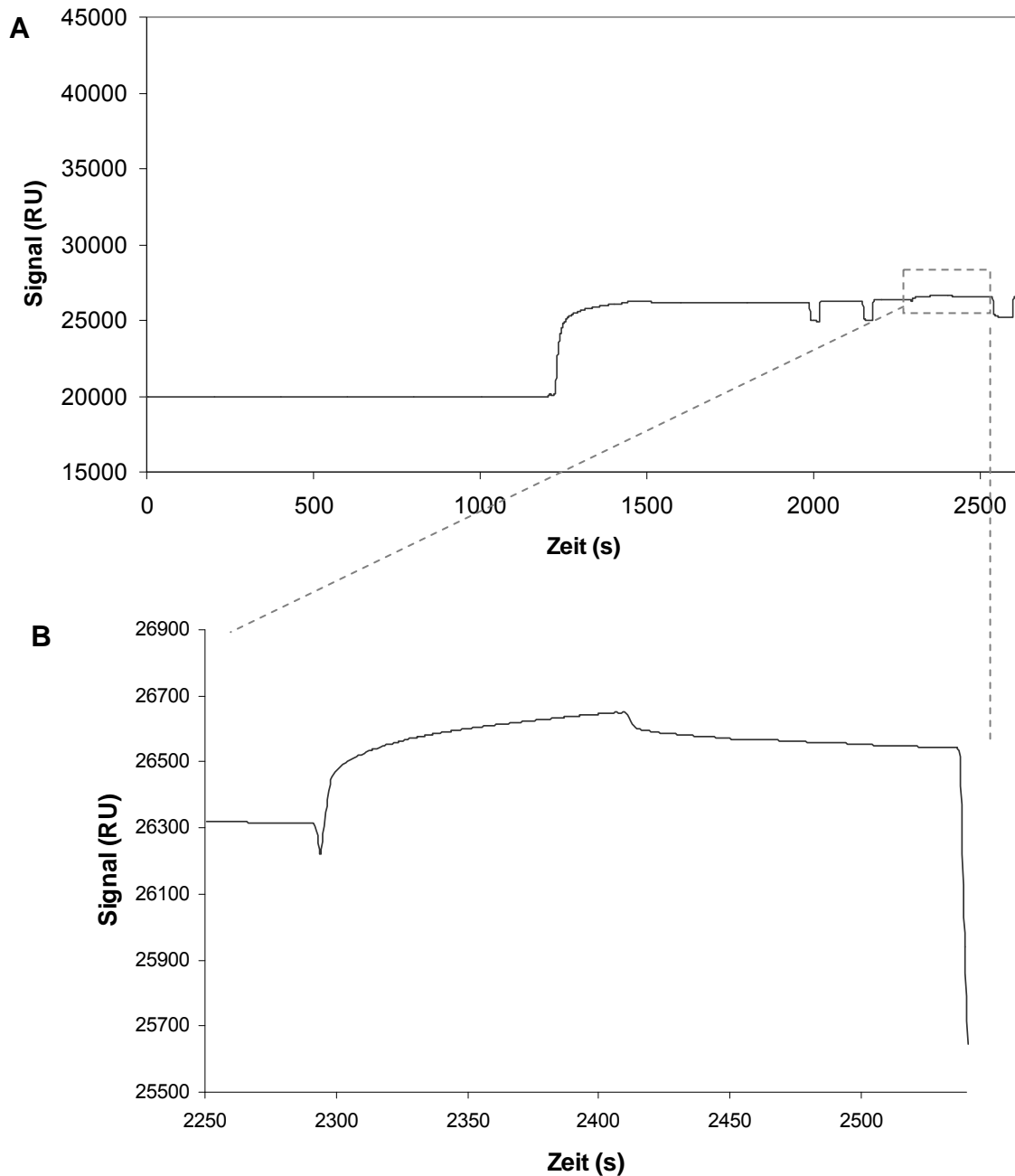


Abbildung 4.9: Oberflächenplasmonresonanzmessung. A: Sensogramm der Biacore-3000-Messung von 10xHis-Aha1 über einem mit Liposomen aus Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE) (8:2 w/w) beschichteten L-1-Chip, Flussrate: 10 $\mu\text{l}/\text{min}$, markiert: Bereich des Ausschnittes in B; B: Ausschnitt der Injektion von 10xHis-Aha1 bei selbiger Messung.

4.2 Einfluss von Aha1 auf das intrazelluläre *Trafficking* von AQP2 - Untersuchungen nach RNA-Interferenz

RNA-Interferenz

RNA-Interferenz ist ein gut untersuchter natürlicher Mechanismus zur Abwehr von Viren, Kontrolle von Transposons und posttranslationaler Regulation (Zamore *et al.* 2001, Tuschl 2001). Entdeckt in Pflanzen (Napoli *et al.* 1990) wurde dieser Mechanismus zu einem wertvollen Werkzeug in genomischen Untersuchungen an *C. elegans*, *D. melanogaster* und Pflanzen. Dieser Mechanismus beruht auf der Reaktion der Zelle auf doppelsträngige RNA.

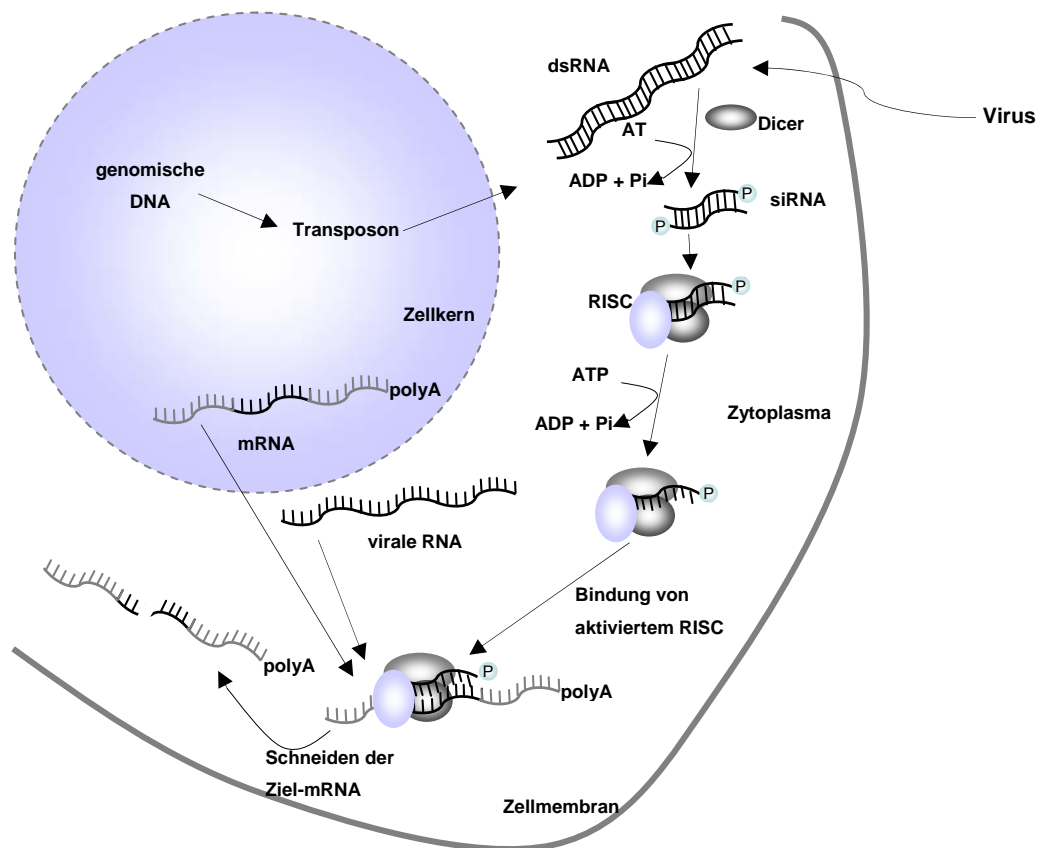


Abbildung 4.10: Schema der durch dsRNA induzierten Kaskade. Endo- oder exogene doppelsträngige RNA (dsRNA) wird durch Dicer (eine Helikase) in kurze phosphorylierte RNA (siRNA) zerschnitten und anschließend in RISC (RNA induced silencing complex) eingebaut. Dort entwunden und zum Einzelstrang abgebaut, bildet sie den „Köder“ für komplementäre RNA-Einzelstränge. Diese können mRNA oder virale Einzelstrang-RNA sein. ATP=Adenosintriphosphat, siRNA=small interfering RNA.

Abbildung 4.10 zeigt schematisch den Ablauf der RNA-Interferenz innerhalb lebender Zellen. Doppelsträngige RNA wird in der Zelle durch eine Helikase (Dicer) in kurze (21 bp) sogenannte siRNA (*small interfering RNA*) geschnitten und phosphoryliert. Diese siRNA wird in den Proteinkomplex RISC (*RNA induced silencing complex*) integriert und dort entwunden. Einer der Stränge wird durch eine Endonuklease zerschnitten und in RISC verbleibt eine Einzelstrang-RNA und bindet mit dem Proteinkomplex den sogenannten aktivierten RISC. Der aktivierte Komplex wird nun komplementär Einzelstrang-RNA binden. So können virale RNA, RNA-Transposons oder mRNA in verschiedenen Zellkompartimenten von RISC gebunden werden. Die gebundenen Einzelstränge unterliegen dem gleichen Mechanismus, welcher zur Aktivierung von RISC führte und werden zerschnitten. Dies führt zum Abbau viraler RNA, vermutlich auch zur Reduktion von Transposon-Aktivität und kann auf RNA-Ebene die Proteinbiosynthese verringern. Der Einsatz von RNAi war einige Zeit auf Pflanzen, *C. elegans* und *D. melanogaster* beschränkt, denn die Nutzung von dsRNA führte in Säugerzelllinien zum Zelltod. Erst mit der Entdeckung, dass künstliche RNA-Moleküle - siRNA-Oligonukleotide - ebenfalls RNAi auslösen ohne allerdings Zelltod auszulösen (Elbashier *et al.* 2001, Caplen *et al.* 2001), eröffnete das Feld auch für Säugerzelluntersuchungen. Seither wird RNAi für funktionelle Genomanalysen eingesetzt und hat die antisense-Technologie in vielen Aspekten ersetzt. Um funktionelle Untersuchungen zu einem Protein durchzuführen, ist es von Vorteil, ein System ohne dieses Protein zu etablieren. In Mäusen kann ein *Knockout* des für das Protein kodierenden Gens erzeugt werden. Dies ist ein langwieriger Prozess und nicht in jedem Labor durchführbar. Labortierhaltung und -handhabung unterliegen strengen Richtlinien. Zelllinien von Säugetieren wiederum lassen sich leicht kultivieren, bieten aber keine Möglichkeit eines *Knockouts*. Hier kann RNAi eingesetzt werden, um durch Reduktion des Proteins eine Aussage zu seiner Funktion zu erhalten.

Da die rein proteinbiochemischen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zu keiner weiteren Verifizierung der Hinweise aus den Vorarbeiten führten, wurde der funktionelle Aspekt von Aha1 in den Fokus der Experimente gerückt. RNAi, durch siRNA-Oligonukleotide induziert, bot die ideale Möglichkeit, um an den im Rahmen dieser Arbeit im Arbeitskreis etablierten Zellkulturen HEK-293 und MDCK-II die Auswirkungen eines Aha1-*Knockdown* zu untersuchen.

4.2.1 Einschätzung der Transfektionseffizienz

Um die Transfektionseffizienz für siRNA-Oligonukleotide und Plasmid-DNA abzuschätzen, wurden Zellen mit Cy3-markierten siRNA-Oligonukleotiden oder GFP kodierenden Plasmiden transient transfiziert und mittels konfokaler Laserscanmikroskopie (3.4.9) analysiert.

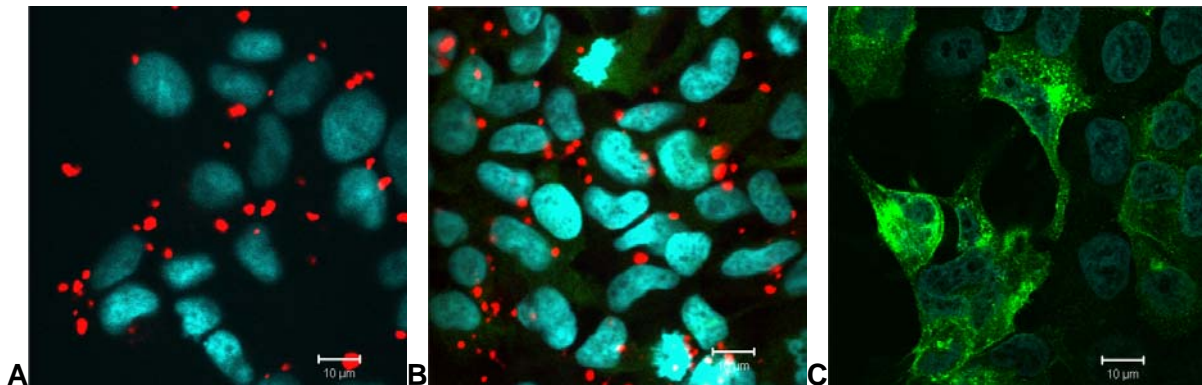


Abbildung 4.11: konfokale Laserscanaufnahmen von transfizierten HEK-293-Zellen. A und B: HEK-293-Zellen transient transfiziert mit Cy3-markierter siRNA, in rot die siRNA zu erkennen. C: HEK-293-Zellen transient transfiziert mit pIRESmAQP2wt (grün: mAQP2wt). Zellkernfärbung: DAPI

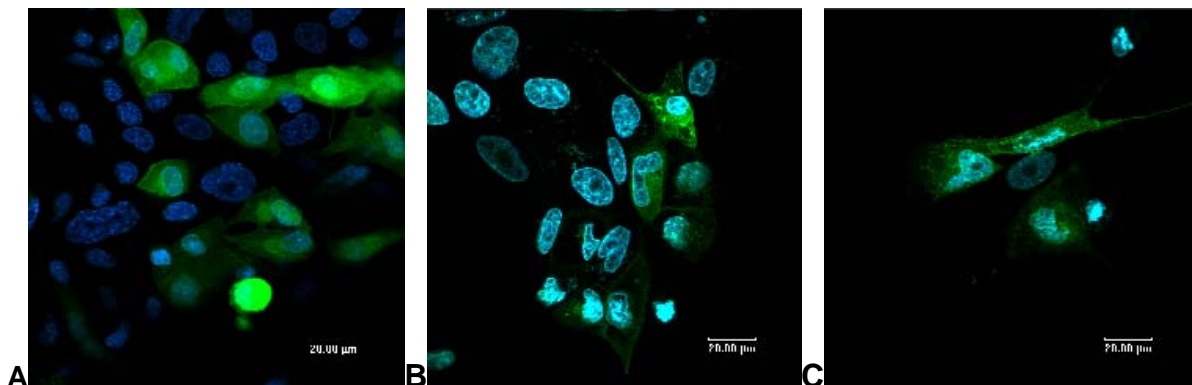


Abbildung 4.12: konfokale Laserscanaufnahmen von transfizierten MDCK-II-Zellen. A: MDCK-II-Zellen transient transfiziert mit pmax-FP-N-Green (grün: GFP). B: MDCK-II-Zellen transient transfiziert mit pIRESneoEGFPmAQP2wt (grün: mAQP2wt). C: MDCK-II-Zellen transient transfiziert mit pIRESneoEGFPmAQP2-S256D (grün: mAQP2-S256D). Zellkernfärbung: DAPI

Die exemplarischen Abbildungen 4.11 und 4.12 zeigen, dass sowohl in HEK-293-, als auch MDCK-II-Zellen ausreichende Transfektionseffizienz vorlag. siRNA-Oligonukleotide konnten in konfokalen Laserscans in jeder Zelle detektiert werden, Plasmid-DNA nach Versuchsoptimierung in HEK-293-Zellen in ca. 20 % und in

MDCK-II in ca. 10 bis 15 % aller Zellen. Plasmid-DNA-Transfektion gilt als komplex und besonders in MDCK-II schwer durchzuführen und die Transfektionsrate liegt häufig nur bei 6 %. Mit den im Rahmen dieser Arbeit erzielten Transfektionsraten war eine gute bis sehr gute Effizienz erreicht.

4.2.2 siRNA-Oligonukleotide

Um die RNAi-Technik erfolgreich anwenden zu können, mussten siRNA-Oligonukleotide eingesetzt werden, deren Sequenz und Beschaffenheit nachweisbar die Unterdrückung der Neuexpression des Zielproteins Aha1 erlaubte. Für die vorliegende Arbeit wurden insgesamt drei siRNA-Kandidaten der Firmen MWG, Invitrogen und Dharmacon getestet.

siRNA Zielsequenzen sollten bestimmte Merkmale erfüllen (Elbashir *et al.* 2002): optimalerweise liegen sie 75-100 bp hinter dem Startkodon des Gens des Zielproteins, sie sollen einen GC-Gehalt von 50 % besitzen und im besten Fall der Sequenz AA(19N)TT entsprechen. N steht dabei für ein beliebiges Nukleotid. Firmen, welche siRNA-Oligonukleotide vertreiben, bieten inzwischen die Design-Übernahme an und haben - basierend auf den einfachen Vorgaben - komplexe Algorithmen entwickelt, um die optimale Zielsequenz zu ermitteln. Die in dieser Arbeit verwendeten siRNA-Oligonukleotide wurden basierend auf Elbashir *et al.* 2002 (siRNA 1&2 der Firma Dharmacon), Holmes *et al.* 2008 (siRNA holmes der Firma MWG) und den Algorithmen der Firma Invitrogen (Oligo 1, Oligo 2 und Oligo 3) erstellt. Für die Überprüfung des Aha1-Knockdown wurden optisch konfluente HEK-293- und MDCK-II-Zellen mit siRNA-Kandidaten transient transfiziert und kultiviert. Nach 24 bzw. 48 Stunden wurden die Zellen lysiert und nach Auftrennung durch SDS-PAGE in *Western-blotting* auf Aha1-spezifische Signale untersucht.

Obwohl siRNA grundsätzlich mit hoher Spezifität die Expression des Zielproteins herunterreguliert, können mitunter durch die siRNA-Behandlung weitere Proteine in ihrer Expression beeinflusst werden (*Off-target* Effekte) (Hannon und Rossi 2004, Huppi *et al.* 2005). Exemplarisch werden deshalb vom Zielprotein verschiedene Proteine auf ihre Expression hin getestet. In dieser Arbeit wurde GAPDH als Marker für *Off-target* Effekte und den allgemeinen Zellzustand detektiert. GAPDH ist ein *housekeeping* Protein, welches in hohen Konzentrationen in nahezu jedem Zelltyp vorhanden ist. Die Effektivität der siRNA auf Aha1 wurde mittels *Western-blotting*

überprüft, und mit der in Zellen, welche mit unspezifischer (keine RNAi auslösend) Kontroll-siRNA behandelt wurden, verglichen.

Nachfolgend sind Ergebnisse der verschiedenen siRNA-Experimente und deren densitometrische Auswertung mittels Lumianalyst (Roche) dargestellt.

siRNA-Oligonukleotide 1&2

MDCK-II-Zellen wurden mit 30 nM siRNA 1&2 oder Kontroll-siRNA transient transfiziert und 24, 48 bzw. 72 Stunden nach der Transfektion lysiert. Die Proteine wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und im *Western-blotting* Aha1 detektiert. Abbildung 4.14, 4.15 und 4.16 zeigen die Signale für Aha1 und GAPDH im zeitlichen Verlauf. In Abbildung 4.17 sind die densitometrischen Auswertungen der Signale für Aha1 und GAPDH dargestellt. Die stärkste Verringerung der Aha1 Expression ist für 24 h nach der Transfektion zu sehen. Zu diesem Zeitpunkt war die Aha1 Expression auf 32 % der mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen reduziert. 48 h nach der Transfektion stieg die Aha1-Menge auf 65 % der mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen und 72 h nach der Transfektion war kein *Knockdown* mehr zu beobachten. GAPDH blieb nahezu unbeeinflusst.

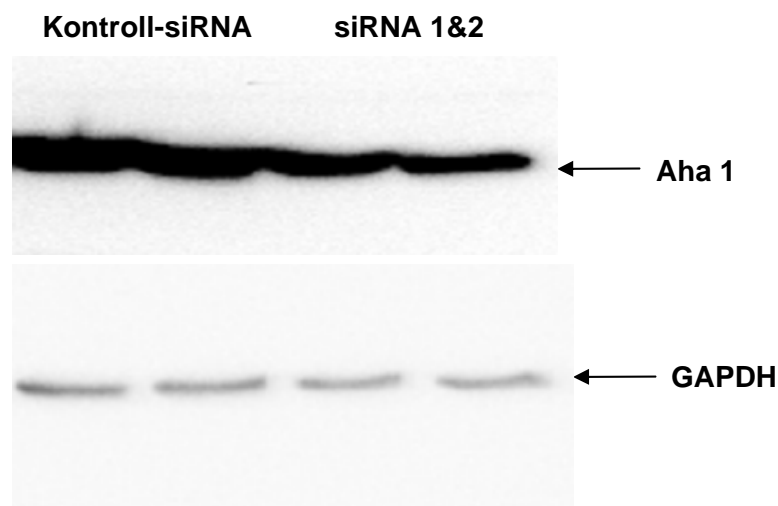


Abbildung 4.14: Knockdown von *Aha1* durch transiente Transfektion von MDCK-II-Zellen mit 30 nM siRNA 1&2. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und per Western-blotting *Aha1* detektiert (5 µg Gesamtprotein/Tasche).

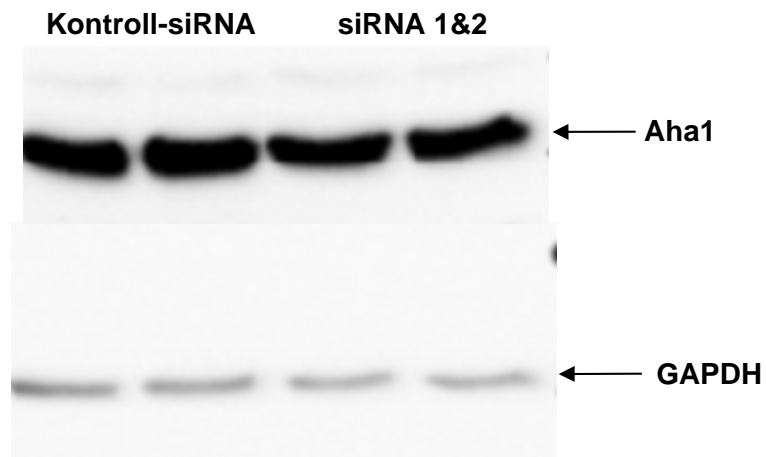


Abbildung 4.15: Knockdown von *Aha1* durch transiente Transfektion von MDCK-II-Zellen mit 30 nM siRNA 1&2. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und per Western-blotting *Aha1* bzw. *GAPDH* detektiert (5 µg Gesamtprotein/Tasche).

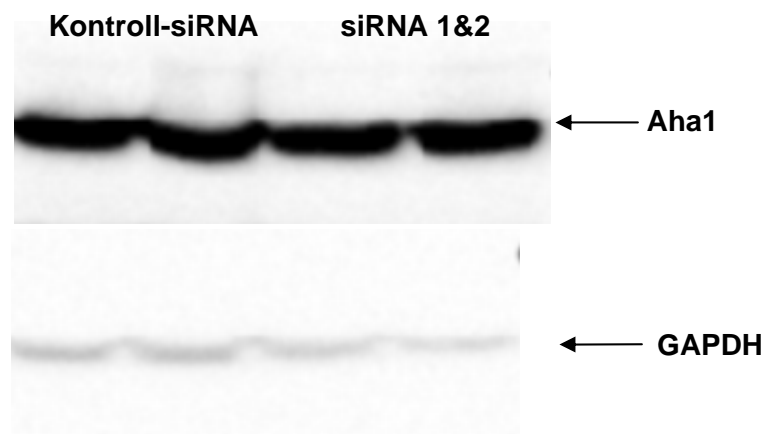


Abbildung 4.16: Knockdown von *Aha1* durch transiente Transfektion von MDCK-II-Zellen mit 30 nM siRNA 1&2. 72 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und per Western-blotting *Aha1* bzw. *GAPDH* detektiert (5 µg Gesamtprotein/Tasche).

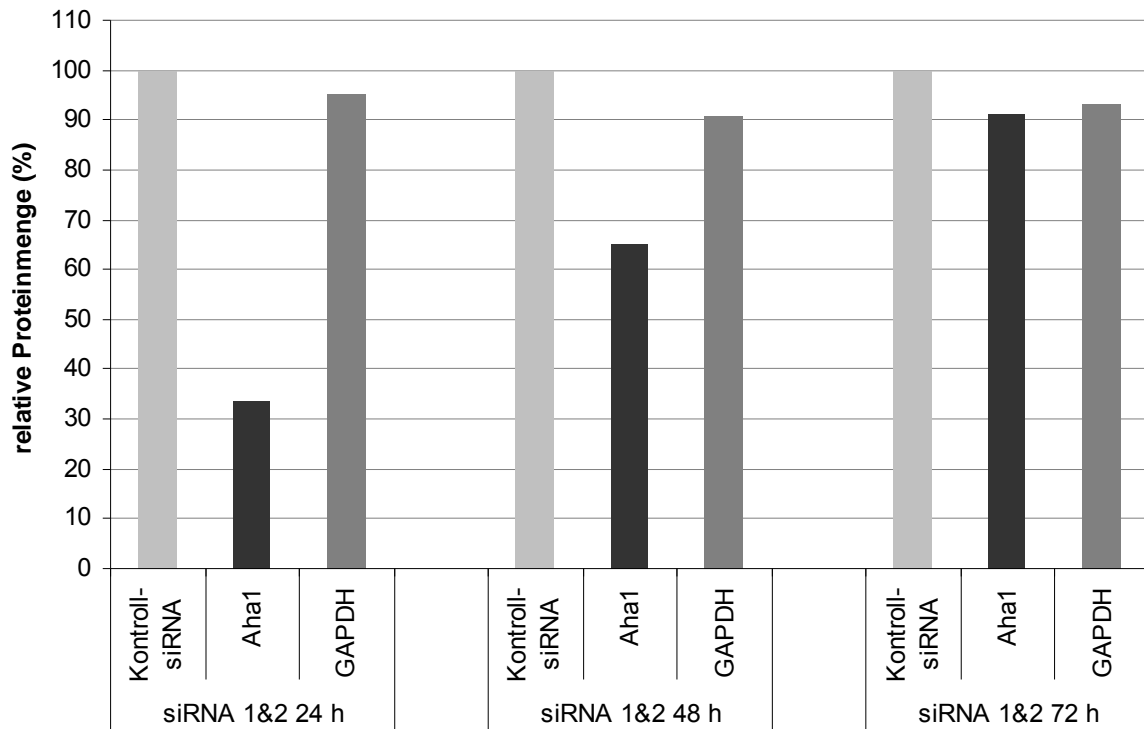


Abbildung 4.17: Übersicht über den zeitlichen Verlauf des Knockdowns von Aha1. Zusammenfassung der densitometrischen Auswertungen der Daten aus den Abbildungen 4.14, 4.15. und 4.16 mittels Lumianalyst (Roche), Aha1-Menge in Zellen, welche mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden = 100 % (n=1).

Nach den Ergebnissen für siRNA 1&2 24 h, 48 h und 72 h nach der transienten Transfektion mit siRNA wurden alle weiterführenden Experimente 24 h nach der Transfektion mit siRNA durchgeführt. In Abbildung 4.18 sind 14 unabhängige Experimente zu siRNA 1&2 zusammenfassend densitometrisch ausgewertet. Verwendet wurden ausschließlich die Experimente, welche unter gleichen Bedingungen durchgeführt wurden (30 nM siRNA, RNAi-Überprüfung 24 h nach Transfektion).

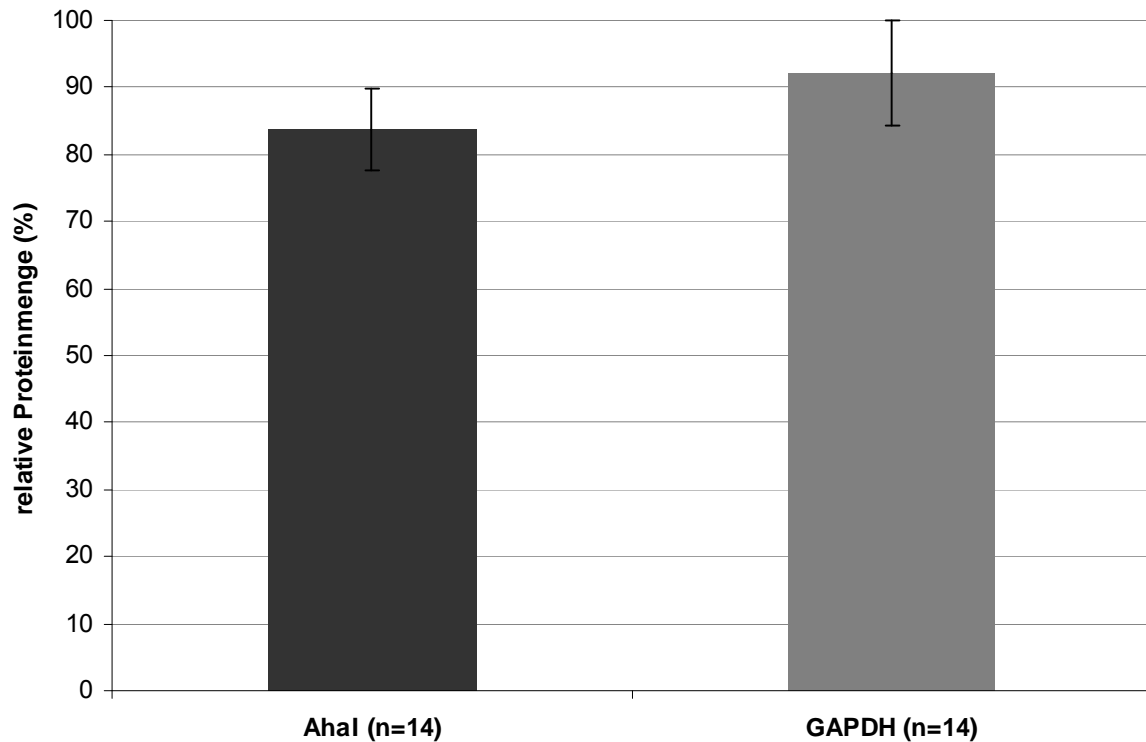


Abbildung 4.18: Knockdown von *Aha1*: Mittelwerte der relativen Proteinmengen (Kontroll-siRNA = 100%) von *Aha1* und GAPDH 24 h nach Transfektion von 30 nM siRNA 1&2 gegen *Aha1*. Densitometrisch anhand von Western-blotting ermittelt. Die Fehlerbalken zeigen den S.E.M. (n=14).

siRNA-Oligonukleotide Oligo 1, Oligo 2 und Oligo 3

MDCK-II-Zellen wurden mit 30 nM siRNA Oligo1-3 oder Kontroll-siRNA transient transfiziert und 24 Stunden nach der Transfektion lysiert. Die Proteine wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und im *Western-blotting* *Aha1* detektiert. Abbildung 4.19 A und B zeigen exemplarisch die Signale für *Aha1* und GAPDH. In Abbildung 4.20 sind die densitometrischen Auswertungen der Signale für *Aha1* aus 14 unabhängigen Experimenten dargestellt. Die stärkste Verringerung der *Aha1* Expression ist für Oligo 3 zu sehen. Diese siRNA reduzierte die *Aha1* Expression auf 52 % der mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen. Oligo 2 konnte die *Aha1* Expression verglichen mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen auf 59 % reduzieren und Oligo 3 auf 72 %. GAPDH blieb nahezu unbeeinflusst.

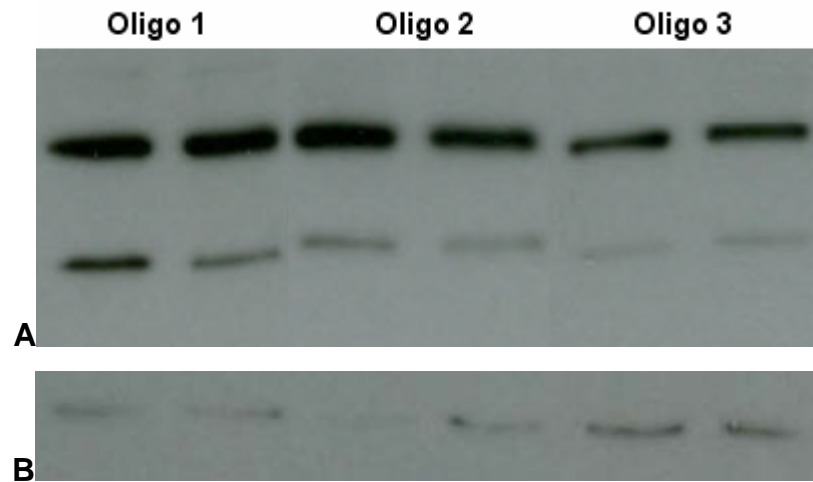


Abbildung 4.19: Knockdown von *Aha1* mit siRNA Oligo 1-3. MDCK-II-Lysate wurden 24 h nach Transfektion mit 30 nM siRNA per SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-blotting detektiert. A: *Aha1* detektiert, B: GAPDH detektiert, jeweils Doppelbestimmung (5 µg Gesamtprotein/Tasche).

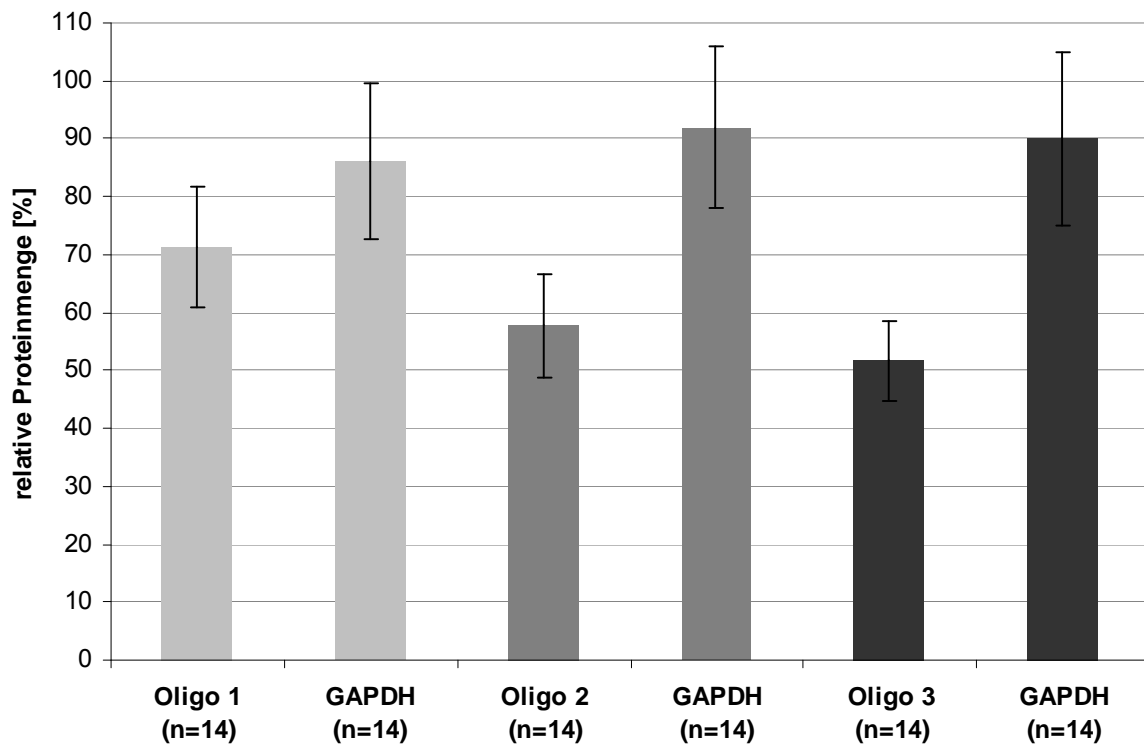


Abbildung 4.20: Knockdown von *Aha1*: Mittelwerte der relativen Proteinmengen (*Aha1*-Menge in Zellen, welche mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden = 100%) von *Aha1* 24 h nach Transfektion von 30 nM siRNA Oligo 1-3 gegen *Aha1*. Densitometrisch anhand von Western-blotting ermittelt. Die Fehlerbalken zeigen den S.E.M. (n=14).

siRNA-Oligonukleotid holmes

MDCK-II-Zellen wurden mit 30 nM siRNA holmes oder Kontroll-siRNA transient transfiziert und 24 Stunden nach der Transfektion lysiert. Die Proteine wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und im *Western-blotting* Aha1 detektiert. Abbildung 4.21 zeigt exemplarisch die Signale für Aha1 und GAPDH. In Abbildung 4.22 sind die densitometrischen Auswertungen der Signale für Aha1 und GAPDH aus 14 unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Expression von Aha1 konnte durch siRNA holmes nur auf 77 % reduziert werden. GAPDH blieb nahezu unbeeinflusst.

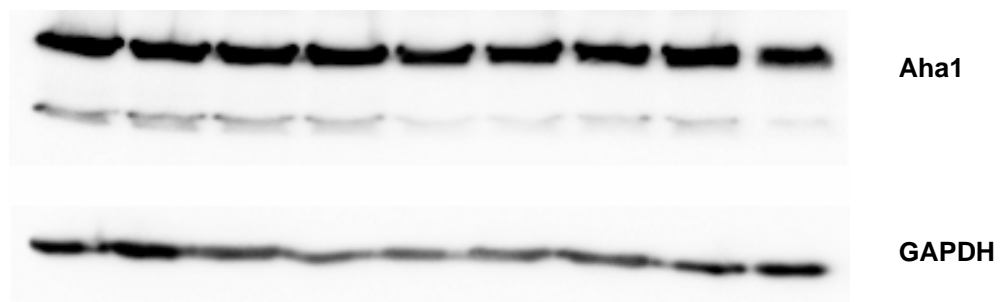


Abbildung 4.21: Knockdown von *Aha1* mit siRNA holmes. MDCK-II-Lysate wurden 24 h nach Transfektion mit 30 nM siRNAe per SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit α -Aha1 detektiert (5 μ g Gesamtprotein/Tasche).

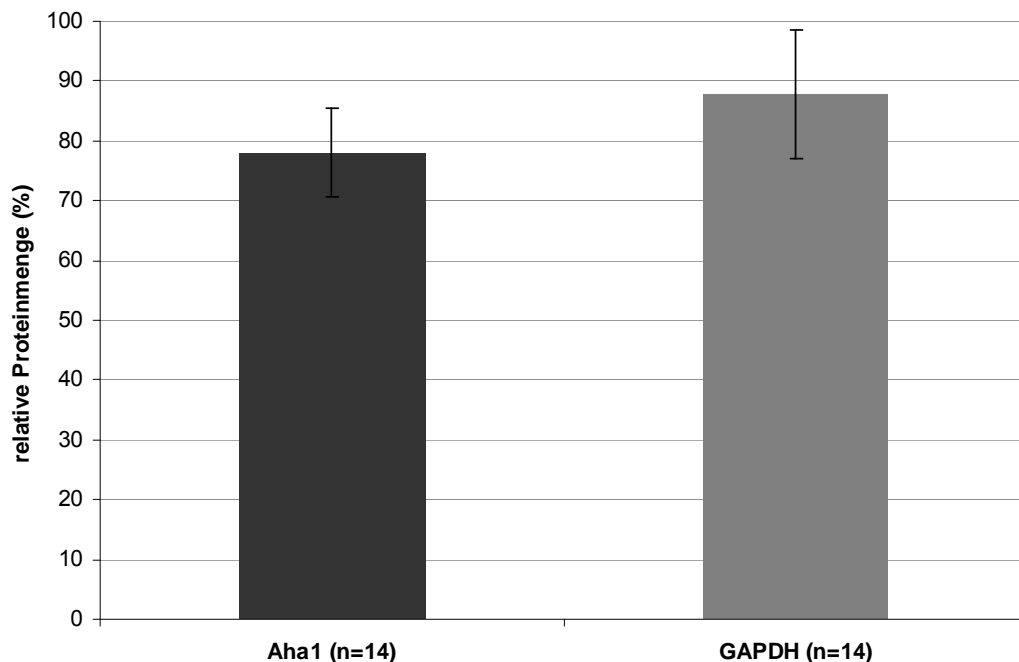


Abbildung 4.22: Knockdown von *Aha1*: Mittelwerte der relativen Proteinmengen (Kontroll-siRNA = 100%) von *Aha1* und GAPDH 24 h nach Transfektion von 30 nM siRNA holmes gegen *Aha1*. Densitometrisch anhand von Western-blotting ermittelt. Die Fehlerbalken zeigen den S.E.M. (n=14).

Vergleich der siRNA-Oligonukleotide

Abbildung 4.23 zeigt zusammenfassend den *Aha1* Knockdown der verschiedenen siRNA Kandidaten. Daraus lässt sich ableiten, dass Oligo 2 und Oligo 3 verglichen mit den anderen getesteten siRNA Kandidaten die *Aha1* Expression signifikant reduzierten. Die p-Werte der Mittelwerte in zweiseitigen t-Tests (jeweils verglichen mit den Mittelwerten der GAPDH-Mengen) für die verschiedenen Oligonukleotide:

siRNA 1&2	0,4205
siRNA Oligo 1	0,4025
siRNA Oligo 2	0,0493
siRNA Oligo 3	0,0285
siRNA holmes	0,4562

Nur Oligo 2 und Oligo 3 zeigten eine signifikante Reduktion der *Aha1*-Menge. Oligo 2 reduzierte *Aha1* auf 60 %, Oligo 3 auf 50 %. Folglich wurden sie für weitere Versuche verwendet.

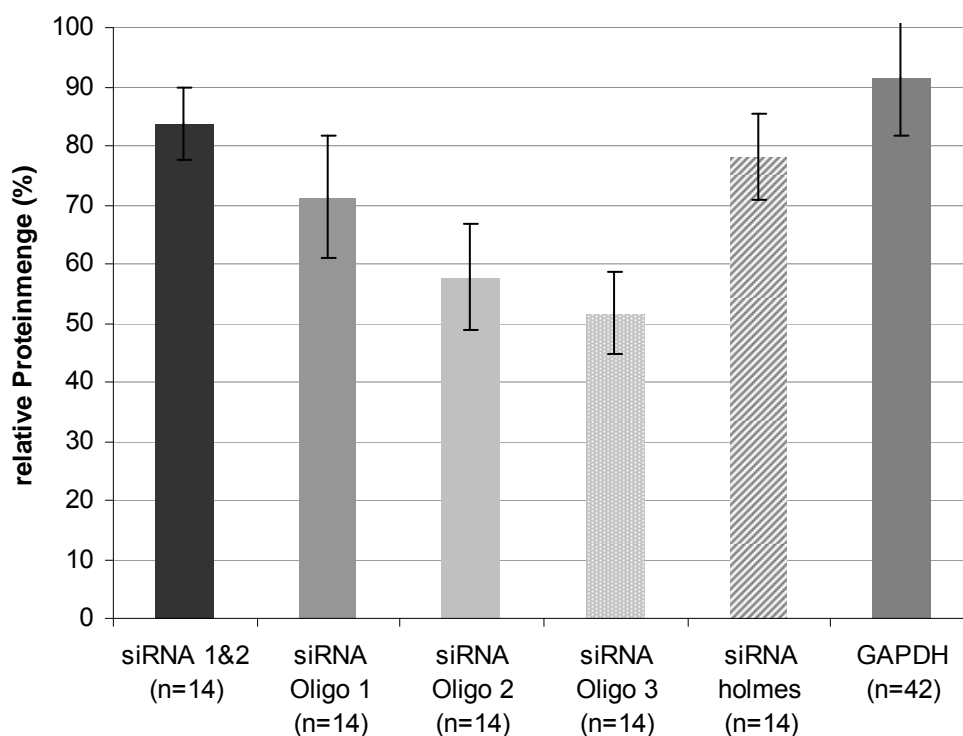


Abbildung 4.23: Knockdown von *Aha1*: Mittelwerte der relativen Proteinmengen (Kontroll-siRNA = 100%) von *Aha1* im MDCK-II-Zellen 24 h nach Transfektion mit den verschiedenen siRNA-Kandidaten (30 nM). Die Fehlerbalken zeigen den S.E.M. (n=14).

4.2.3 ELISA

Um den Einfluss des *Aha1*-Knockdowns auf das *AQP2*-Trafficking zu untersuchen, wurden HEK-293-Zellen ohne *AQP2* und HEK-293-Zellen mit *AQP2*wt - mit einem HA-tag an einem extrazellulären loop versehen (von der Arbeitsgruppe um Enno Klusmann, FMP Berlin, zur Verfügung gestellt) - mit 30 nM siRNA Oligo 2 und Oligo 3 transient transfiziert. Die Hälfte der Zellen wurde vor der Durchführung des ELISA mit Forskolin stimuliert. Abbildung 4.24 A zeigt die quantitative Auswertung der ELISA-Signale bei 400 nm. Nach Forskolinstimulation von Zellen, welche mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden, erhöhte sich das Signal für *AQP2* in der Zellmembran auf ungefähr das 4-Fache des Basalwertes. Nach Transfektion mit siRNA Oligo 3 erhöhte sich das Signal in gleichem Maße. Bei Zellen, welche mit siRNA Oligo 2 transfiziert waren, betrug die Signalstärkeänderung nach Forskolin das 13-Fache. Die HEK-293-Zellen wurden anschließend lysiert, mit SDS-PAGE aufgetrennt und im *Western-blotting* die *Aha1*-Menge detektiert. Abbildung 4.24 B und C zeigen sowohl eines der *Western-blotting*-Resultate, als auch deren semiquantitative Auswertung. In den HEK-293-Zellen, welche im ELISA zum Einsatz kamen, wurde durch Oligo 2 siRNA die *Aha1*-Menge auf ca. 70 % und durch und Oligo 3 siRNA auf ca. 50 % reduziert.

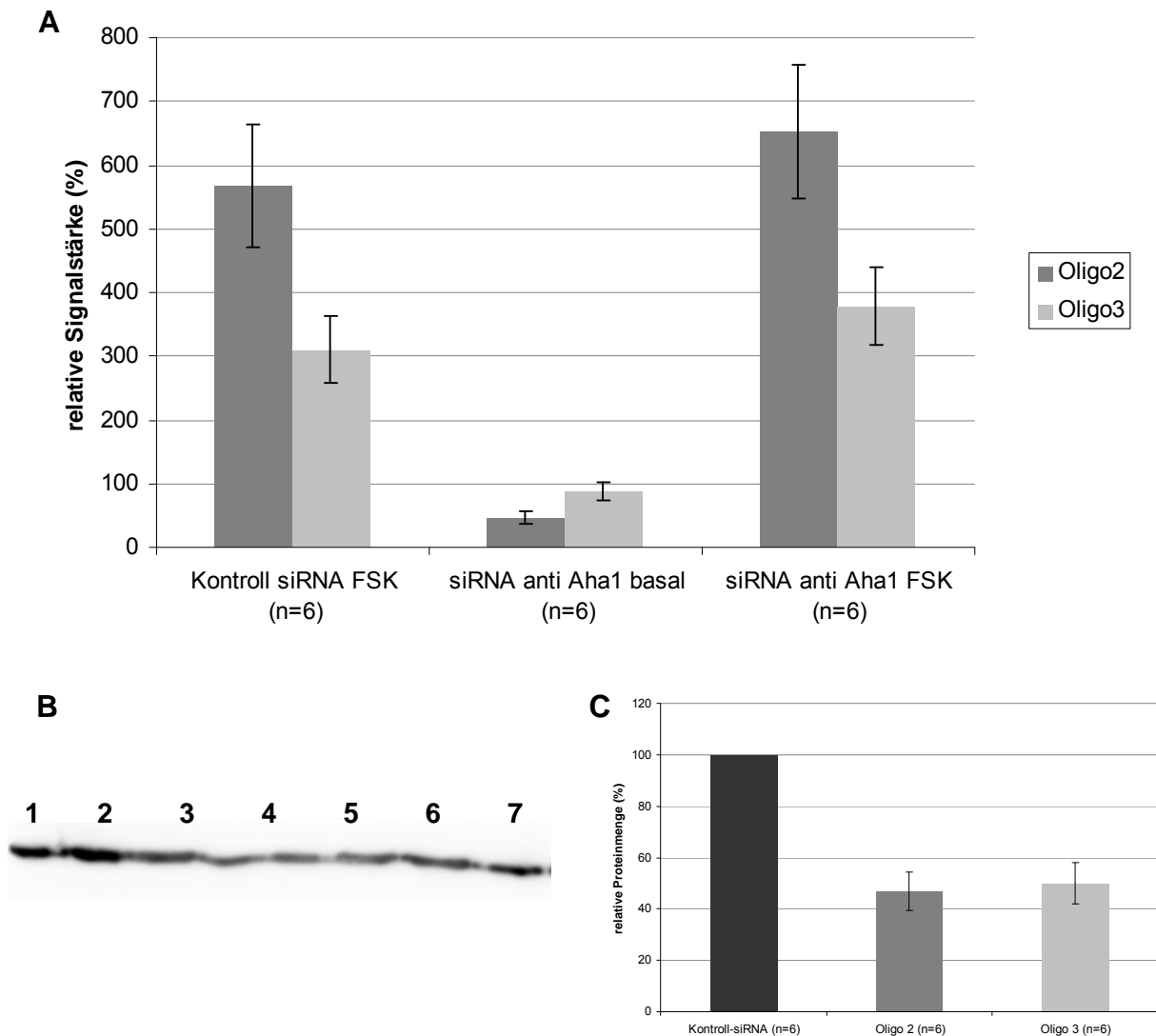


Abbildung 4.24: ELISA an HEK-293-Zellen.

A: HEK-293-Zellen, welche HA-AQP2 (HA-Epitop extrazellulär präsentiert) exprimierten, wurden mit 30 nM siRNA transfiziert (dunkelgrau: Oligo 2, hellgrau: Oligo 3). 24 h nach Transfektion wurde die Hälfte der Ansätze mit 20 μ M Forskolin für 30 min stimuliert. Der anschließende Sandwich-ELISA über diesen Zellen wurde mit einem Antikörper gegen HA durchgeführt. Signalstärke der mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen ohne Forskolinstimulation = 100 %. Gemessene Basalwerte für Zellen ohne AQP2 wurden von allen Messwerten abgezogen.

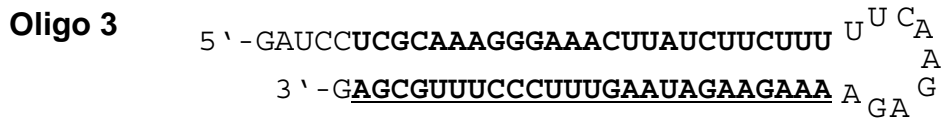
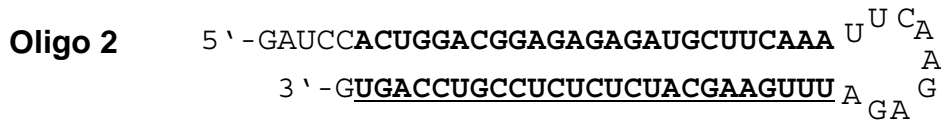
die Zellen wurden anschließend lysiert, in SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-blotting Aha1 detektiert. B: Abbildung einer Immundetektion von Aha1. 1 / 2: Zellen mit Kontroll-siRNA transfiziert, 3-5 Zellen mit Oligo 2 transfiziert, 6 / 7: Zellen mit Oligo 3 transfiziert. C: Densitometrische Auswertung des Western-blottings. Fehlerbalken zeigen den S.E.M. (n = 6).

4.2.4 siRNA-Plasmid

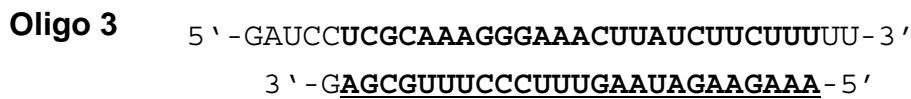
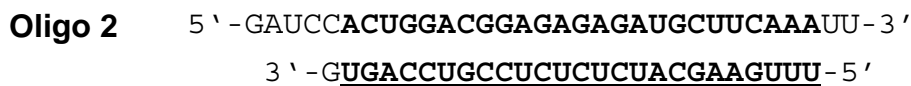
Wie in Abbildung 4.23 gezeigt, konnten nur Oligo 2 und Oligo 3 signifikant die Expression von Aha1 reduzieren (p-Wert Oligo 2 = 0,0493, p-Wert Oligo 3 = 0,0285). Die *Knockdown*-Raten dieser beiden Oligonukleotide nicht ausreichend und unter der Effizienz, welche andere Gruppen durch siRNA-Oligonukleotide erzielen konnten (Grünweller *et al.* 2003). Die transiente Transfektion mit siRNA-Oligonukleotiden bildete also keine Basis zur Untersuchung des funktionellen Einflusses von Aha1 auf das *Trafficking* von AQP2.

Da nur bei immer ähnlichem Aha1-knockdown Aussagen zur Funktion von Aha1 im AQP2-*Trafficking* gemacht werden können, wurde der Versuch unternommen, eine siRNA stabil in MDCK-II-Zellen exprimieren zu lassen. Neben der Nutzung von siRNA zur Induktion von RNAi wurden im Laufe der Weiterentwicklung der siRNA-Technologie Ergebnisse zu Plasmiden veröffentlicht, welche funktionelle siRNA oder shRNA (*short hairpin* RNA) in Säugerzellen exprimieren (Sui *et al.* 2002, Lee *et al.* 2002, Paul *et al.* 2002, Paddison *et al.* 2002, Brummelkamp *et al.* 2002). siRNA exprimierende Plasmide bieten den Vorteil, die Expression von Zielgenen für Wochen oder gar Monate zu beeinflussen (Brummelkamp *et al.* 2002), während siRNA-Oligonukleotide maximal 10 Tage Wirkung zeigen. Erzeugt man mit siRNA exprimierenden Plasmiden eine stabile Zelllinie, lässt sich dieser Effekt noch verlängern und Experimente mit Zellen gleicher, stabiler und lang anhaltender siRNA-Expression durchführen.

In dieser Arbeit wurde *pSilencer*TM4.1-CMVneo (Vektorkarte Abb. 2.5) verwendet. Dieser trägt eine Neomycin-Resistenzkassette und bietet mit dem CMV-Promotor (aus dem Cytomegalie-Virus) vor der *multiple cloning site* eine hohe Expressionsrate. In *pSilencer*TM4.1-CMVneo wurden *inserts*, welche für shRNA kodieren ligiert (3.1.7 und Abb. 3.2). Deren Sequenz entsprach den Vorgaben des Herstellers kombiniert mit den Sequenzen der erfolgreichsten siRNA-Oligonukleotide (Oligo 2 und Oligo 3, Invitrogen, Abb. 4.25). Wird shRNA in den Zellen exprimiert, wird diese durch Dicer in siRNA umgewandelt (Abb. 4.25) und löst RNAi aus (Abb. 4.10).



A



B

Abbildung 4.25: A: aus den inserts in pSilencer™4.1-CMVneo gebildete shRNA für Oligo2 und Oligo3. B: die durch Dicer innerhalb der Zelle gebildeten siRNA für Oligo2 und Oligo3. Unterstrichen jeweils die Aha1-mRNA antisense-Sequenz.

MDCK-II-Zellen wurden mit Plasmid-DNA (50 pM) transfiziert und nach 24 h Selektionsdruck durch G418 (400 µg/ml Medium) unterworfen. Transfektion mit linearisierter Plasmid-DNA führte in keinem der Experimente zu einem Überleben der Zellen unter Selektionsdruck. Einzig mit zirkulärer Plasmid-DNA transfizierte MDCK-II-Zellen bildeten unter Selektionsdruck Klonkolonien. Sichtbare Kolonien wurden gepickt und vereinzelt. Nachdem diese Kolonien die Fläche einer 10 cm Petrischale optisch konfluent bewachsen, wurden die Zellen passagiert und ein Teil per SDS-PAGE und *Western-blotting* mit untransfizierten MDCK-II-Zellen bezüglich der Aha1-Menge verglichen. Für Oligo 2 und Oligo 3 wurden stark reduzierte Aha1-Mengen detektiert (Abb. 4.26), GAPDH blieb nahezu unbeeinflusst - einzig der erhöhte Stress der Zellen durch das Selektionsmedium ist in einer leichten Erhöhung des GAPDH-Levels wiederzufinden.

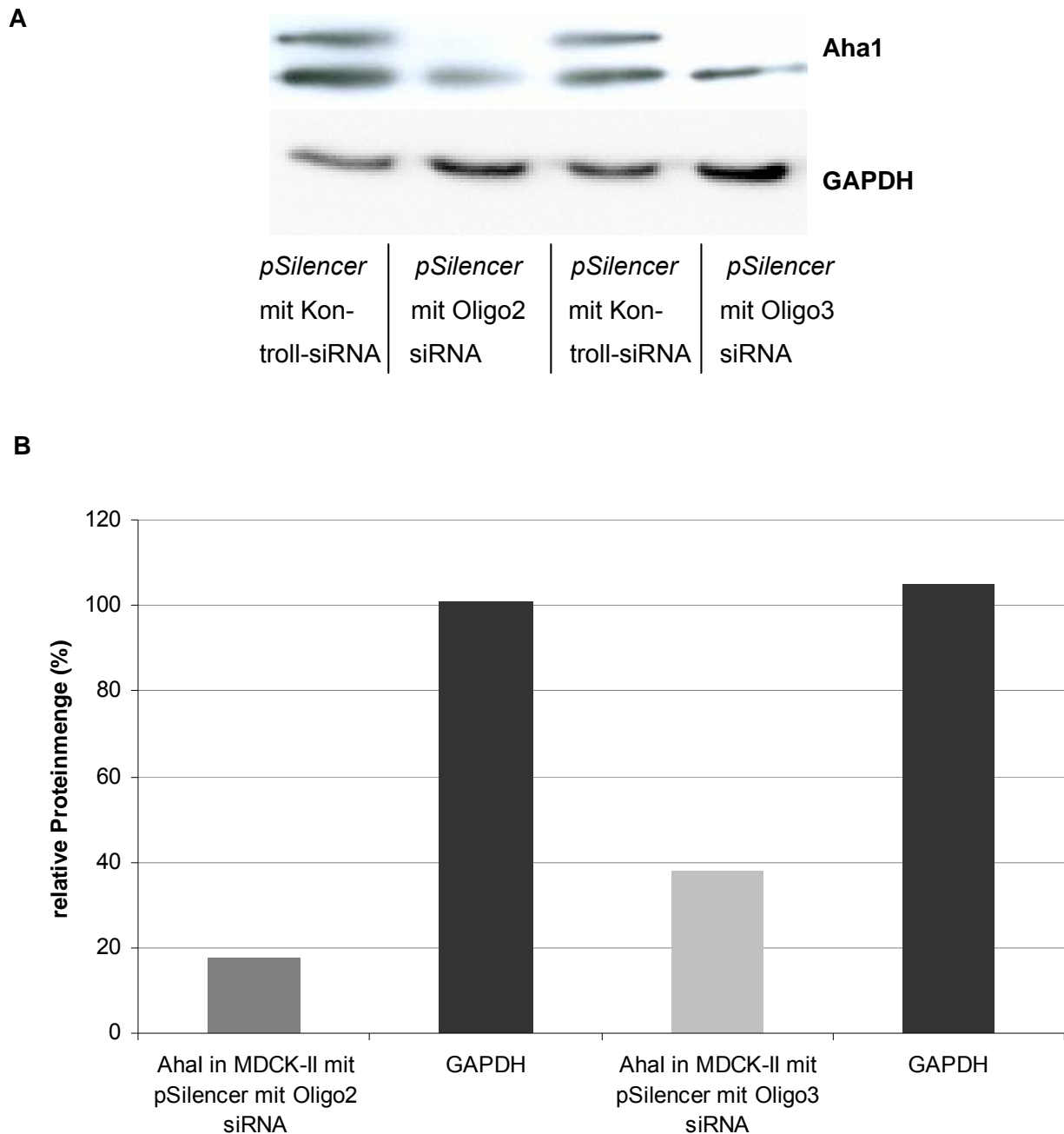


Abbildung 4.26: Knockdown von *Aha1* durch stabile Transfektion. A: MDCK-II-Zellen 6 Wochen nach der Transfektion mit pSilencer™4.1-CMVneoOligo2 und pSilencer™4.1-CMVneoOligo3 lysiert, mit SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-blotting *Aha1* bzw. *GAPDH* detektiert. (5 µg Gesamtprotein/Tasche); B: relative Proteinmengen (Kontroll-siRNA = 100%) von *Aha1* densitometrisch anhand des Western blots ermittelt (n = 1).

Diese erfolgreich transfizierten Zellen, welche einen starken *Knockdown* des *Aha1* um 85 % zeigten, wurden - nach einer Phase ohne Selektionsantibiotikum - weiter unter Selektionsdruck kultiviert. Die Kultivierungsphase ohne Selektionsdruck sollte gewährleisten, dass Zellen, welche das Plasmid nicht in ihr Genom integriert hatten,

das Plasmid verlieren und bei erneutem Einsatz von G418 abgetötet werden. Dies führt zu einer Population von Zellen, welche das Plasmid in Ihr Genom integriert haben. Um diese Zellen in Immunofluoreszenzversuchen zum *AQP2-Trafficking* einzusetzen, wurden sie abschließend noch einmal mittels *Western-blotting* überprüft, damit ein *Knockdown* sicher gewährleistet war.

Die erneute Immundetektion zeigte, dass die Aha1-Menge in den Zellen wieder angestiegen war und nahezu den Level mit Kontroll-siRNA transfizierter Zellen erreichte (Abb. 4.27). Die hervorragenden *Knockdown*-Ergebnisse konnten nicht aufrechterhalten werden.

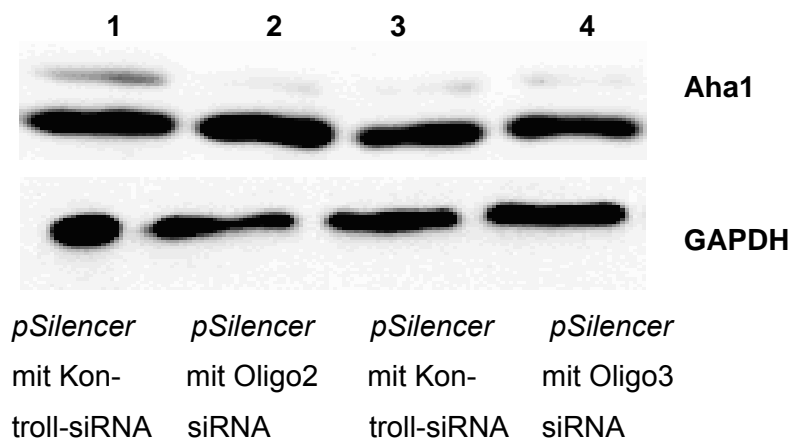


Abbildung 4.27: Knockdown von *Aha1* durch stabile Transfektion. MDCK -II-Zellen 8 Wochen nach der Transfektion mit *pSilencer*TM4.1-CMVneoOligo2 und *pSilencer*TM4.1-CMVneoOligo3 wurden lysiert, mit SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-blotting *Aha1* bzw. *GAPDH* detektiert. 1 / 3: MDCK-II-Zellen mit *pSilencer*TM4.1-CMVneo-Kontroll transfiziert, 2 / 4: MDCK-II-Zellen mit *pSilencer*TM4.1-CMVneoOligo2/3 transfiziert (5 µg Gesamtprotein/Tasche).

4.2.5 Etablierung stabil EGFPmAQP2wt und EGFPmAQP2-S256D exprimierender Zelllinien

Aufgrund der Instabilität der mit *pSilencerTM4.1-CMVneo* transfizierten Zellen im Bezug auf ihre Aha1-Expression, wurden weitere stabile MDCK-II-Zellen entwickelt. Diese sollten dauerhaft N-terminal mit EGFP-fusioniertes mAQP2wt und mAQP2-S256D exprimieren. An diesen Zellen sollte nach Transfektion mit siRNA-Oligonukleotiden die Auswirkung des Aha1 auf das *Trafficking* von AQP2 untersucht werden.

Dazu wurden die MDCK-II-Zellen mit *pIRESneoEGFPmAQP2wt* beziehungsweise *pIRESneoEGFPmAQP2-S256D* (je 50 pM) transfiziert und nach 24 h einem Selektionsdruck unterworfen. Wie schon in den Transfektionsexperimenten mit *pSilencerTM4.1-CMVneo* konnten ausschließlich mit zirkulärer Plasmid-DNA Kolonien unter Selektionsdruck durch G418 beobachtet werden. Linearisierte Plasmid-DNA führte zu einem Absterben der MDCK-II-Zellen unter Selektionsdruck. Unter Fluoreszenzanregung sichtbare Kolonien wurden gepickt und vereinzelt. Nachdem genug Zellen zur weiteren Untersuchung gebildet worden waren, wurde der Erfolg der Transfektion und Selektion mit *Western-blotting* und konfokaler Laserscanmikroskopie überprüft. Abbildung 4.28 zeigt exemplarisch Fluoreszenzaufnahmen der stabil EGFP-mAQP2wt exprimierenden Zelllinien. Deutlich ist, dass die Expression zwischen Zellen unterschiedlich stark ausgeprägt ist, doch in jeder Zelle EGFP-mAQP2wt exprimiert wird. Die Fluoreszenz zeigt EGFP-mAQP2wt punktuell über die gesamte Zelle verteilt. Diese Punkte erscheinen größer als die Fluoreszenz von transient transfiziertem mAQP2wt (Abb. 4.29), bei welchem zwar ebenfalls punktuelle Signale erkennbar waren, doch insgesamt eine feinere Verteilung des Proteins in MDCK-II-Zellen detektiert wurde. EGFP-mAQP2wt in stabil transfizierten MDCK-II-Zellen findet sich fast ausschließlich im Zytosol.

Die Aufnahmen nach Stimulation der Zellen mit 20 µM Forskolin (Abb. 4.28 A und B1 / B2) zeigen, dass EGFP-mAQP2wt in diesen MDCK-II-Zellen nicht translokalisiert wurde.

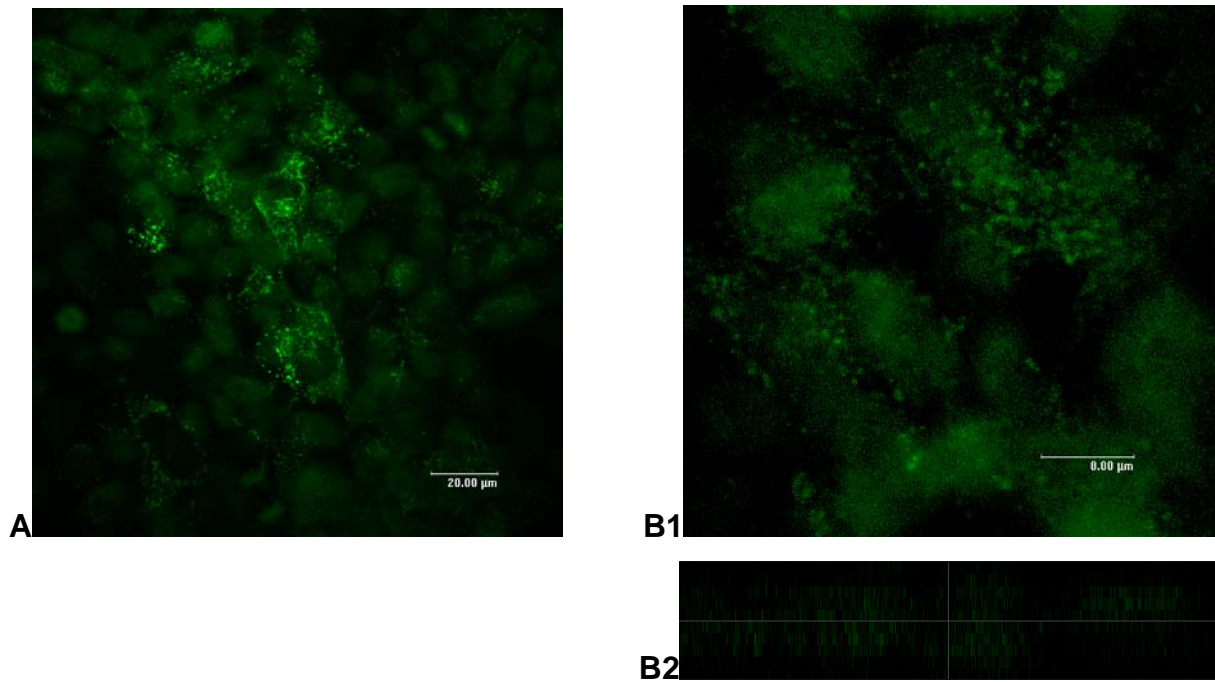


Abbildung 4.28: Konfokale Laserscan-Aufnahmen von stabil EGFP-mAQP2wt exprimierenden MDCK-II-Zellen. A Zellen unstimuliert, B: nach 30 min Stimulation mit 20 µM Forskolin, Aufnahme im 2,5x-Zoom; B2: z-Achsen-scan der Zellen aus B1. grün: EGFP-mAQP2wt.

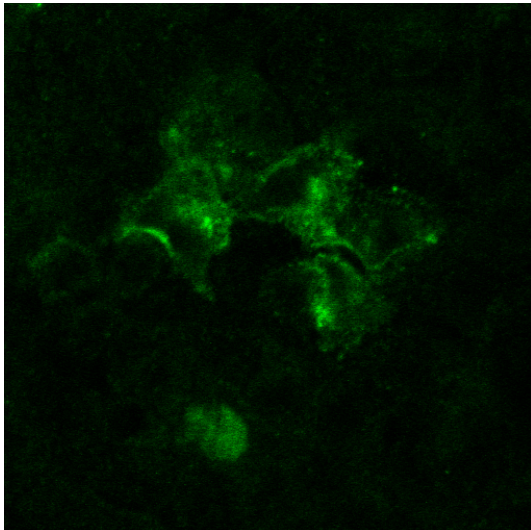
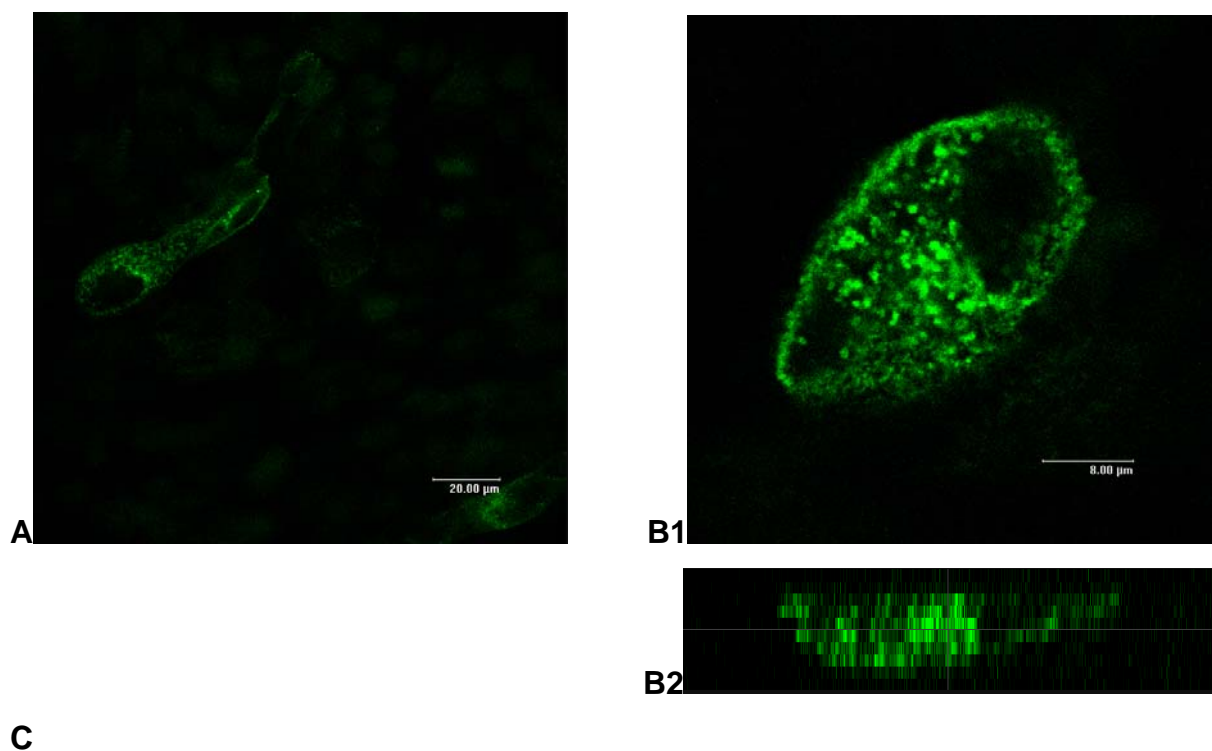


Abbildung 4.29: Konfokale Laserscan-Aufnahmen von transient mit mAQP2wt transfizierten MDCK-II-Zellen. grün: mAQP2wt.

4 Ergebnisse

Abbildung 4.30 zeigt exemplarisch Fluoreszenzaufnahmen der stabil EGFP-mAQP2-S256D exprimierenden Zelllinie. Die Nahaufnahmen zeigen die Lokalisation von EGFP-mAQP2-S256D in MDCK-II-Zellen. Die Fluoreszenz zeigt EGFP-mAQP2-S256D punktuell über die gesamte Zelle verteilt. Diese Punkte erscheinen größer als die Fluoreszenz für transient transfiziertes mAQP2-S256D (Abb. 4.32). EGFP-mAQP2-S256D in stabil transfizierten MDCK-II-Zellen findet sich fast ausschließlich im Zytosol. Besonders deutlich war jedoch - wie in den transient mit mAQP2-S256D transfizierten MDCK-II-Zellen (Abb. 4.31) - ein verstärktes Signal für mAQP2-S256D in Zellkernnähe.



C

Abbildung 4.30: Konfokale Laserscan-Aufnahmen von stabil EGFP-mAQP2-S256D exprimierenden MDCK-II-Zellen. A: Aufnahme von zwei stark EGFP-mAQP2-S256D exprimierenden MDCK-II-Zellen, umgebende Zellen exprimieren schwächer, B1: Aufnahme von zwei EGFP-mAQP2-S256D exprimierenden MDCK-II-Zellen, 2,5x Zoom B2: z-Achsen-Scan der Zellen aus B1. grün: EGFP-mAQP2wt.

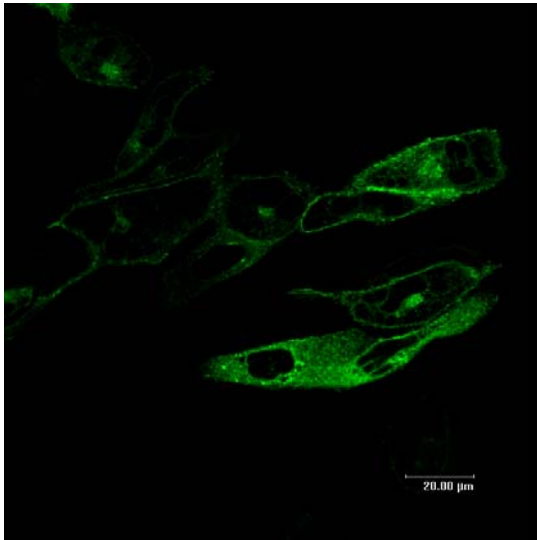


Abbildung 4.31: Konfokale Laserscan-Aufnahmen von transient mit *mAQP2-S256D* transfizierten MDCK-II-Zellen. grün: *mAQP2-S256D*.

Die EGFP-AQP2-Fusionsproteine konnten auch im *Western-blotting* nachgewiesen werden. Abbildung 4.31 zeigt die Detektion mit einem gegen AQP2 und einem gegen GFP gerichteten Antikörper. Beide Detektionen zeigten eine Bande bei ungefähr 63 kDa. Die für AQP2 im *Western-blotting* so charakteristischen Banden des glykosylierten APQ2 waren in den Zellen, welche EGP-AQP2 exprimieren, kaum mehr detektierbar.

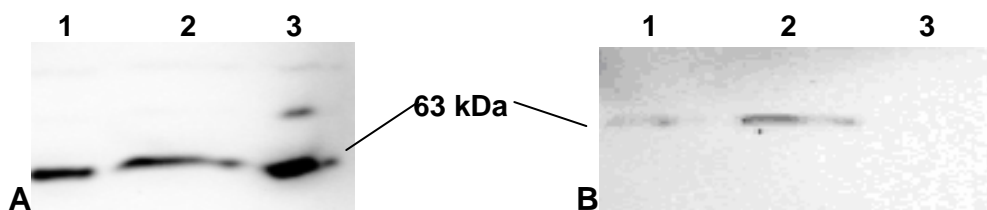


Abbildung 4.31: Western-blotting der MDCK-II-Zellen 8 Wochen nach der Transfektion mit *pIRESneo-EGFP-mAQP2wt* und *pIRESneo-EGFP-mAQP2-S256D*. Die Zellen wurden lysiert, mit SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Western-blotting AQP2 bzw. EGFP detektiert. A: AQP2-Detektion, B: EGFP-Detektion. 1: MDCK-II-Zellen mit EGFP-mAQP2wt, 2: MDCK-II-Zellen mit EGFP-mAQP2-S256D, 3: HEK-293-Zellen mit mAQP2wt ohne GFP (25 µg Gesamtprotein/Tasche).

5 Diskussion

Protein-Protein-Interaktionen oder Protein-Protein-Bindungen stellen wichtige Bindeglieder in Stoffwechselprozessen in Zellen dar. Gerade im Bereich des intrazellulären *Traffickings* wurde die Bindung oder Interaktion zwischen Proteinen erforscht und viele Ergebnisse spiegeln die enorme Bedeutung dieser Vorgänge wieder.

Intrazelluläres *Trafficking* von Membranproteinen ist ein essentieller Teil auch der Aufrechterhaltung der zellulären Eigenschaften. Sowohl für die Einzelzelle, als auch für deren Kommunikation mit anderen Zellen oder die Funktion des Zellverbandes als Organ, ist die Komposition der Zellmembran ausschlaggebend. Dies wird auch an der Vielzahl der Erkrankungen deutlich, welche aus Mutationen von Vesikeltransport-Komponenten resultieren, zum Beispiel Alzheimer, Schädel- und Gesichtserkrankungen und Huntington-Chorea (Kins *et al.* 2006, Fromme *et al.* 2007, Smith *et al.* 2007).

Intrazelluläres *Trafficking* lässt sich in Endozytose und Exozytose einteilen. Endozytose ist ein Vesikel-vermittelter Prozess um extrazelluläre Makromoleküle, Membranlipide und Membranproteine aufzunehmen. Der bestuntersuchte Endozytoseweg ist der über Clathrin vermittelte (Brodsky *et al.* 2001). Viele Membranproteine interagieren dazu mit Clathrin, Adapter Proteine binden an Clathrin und so entstehen Vesikel.

Dynamin löst die Vesikel von der Membran und auch hier werden Protein-Protein-Interaktionen vermutet (Takahashi *et al.* 2009). Selbst das *uncoating* solcher Vesikel verläuft über Protein-Protein-Interaktionen.

Exozytose bringt Membranproteine und Membranlipide zur Zellmembran. Membrandomänen in polarisierten Zellen besitzen verschiedene Proteinausstattungen, aber unterscheiden sich auch in ihrer Membranlipidzusammensetzung. Vor allem in polarisierten Zellen, wie sie im Epithel vorliegen, ist durch die strikte Trennung von apikaler und basolateraler Membrandomänen ein gezielter Vesikeltransport erforderlich. Dies ist auch für wieder internalisierte Membranabschnitte zu gewährleisten. COPI und COPII (*coat protein* I und II) umlagern Vesikel, welche vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat transportiert werden (Spang 2008). Auch am Vesikeltransport vom Golgi-Apparat zu diversen Zellkompartimenten sind Protein-Protein-Interaktionen oder -Bindungen

beteiligt. Vor allem Motorproteine für den Vesikeltransport wie Dynein scheinen über Protein-Bindungen direkt an die Vesikel zu binden und selbst wiederum an Proteine des Zytoskeletts (Song und Mandelkow 1993). In MDCK-II-Zellen - einem gängigen Model für Nierenepithelien - konnte gezeigt werden, dass FAPP-2 (*Phosphatidylinositol-four-phosphate adapter protein 2*) für die spezifisch apikale Sortierung von AQP2-Vesikeln verantwortlich ist (Yui *et al.* 2009).

Vesikulärer Transport unterliegt einem generellen Dogma: er ist vektoriell. Ein von einer Donormembran erzeugter Vesikel wird nur mit einer ähnlichen Zielmembran verschmelzen. Diese Vorgänge werden durch SNARE-Proteine vermittelt, welche sowohl auf dem Vesikel, als auch auf der Zielmembran vorhanden sind (Spang 2008). GTPasen der ARF/SAR-Familie (*ADP ribosylation factor/Secretion-associated and Ras-related*) vermitteln die Bildung von Vesikeln oder deren Interaktion mit Membranen. Clathrin umgibt am Trans-Golgi gebildete Vesikel und auch für diesen Prozess sind interagierende Proteine wie Adapter Protein1, 3 und 4 beteiligt. Anhand der bisher identifizierten Proteine, welche sowohl am allgemeinen Vesikeltransport, als auch speziell am *Trafficking* von AQP2 beteiligt sind, ist zu sehen, wie wichtig der Einfluss von Protein-Protein-Wechselwirkungen oder -Bindungen für diese Vorgänge ist.

In dieser Arbeit wurde mit Aha1 ein weiterer Kandidat für die Beeinflussung des intrazellulären *Traffickings* untersucht. Ob Aha1 an AQP2 bindet, oder indirekt Einfluss auf das *Trafficking* von AQP2 nimmt, wurde mit gängigen Assays zu Protein-Protein-Bindung oder Protein-Protein-Interaktion analysiert.

5.1 Bindet Aha1 direkt an AQP2

Eine Methode, die gängigerweise für die Untersuchung von Proteinkomplexen eingesetzt wird, ist die native Gelelektrophorese. Dabei werden Proteine nicht denaturiert, sondern in ihrer nativen Konformation bewahrt und nur ihrem pI nach auf Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Dies ermöglicht die Detektion von aneinander gebundenen Proteinen mittels *Western-blotting* an der gleichen Stelle im Gel.

Die nativen Gele in dieser Arbeit zeigten im *Western-blotting* jedoch ausschließlich die charakteristischen Banden für Aha1 oder AQP2. Keine gemeinsame Bande bei ca. 66 kDa konnte detektiert werden. Somit deuten die Ergebnisse des *Western-*

blotting der nativen Gelelektrophorese nicht auf eine stabile Bindung zwischen Aha1 und AQP2 hin. Doch wie für die Koimmunpräzipitation muss zur Auftrennung von AQP2 in nativen Polyacrylamidgelen selbiges aus den Membranen gelöst werden. Dies geschah mittels Dodecyl- β -D-Maltosid. Dieses Detergens ist ein für Membranproteine häufig verwendetes Solubilisierungsmittel und eines der Detergentien, welches nur geringe Auswirkungen auf Experimente hat. Doch ein Einfluss des Detergens auf Bindungen und Interaktionen kann nicht komplett ausgeschlossen werden.

Ein oft beschrittener Weg, Bindungen zwischen Proteinen zu untersuchen, ist eine Koimmunpräzipitation. Bei cytosolischen Proteinen kann dies unter nativen Bedingungen durchgeführt werden, denn das Protein, welches an seinen immobilisierten Antikörper bindet, ist im Cytosol frei zugänglich. Auch eventuell an dieses Protein gebundene Proteine lassen sich kopräzipitieren, wenn sie cytosolisch vorliegen. Anders stellen sich die Versuchsbedingungen bei einem oder mehreren Membranproteinen dar. Da AQP2 stets in einer Membran verankert ist, können zwar die AQP2-Vesikel über einen Antikörper gegen AQP2 präzipitiert werden, doch soll AQP2 selbst ohne Vesikel präzipitiert werden, um direkte Bindungspartner zu identifizieren, muss es solubilisiert vorliegen. Dies ist durch Detergentien erreichbar. Die Koimmunpräzipitation wurde an Lysaten von HEK-293-Zellen durchgeführt, welche endogen Aha1 exprimieren und zusätzlich mit Plasmiden für AQP2-S256A und AQP2-S256D transfiziert worden waren. Eingesetzt wurde zuerst das klassische Triton X-100. Bei der Koimmunpräzipitation mit Triton X-100 konnte kein Aha1 an AQP2-Präzipitaten detektiert werden. Lediglich die Anreicherung von AQP2 verglichen mit den eingesetzten Zelllysaten konnte gezeigt werden.

Sevier und Machamer fanden 2001 Aha1 in dem Pellet microsomalier Membranen von HeLa-Zellen und spekulierten auf Präzipitation des Aha1. Durch die Einwirkung von Triton X-100 auf diese Aha1-haltigen Pellets konnten sie Aha1 allerdings aus diesen entfernen und damit vermuteten sie, Teile des Aha1 lägen membrangebunden vor (Sevier und Machamer 2001).

Doch auch der Einsatz des besonders milden Dodecyl- β -D-Maltosid, um eventuell durch Triton X-100 beeinflussbare Interaktionen zwischen Aha1 und AQP2 nicht zu stören, führte zu keiner nachweisbaren Kopräzipitation von Aha1 mit AQP2. Der störende Effekt der Detergentien kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, denn

selbst milde Detergentien beeinflussen Protein-Protein-Wechselwirkungen und solubilisierte Membranproteine liegen nicht vollständig in ihrer nativen Form vor (Ostuni *et al.* 2010). Wie bereits für die native Gelelektrophorese festgestellt, konnte unter Nutzung eines Detergens keine Bindung zwischen AQP2 und Aha1 festgestellt werden. Inwieweit der Einsatz von Detergentien allgemein die Zugänglichkeit des AQP2 für Aha1 erschwert, oder die putative Bindung zwischen AQP2 und Aha1 durch Detergentien direkt gestört wird, konnte nicht genauer erruiert werden.

Lu *et al.* untersuchten 2007 die mögliche Bindung von Hsp und Hsc70 an AQP2 und nutzten Lysate AQP2 exprimierender LLC-Zellen, welche sie mit Protein-A-Beads und einem Antikörper gegen AQP2 inkubierten. In dieser Veröffentlichung konnte trotz Einsatz von 0,5 % Nonidet P-40 und 0,1 % Triton X-100 eine Koimmunopräzipitation von AQP2 und Hsp und Hsc70 detektiert werden.

Dies legt nahe, dass eine putative Bindung zwischen Aha1 und AQP2 entweder sehr schwach wäre, oder eventuell von zusätzlichen Faktoren abhängig ist.

Um die direkte Bindung zwischen Aha1 und AQP2 genauer zu untersuchen, wurde rekombinant Aha1 hergestellt. Das in *E. coli* exprimierte Aha1 sollte entweder über ein *GST-tag* oder ein *10xHis-tag* aufgereinigt werden. Ausschließlich die rekombinante Expression von *10xHis-Aha1* lieferte verwendbares Aha1 in guten Ausbeuten (bis zu 4 mg/l *E. coli* Kultur).

Der *His-tag* kann aufgrund seiner Ladungen Auswirkungen auf Assays haben. Daher wurde versucht, den *tag* abzuspalten. Eine Schnittstelle für Faktor Xa befand sich zwischen dem *tag* und Aha1. Diese Versuche jedoch führten nicht zum erfolgreichen Verdau von *10xHis-Aha1* und so wurde dieses Protein zusammen mit dem *10xHis-tag* in Assays eingesetzt.

Mit *10xHis-Aha1* wurden weitere Bindungsassays durchgeführt.

Overlay-Assays an Peptidspotmembranen, bei welchen 25 Aminosäuren lange synthetische Peptide kovalent an Membranen gebunden vorlagen. Diese entsprachen dem C-Terminus des hAQP2. Es wurde sowohl die Sequenz des hAQP2wt, als auch des hAQP2-S256D und hAQP2-S256A zu Peptidspots verarbeitet. Inkubation mit *10xHis-Aha1* und anschließende Immundetektion von Aha1 zeigte, dass *10xHis-Aha1* an einige der Peptidspots gebunden hatte (4.1.3). *10xHis-Aha1* band an alle drei hAQP2-Variationen. Die Peptid-sequenzen, an welche

10xHis-Aha1 band, präsentierten Ser256 als 10. bzw. 13. Aminosäure der Peptide - beginnend von der Membran. Stellt Ser256 die 13. Aminosäure im Peptid dar, folgen weitere 12 Aminosäuren. An diesen Peptidsequenzen zeigte sich die beste Bindung von 10xHis-Aha1. Wird das Ser256 in Position 10 der Peptidsequenz präsentiert, bildet dieses Peptid die vollständige Endsequenz des C-Terminus von hAQP2. An diesen Peptiden fiel die Bindung von 10xHis-Aha1 etwas schwächer aus. Insgesamt am schwächsten war die Bindung an 10xHis-Aha1 für hAQP2-S256A. Etwas besser band 10xHis-Aha1 an hAQP2-S256D. Die stärkste Bindung konnte an hAQP2wt detektiert werden. Die beste Bindung konnte also für die Peptidsequenz H₂N-TDWEEREVRRRQ**S**VELHSPQSLPRG-COOH ermittelt werden. Der vollständige C-Terminus ist noch um die Aminosäuren SKA länger. Im Peptidspotmembran-Overlay zeigte sich, dass diese 3 Aminosäuren die Bindung von 10xHis-Aha1 an das Peptid verringern (4.1.3, Abb. 4.6).

Im Peptidspotmembran-Overlay konnte als einziger Methode in dieser Arbeit eine Bindung von Aha1 an AQP2 nachgewiesen werden. Unabhängig von anderen Proteinen oder Membranlipiden band 10xHis-Aha1 an eine 25 Aminosäuren lange Peptidsequenz des C-Terminus von AQP2. Auffallend ist, dass an den Peptidspots, welche nahezu die gleiche Sequenz aufweisen, denen jedoch die Aminosäuren PRG am C-Terminus noch fehlen, keine Bindung von Aha1 auftrat. Entweder ist das Ser256 nicht weit genug am C-terminalen Ende des Peptids, oder die PRG-Sequenz ist essentiell für diese Bindung.

Da bereits bekannt war, dass Aha1 in Zellen zu einem Teil membrangebunden vorliegt (Sevier und Machamer 2001), wurde rekombinant in *E. coli* exprimiertes 10xHis-Aha1 in der Oberflächenplasmonresonanzmessung eingesetzt. Hierbei sollte die Bindung von Aha1 an Membranlipide untersucht werden.

Die Oberflächenplasmonresonanzmessung ergab eine deutliche Bindung von 10xHis-Aha1 an die auf der Goldschicht immobilisierten Liposomen (4.1.4).

Bestehend aus Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE) (8:2) (w/w) repräsentierten die Liposomen zwei Hauptbestandteile der Zellmembran. Die Oberflächenplasmonresonanzmessungen zeigten, dass Aha1 bereits an leere (kein Protein enthaltende) Liposomen bindet. Die am GKSH produzierten Liposomen besitzen eine mittlere Größe von 122 nm, Aha1 ist ungefähr 6,4 nm lang (Wernimont, A.K. *et al.*, PDB). Vergleicht man die Größe der Liposomen mit der von Aha1, ergibt

sich ein Faktor von 19. Vergleicht man hingegen die RU-Werte der SPR-Signale von Liposomen und 10xHis-Aha1, ergibt sich ein Faktor von 25,5. Daraus wird ersichtlich, dass 10xHis-Aha1 fast ebenso gut an die Liposomen binden, wie diese an den L1-Chip. Die Dissoziation des Aha1 von den immobilisierten Liposomen konnte nur mit massiven Mitteln wie NaOH-Einspritzung erreicht werden (4.1.4). Die feste Bindung von 10xHis-Aha1 an diese Liposomen zusammen mit den Ergebnissen der Vorversuche am FMP Berlin bestätigt die Membranassoziation des Aha1.

Versuche mit in Liposomen integriertem AQP2 - sowohl AQP2wt, als auch AQP2-S256A und AQP2-S256D - wären wünschenswert, um auch in diesem Assay zu ermitteln, ob 10xHis-Aha1 an AQP2 bindet.

Diese Hinweise erklären allerdings zum Teil die Delokalisation von Aha1 nach Einwirkung von Vasopressin in MDCK-II-Zellen. Liegt Aha1 membranassoziiert vor und ist lipidgebundener Bestandteil der AQP2-Vesikel, wird es zusammen mit diesen zur apikalen Zellmembran transportiert. Zusammen mit den Hinweisen aus den Peptidspotmembran-Assays (4.1.3, Abb. 4.6), welche eine Bindung von 10xHis an hAQP2 zeigten, ergibt sich die Vermutung, Aha1 könnte sowohl membrangebunden an den AQP2-Speichervesikeln vorliegen, als auch eine schwache Bindung mit dem C-Terminus von AQP2 eingehen.

Zelluläre Prozesse werden massiv von Proteinkinasen gesteuert. Diese werden durch ein erhöhtes cAMP-Level innerhalb der Zellen aktiviert. Die Steigerung der Menge an cAMP in Sammelrohrzellen erfolgt physiologisch nicht nur nach Einwirkung von Vasopressin am V2-Rezeptor, sondern unter anderem auch durch Adrenalin am α_1 -Rezeptor (Schmitz *et al.* 1981), Prostaglandin E2 am EP2-Rezeptor (Breyer und Breyer 2001) und Dopamin am D1-Rezeptor (Sanada *et al.* 2006).

Diese verschiedenen Einflüsse aktivieren durch Erhöhung des cAMP-Levels relativ unspezifisch die Kinasen innerhalb der Sammelrohrzellen. Dass PKA nicht der einzige Faktor beim *Trafficking* von AQP2 ist, zeigen die bisher ermittelten Proteine, die Einfluss auf diesen Vorgang nehmen. Jedoch bleibt die Phosphorylierung des AQP2 am Ser256 ein zentraler Schalter für das intrazelluläre *Trafficking* des AQP2. PKA kann jedoch auch aktiviert werden, wenn im Körper keine Notwendigkeit der AQP2-Translokation vorliegt. Führt pauschal die Aktivierung von PKA zum Einbau von AQP2 in die apikale Membran der Sammelrohrzellen, würde dies nicht direkt von Vasopressin abhängen. Es ist daher eine allgemein akzeptierte Theorie, dass direkte AQP2-Bindungspartner diese Phosphorylierung beeinflussen könnten. Da 10xHis-

Aha1 in dieser Arbeit sowohl an Membranphospholipide, als auch an Peptide des C-Terminus von AQP2 gebunden detektiert werden konnte, kann Aha1 einen solchen Einfluss darstellen.

5.2 Beeinflusst Aha1 das intrazelluläre Trafficking von AQP2

Im Rahmen der Fragestellung dieser Arbeit sollte der funktionelle Aspekt von Aha1 innerhalb des *Traffickings* von AQP2 auch weiter *in vivo* untersucht werden. Die im Arbeitskreis bereits etablierte *Knockout*-Technik in *Saccharomyces cerevisiae* konnte jedoch zu diesem Zweck nicht angewendet werden, da in *S. cerevisiae* exprimiertes AQP2 nicht die selben posttranslationalen Modifikationen wie in Eukaryoten erhält. Der *Knockout* von Proteinen in eukaryotischen Zellen ist aufgrund des diploiden Chromosomensatzes keine Option. Dahingegen bietet sich die RNAi-Technik für eukaryotische Zellsysteme an. Dabei kann zwar kein vollständiger *Knockout* des Proteins erreicht werden, doch eine Reduktion der Proteinmenge (*Knockdown*) um ca. 70 % ist möglich. Sowohl eukaryotische Zellkultur, als auch RNAi wurden im Rahmen dieser Arbeit als neue Techniken im Arbeitskreis etabliert.

Ein wichtiger Teil dieser Arbeit war, eukaryotische Zellkultur erstmalig aufzubauen und als Grundlage für weitere Versuche zu etablieren. Sowohl die Dauerkultivierung der Zelllinien HEK-293 und MDCK-II, als auch deren lipidvermittelte Transfektion mit RNA-Oligonukleotiden bzw. Plasmid-DNA wurde erfolgreich durchgeführt. Dabei wurde deutlich, dass die Transfektionseffizienz für HEK-293-Zellen deutlich höher als für MDCK-II-Zellen lag. Vor allem die Transfektionsrate für siRNA-Oligonukleotide lag bei nahezu 100 % (Abb. 4.11). Für Plasmid-DNA konnte eine Transfektionsrate von 20 % erreicht werden, welche der durchschnittlichen Transfektionsrate in HEK-293 Zellen entspricht, wenn kationische Lipide als Transfektionsvermittler eingesetzt werden. Höhere Transfektionsraten für HEK-293-Zellen sind nur durch Elektroporation zu erzielen.

Für MDCK-II-Zellen wurden Versuche zur Transfektionseffizienz mit circularer Plasmid-DNA durchgeführt und eine mittlere Transfektionsrate von 10 % erreicht. Da MDCK-II-Zellen zu den schwer transfizierbaren Zellen gehören, stellte diese Zelllinie

eine besondere Herausforderung dar. Transfektionsraten für die Einbringung eines Membranfusionsproteins mit C-terminalem GFP durch das auch in dieser Arbeit verwendete Transfektionsreagenz Metafectene[®] waren bereits bekannt und bewegten sich zwischen 4 und 6 % (Information des Transfektionsreagenz-Herstellers). In der vorliegenden Arbeit konnte durch Modifikation des Transfektionsvorganges eine mittlere Transfektionsrate von 10 % erreicht werden (Abb. 4.12). MDCK-II-Zellen schienen eine Empfindlichkeit gegenüber den gebildeten Lipid-DNA-Komplexen zu besitzen. 24 Stunden nach der Transfektion zeigten sich viele aus dem Zellrasen gelöste MDCK-II-Zellen und die Färbung mit Trypanblau-Lösung zeigte eine geringe Überlebensrate der MDCK-II-Zellen nach der Transfektion. Wurde 4 Stunden nach der Transfektion das Medium gegen frisches ausgetauscht, überlebten deutlich mehr Zellen den Transfektionsprozess.

Die RNAi-Technik wurde im Rahmen dieser Arbeit im Arbeitskreis ebenfalls etabliert. RNAi Zielsequenzen sollten bestimmte Merkmale erfüllen (Elbashir *et al.* 2002): optimalerweise liegen sie 75-100 bp hinter dem Startkodon des Gens des Zielproteins. An diesem Abschnitt binden UTR-bindende Proteine und Translations-Proteinkomplexe und dies kann die RNAi behindern. Sie sollten einen GC-Gehalt von ca. 50 % besitzen und im besten Fall der Sequenz AA(19N)TT entsprechen. Die gewählte RNAi-Zielsequenz muss vor ihrem Einsatz auf ihre Spezifität hin untersucht werden um Off-target-Effekte zu minimieren. Die in dieser Arbeit verwendeten siRNA-Oligonukleotide wurden basierend auf Elbashir *et al.* 2002 (siRNA 1&2 der Firma Dharmacon), Holmes *et al.* 2008 (siRNA holmes der Firma MWG) und den Algorithmen der Firma invitrogen (Oligo 1, Oligo 2 und Oligo3) erstellt. Die optimale Konzentration der siRNA-Oligonukleotide wurde ermittelt und unter gleichbleibenden Bedingungen die Effizienz der einzelnen Oligonukleotide untersucht. Dazu wurden Zellen mit 30 nM siRNA transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Aha1-Menge ermittelt. Die Ergebnisse der Experimente mit verschiedenen siRNA-Oligonukleotidsequenzen zeigten bei zwei der Oligonukleotide eine ausreichende Reduktion von Aha1 in den Zellen. Oligo 2 und Oligo 3 wiesen die beste Effizienz auf und wurden in den weiteren Experimenten eingesetzt.

siRNA-Oligonukleotide sind doppelsträngige kurze RNA Stücke, welche häufig nur einen kurzen Überhang aus DNA besitzen. Dieser soll einen Schutz gegen Nucleasen in der Zelle darstellen und verbessert die Erkennung durch RISC. Der

Standard-Überhang besteht aus TT am 3'-Ende der RNA-Sequenzen. Dieser ist - verglichen mit einem UU-Überhang - relativ kostengünstig herzustellen und bietet vermutlich den besten Schutz vor Nukleasen (Elbashir *et al.* 2001). Verwendet man vor der Transfektion solcher siRNA-Oligonukleotide allerdings Vollmedium für die zu transfizierenden Zellen, enthält dieses bereits genug Nukleasen, um einen Großteil der siRNA-Oligonukleotide zu zerstören. In dieser Arbeit wurde daher 4 Stunden vor den Transfektionen das Vollmedium gegen Medium ohne fötales Kälberserum ausgetauscht und somit nukleasefrei gehalten. Die Nukleasen innerhalb der Zellen jedoch blieben unbeeinflusst. Anhand der Überprüfung der Transfektionseffizienz (4.2.1) konnte gezeigt werden, dass siRNA-Oligonukleotide durch lipidvermittelte Transfektion mit sehr guter Effizienz in die Zellen gelangte (Abb. 4.11). Da die Fluoreszenzmarkierung der dazu genutzten siRNA-Oligonukleotide jedoch erhalten bleibt, wenn diese abgebaut werden, sagt die reine Transfektionseffizienz nichts über die Halbwertszeiten innerhalb der Zellen aus. Die Schwankungen im Aha1-*Knockdown* durch siRNA-Oligonukleotide haben also verschiedene Ursachen. Neben ihrer Instabilität innerhalb der Zellen können auch Schwankungen in der Transfektionseffizienz nicht ausgeschlossen werden. Auch die Bildung von Lipid-siRNA-Komplexen vor der Transfektion ist ein störanfälliger Prozess. Erschütterungen oder zu schnelle Handhabung der Lösung können diese Komplexe wieder zerstören und damit die Menge an transfizierbaren siRNA-Oligonukleotiden verringern. Die in dieser Arbeit maximal erreichte Reduktion der Aha1 Expression durch siRNA Oligonukleotide betrug 55 %. Es wäre wünschenswert, diesen Effekt durch weitere Optimierung der Methode und Testung zusätzlicher Zielsequenzen zu steigern.

Mit den Zelllinien HEK-293, sowie HEK-293-AQP2wt und HEK-293-AQP2wt-HA wurden ELISA durchgeführt, um den Einfluss des Aha1-Knockdowns durch die effektivsten siRNA-Oligonukleotide Oligo 2 und Oligo 3 auf das AQP2-*Trafficking* zu untersuchen. HEK-293-AQP2wt und HEK-293-AQP2wt-HA wurden von der Arbeitsgruppe um Enno Klusmann (FMP Berlin) zur Verfügung gestellt. HEK-293-AQP2wt exprimieren AQPwt, während HEK-293-AQP2wt-HA AQP2wt mit einem HA-*tag* an einem extrazellulären loop versehen exprimieren. HEK-293-Zellen und HEK-293-AQP2wt dienten hierbei als Kontrolle, da sie entweder kein AQP2 exprimieren, oder dieses extrazellulär durch den verwendeten Antikörper nicht detektierbar ist.

Der Effekt der Aha1-Menge auf das AQP2-*Trafficking* konnte durch einen Vergleich der Signalstärke vor Forskolinstimulation und danach ermittelt werden. Nach Forskolinstimulation von Zellen, welche mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden, erhöhte sich das Signal für AQP2 in der Zellmembran auf ungefähr das 4-Fache des Basalwertes. Nach Transfektion mit siRNA Oligo 3 erhöhte sich das Signal in gleichem Maße. Bei Zellen, welche mit siRNA Oligo 2 transfiziert waren, betrug die Signalstärkeänderung nach Forskolin das 13-Fache (Abb. 4.24). Die HEK-293-Zellen wurden anschließend lysiert, mit SDS-PAGE aufgetrennt und im *Western-blotting* die Aha1-Menge detektiert. In den HEK-293-AQP2-HA-Zellen, welche im ELISA zum Einsatz kamen, wurde durch Oligo 2 Aha1 auf ca. 50 % reduziert. Die Reduktion durch Oligo 3 war schwächer (Abb. 4.24). Je weniger Aha1 in den Zellen vorlag, desto stärker war das durch Forskolin induzierte *Trafficking* an die Zellmembran und damit das Signal im ELISA. Wie gezeigt werden konnte, wirkt sich die Reduktion der Aha1-Menge verstärkend auf das *Trafficking* von AQP2 zur Zellmembran aus. Weniger Aha1 in den HEK-293-Zellen führte zu vermehrtem Einbau des AQP2 nach Stimulation der Zellen mit Forskolin (4.2.3). Der Einfluss von Aha1 auf das AQP2-*Trafficking* könnte also hemmender Natur sein.

Die mit siRNA-Oligonukleotiden ermittelten besten Zielsequenzen für RNAi an Aha1 wurden eingesetzt, um in MDCK-II-Zellen stabil siRNA exprimieren zu lassen. Mit pSilencer™4.1-CMVneo lässt sich in Säugerzelllinien shRNA exprimieren, welche innerhalb der Zelle zu siRNA prozessiert wird. pSilencer™4.1-CMVneo trägt eine Resistenzkassette gegen Neomycin und so wurden MDCK-II-Zellen, welche mit pSilencer™4.1-CMVneo-Kontroll bzw. pSilencer™4.1-CMVneoOligo2 oder pSilencer™4.1-CMVneoOligo3 transfiziert waren, unter G418-Selektionsdruck gesetzt. Die so selektierten MDCK-II-Zell-Klone zeigten nach Lyse und SDS-PAGE im *Western-blotting* eine Reduktion der Aha1-Menge um 63 beziehungsweise 83 % gegenüber Kontroll-shRNA exprimierender Zellen (Abb. 4.26). Diese Zellen wurden im Rahmen der weiteren Selektion ohne Selektionsantibiotikum gehalten, um bei anschließendem Wiedereinsetzen der Selektion die Zellen mit nicht ins Genom integriertem Expressionsplasmid abzutöten und ausschließlich die Zellen zu erhalten, welche siRNA gegen Aha1 exprimieren. Anschließende Überprüfung der Aha1-Expression in *Western-blotting* zeigten eine erneute Zunahme des Aha1 in den Zellen. Trotz des Einsatzes hoher Mengen an Selektionsantibiotikum wurden Zellen,

welche keine shRNA exprimierten, nicht abgetötet, sondern verblieben und teilten sich sogar.

G418 ist ein Neomycinsulfat-Analogon, welches inzwischen zum Standard bei der Selektion eukaryotischer Zellen gehört. Die hohen Konzentrationen, in welchen es eingesetzt wird (200-1600 µg/ml) beeinflussen die Funktion der 80S-Ribosomen Untereinheit und damit der Proteinsynthese in eukaryotischen Zellen.

Es ist bereits bei Prokaryoten unter Selektionsdruck beobachtet worden, dass selbst Zellen ohne Resistenzkassette auf Medien mit Selektions-Antibiotika wachsen konnten. Dies scheint an einer besonders dichten Koloniebildung zu liegen, welche die inneren Zellen vor dem Antibiotikum schützt (Stewart und Costerton 2001). Es wurde also versucht, durch Passagieren und Resuspension mit G418-haltigem Medium Einzelzellen zu erzeugen und diese auch vereinzelt in 12-well-Platten zu setzen. Dies führte beim Hauptteil der Zellen zum Absterben. Die Zellen, welche erneut Kolonien bildeten, wurden weiter kultiviert und erneut Lyse und SDS-PAGE unterzogen und die Aha1-Menge im *Western-blotting* bestimmt. Es zeigte sich, dass diese Klone keine verringerte Aha1-Menge im Vergleich zu mit pSilencer™4.1-CMVneo-Kontroll transfizierten Zellen aufwiesen - der *Knockdown* scheint instabil gewesen zu sein.

Es konnten keine MDCK-II-Zelllinien entwickelt werden, welche stabil geringere Aha1-Mengen bilden als MDCK-II-Zellen.

MDCK-II-Zellen exprimieren endogen kein AQP2. Für jedes Experiment musste also mit AQP2-kodierender DNA transient transfiziert werden. Dies bedeutete häufig Kotransfektion von Plasmid-DNA und siRNA-Oligonukleotiden. Die Transfektionseffizienz in MDCK-II-Zellen liegt selbst bei optimalem Erfolg bei 10 % aller Zellen und die Aussage einer Population, bei welcher 90 % durch das Experiment unbeeinflusst bleiben, ist nicht möglich. Daher wurde versucht, MDCK-II-Zellen stabil mit Plasmiden zu transfizieren, welche für mAQP2wt und mAQP2-S256D kodieren.

Nach Transfektion, Zugabe des Selektionsantibiotikums und Ausdünnen der Zellpopulation bildeten sich Klone. Die gepickten Klonkolonien wurden vereinzelt und erneut zu Monolayern herangezüchtet. Das Wachstum zu diesem Zeitpunkt war stark verlangsamt, Zellteilung konnte kaum beobachtet werden. 4 Wochen nach der Vereinzelung normalisierten sich Zellwachstum und Zellteilung langsam wieder auf die Werte untransfizierter MDCK-II-Zellen. Zu diesem Zeitpunkt wurden Zellen

kryokonserviert und erneut aufgetaut, um ihre Stabilität zu testen. Die so entstandenen Zelllinien zeigten nach 5-7 Wochen eine bereits 1977 von Graham beschriebene Wachstumskrise. Dies entspricht einer Passagezahl von 13 bis 15 und wurde bei allen Zellen beobachtet. Anschließend konnten die erhaltenen Zelllinien als stabil eingestuft werden. Die Expression der EGFP-getaggtten Proteine wurde während des gesamten Prozesses regelmäßig überprüft.

Die Entwicklung von MDCK-II-Zellen, welche stabil GFP-getaggttes mAQP2wt beziehungsweise GFP-getaggttes mAQP2S265D exprimieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich durchgeführt (Abb. 4.28, 4.30, 4.32).

EGFP-mAQP2wt lag innerhalb der Zellen vor allem in cytosolischen Vesikeln vor (Abb. 4.28). EGFP-mAQP2-S256D lag ebenfalls vermehrt in cytosolischen Vesikeln vor, allerdings befanden diese sich stärker in der Nähe der Zellmembran (Abb. 4.30). In MDCK-II-Zellen an Ser256 phosphoryliertes AQP2 liegt fast ausschließlich in der apikalen Zellmembran vor (van Balkom *et al.* 2002). Nicht-phosphoryliertes AQP2wt befindet sich nur in Speichervesikeln im subapikalen Bereich der Nierenzellen. Zur genaueren Charakterisierung dieser Phosphorylierungsstelle für PKA wurden von Nishimoto *et al.* 1999 Antikörper gegen Ser-256-phosphoryliertes AQP2 eingesetzt und es konnte gezeigt werden, dass die durch Vasopressin induzierte Translokation von AQP2 aus den intrazellulären Speichervesikeln in die apikale Zellmembran mit der Phosphorylierung des Ser256 zusammenhängt. Christensen *et al.* fanden 2000 mit Hilfe phosphospezifischer Antikörper phosphoryliertes AQP2 nicht nur in der apikalen Zellmembran, sondern auch in den intrazellulären Vesikeln. In einer späteren Untersuchung an AQP2-S256A und AQP2-S256D, welche die nicht-phosphorylierte bzw. phosphorylierte Form simulieren, konnte verifiziert werden, dass mindestens 3 der Monomere eines AQP2-Tetramers am Ser256 phosphoryliert vorliegen müssen, damit AQP2 zur apikalen Zellmembran transportiert und eingebaut wird (Kamsteeg *et al.* 2000). van Balkom *et al.* untersuchten 2002 die Lokalisation von AQP2wt, AQP2-S256A und AQP2-S256D in MDCK-II-Zellen unter basalen Bedingungen und nach Stimulation durch Forskolin. AQP2wt befand sich sowohl in intrazellulären Speichervesikeln, als auch zu einem sehr geringen Anteil in der apikalen Zellmembran. Nach Einwirkung von Forskolin reicherte sich AQP2wt in der apikalen Zellmembran an. AQP2-S256A befand sich unter basalen Bedingungen ausschließlich in intrazellulären Speichervesikeln und wurde auch nach Forskolineinwirkung nicht zur apikalen Zellmembran transportiert. AQP2-S256D

hingegen fand sich bereits unter basalen Bedingungen fast ausschließlich in der apikalen Zellmembran und zu einem geringen Teil im subapikalen Raum.

Die in dieser Arbeit erzeugten EGFP-mAQP2wt-MDCK-II-Zellen zeigten unter basalen Bedingungen eine ähnliche EGFP-AQP2-Lokalisation, wie Veröffentlichungen für AQP2wt und GFP-AQP2wt aufweisen (van Balkom *et al.* 2002, deMattia *et al.* 2005). Nach Behandlung mit Forskolin änderte sich diese Lokalisation jedoch nicht, während AQP2wt und GFP-AQP2wt vermehrt in der apikalen Zellmembran von MDCK-II-Zellen zu finden ist (deMattia *et al.* 2005).

Marr *et al.* allerdings fanden 2002 bereits in unstimulierten MDCK-II-Zellen GFP-AQP2wt in der apikalen Zellmembran und deuteten dies als Einfluss des N-terminales GFP, welches eventuell das *Trafficking* beeinflusst. Zumindest zeigt dies, dass GFP-AQP2wt korrekt gefaltet vorlag.

In MDCK-II-Zellen, welche stabil EGFP-mAQP2-S256D exprimierten, konnte EGFP-mAQP2 über die gesamte Zelle verteilt in größeren vesikulären Strukturen detektiert werden. Die transiente Transfektion von mAQP2-S256D lieferte ein ähnliches Bild, doch durch die Immundetektion ergibt sich in den Zellen eine schwache Fluoreszenz des Sekundärantikörpers in der gesamten Zelle. Gemeinsam ist den Fluoreszenzsignalen von transient transfiziertem mAQP2-S256D und stabil exprimiertem EGFP-mAQP2-S256D die Hauptlokalisierung in Zellkernnähe (Abb. 4.28 und 4.30). Dies könnte auf einen Verbleib der GFP-AQP2-Fusionsproteine im Golgi-Apparat hindeuten. Ähnliche Immunfluoreszenzaufnahmen gibt es auch für AQP2 mit NDI-verursachenden Mutationen (Giel 2004).

AQP2-S256D wurde in bisherigen Veröffentlichungen in Zelllinien konstitutiv in der apikalen Zellmembran detektiert und nicht intrazellulär (van Balkom *et al.* 2002). Die Lokalisation von EGFP-mAQP2-S256D in der vorliegenden Arbeit ausschließlich innerhalb der Zelle deutet auf einen Einfluss durch das N-terminale GFP hin, welches vermutlich - ähnlich wie bei Marr *et al.* 2002 das korrekte *Trafficking* hin zur Zellmembran behindert.

Die stabil EGFP-mAQP2-S256D exprimierenden MDCK-II-Zellen müssen weiteren Untersuchungen unterzogen werden, um die genaue Lokalisation des AQP2-S256D zu bestimmen. Marker für Zellorganellen durch Immunfluoreszenz detektieren und eine eventuelle Kolokalisation mit ihnen zu bestimmen, könnte darüber Auskunft geben.

Stabil EGFP-mAQP2wt exprimierende MDCK-II-Zellen zeigten in dieser Arbeit eine erwartete Lokalisation des Proteins, doch seine Translokation zur Zellmembran nach Forskolinstimulation konnte noch nicht erreicht werden. Dies wäre zur Weiterverwendung dieser Zellen erforderlich. Die entwickelten Zelllinien stellen eine wichtige Grundlage weiterer *AQP2-Trafficking*-Untersuchungen dar.

5.3 Fazit

Basierend auf dem verstärkenden Effekt des *Aha1-Knock-downs* auf das *Trafficking* des AQP2 im ELISA und der besseren Bindung des 10xHis-Aha1 an AQP2wt als an AQP2-S256D ergibt sich folgende Hypothese:

In Vasopressin-unstimulierten Sammelrohrzellen könnte Aha1 membrangebunden an AQP2-Vesikeln vorliegen und ebenfalls an den C-Terminus von AQP2 gebunden sein. Diese Bindung wird eventuell durch Aktivierung der PKA nach Vasopressin-Einwirkung gelöst und AQP2 am Ser256 phosphoryliert. Dies könnte erklären, weshalb 10xHis-Aha1 schlechter an AQP2-S256D-Peptidspots band, als an AQP2wt-Peptidspots.

Da Aha1 als Cochaparon von Hsp90 ubiquitär in jedem Gewebe exprimiert wird, könnte dieser Mechanismus sehr allgemeiner Natur sein und eventuell auch andere Membranproteine betreffen.

6 Ausblick

Die bereits hergestellten MDCK-II-Zelllinien sind weiter zu charakterisieren. Sowohl in Hinsicht auf die Lokalisation der EGFP-AQP2-Proteine, als auch hinsichtlich ihrer Eigenschaften verglichen mit MDCK-II-Zellen. Ihr anschließender Einsatz zur weiteren Erforschung der Wechselwirkung zwischen AQP2 und Aha1 könnte noch tiefere Einblicke in das intrazelluläre *Trafficking* von AQP2 geben. Eine weitere Zelllinie, welche stabil EGFP-AQP2-S256A exprimiert, wäre in diesem Zusammenhang zu entwickeln, um die gesamte Bandbreite der Wechselwirkungen ermessen zu können.

Der Erzeugung von MDCK-II-Zelllinien mit stabilem Aha1-Knockdown bietet große Möglichkeiten zur Untersuchung des Einflusses von Aha1 - nicht nur im Bezug auf das intrazelluläre *Trafficking* von AQP2. Dieser Ansatz sollte weiterverfolgt werden. Parallel könnten die Zielsequenzen für RNAi in der Aha1-mRNA weiter optimiert werden und mit diesen sowohl als Oligonukleotid, als auch in der Generierung der stabil exprimierenden MDCK-II-Zelllinien gearbeitet werden.

Weiter könnten Oberflächenplasmonresonanzmessungen mit Liposomen, welche mit AQP2 beladen sind, klären, ob die Bindung von Aha1 an Liposomen in Anwesenheit von AQP2 verstärkt wird. Dabei sollten sowohl AQP2wt als auch AQP2-S256A und AQP2-S256D in Liposomen gebracht werden. Kontrukte zur Expression und Aufreinigung dieser Proteine sind teilweise bereits im Arbeitskreis vorhanden und auch die Technik der Beladung von Liposomen ist im Arbeitskreis etabliert.

Die Peptidspotmembran-Overlay-Assays lieferten erste Anhaltspunkte zur Aminosäuresequenz, welche für die Bindung von Aha1 an AQP2 erforderlich ist. Durch Aminosäureaustausch innerhalb der Peptidsequenzen der Spots könnte diese Aussage verifiziert werden.

Aha1 als ubiquitäres Protein könnte mit anderen Proteinen Wechselwirkungen ausbilden - die Bindung an Hsp90 ist bereits gut untersucht. Es wäre denkbar, Aha1 in Hinsicht auf dieses Potential genauer zu untersuchen.

7 Zusammenfassung

In den Nieren ist AQP2 für einen Teil der Wasserrückresorption verantwortlich. AQP2 findet sich in den Nieren in der apikalen Plasmamembran sowie in subapikalen Vesikeln und unterliegt der Regulation durch Vasopressin über den V2-Rezeptor. Bindet Vasopressin, wird eine Kaskade in Gang gesetzt, an deren Ende AQP2 am Ser256 phosphoryliert und AQP2-Vesikel zur apikalen Membran transportiert werden. Es gilt als gesichert, dass die Phosphorylierung des AQP2 ein maßgeblicher Auslöser für den vermehrten Einbau des AQP2 in die apikale Plasmamembran ist. Doch noch immer ist ungeklärt, welchen Effekt die Phosphorylierung des AQP2 genau auslöst.

In dieser Arbeit wurde mit Aha1 ein möglicher Interaktionspartner des phosphorylierten AQP2 untersucht. Aus Vorarbeiten war bekannt, dass Aha1 membrangebunden vorliegt und an AQP2-Speichervesikeln assoziiert ist. Ein *Yeast-2-Hybrid-Screening* deutete auf eine direkte Bindung des Aha1 an phosphoryliertes AQP2. *In vitro* Bindungsassays, bei welchen AQP2 aus Zelllysaten gewonnen wurde und Detergenzien ausgesetzt war, konnten keine Bindung zwischen Aha1 und AQP2 detektieren.

Die *in vitro* Untersuchungen der Bindung zwischen rekombinante in *E. coli* exprimiertem 10xHis-Aha1 und synthetischen Peptiden des C-Terminus von AQP2 zeigten eine direkte Bindung Aha1 an AQP2. Diese Bindung trat am stärksten für den Wildtyp des AQP2 auf.

Im Rahmen diese Arbeit wurde die Kultur eukaryotischer Zelllinien (HEK-293 und MDCK-II) etabliert und genutzt, um *in vivo* die Interaktion von Aha1 und AQP2 zu untersuchen. Da beide Zelllinien endogen kein AQP2 exprimieren, wurden diese nach Bedarf transfiziert. Besonders erfolgreich war hierbei die Steigerung der Transfektionseffizienz für die schwer zu transfizierenden MDCK-II-Zellen. Für die *in vivo* Untersuchung der Interaktion von Aha1 und AQP2 wurde ebenfalls die RNAi-Technik im Arbeitskreis etabliert und auf Aha1 angewendet. Eine Verringerung der Aha1-Menge um 50 % wurde erzielt. Diese verringerte Menge an Aha1 zeigte in ELISA-Assays, dass Aha1 einen hemmenden Effekt auf das intrazelluläre *Trafficking* von AQP2 besitzen könnte.

In Vasopressin-unstimulierten Sammelrohrzellen könnte Aha1 membrangebunden an AQP2-Vesikeln vorliegen und ebenfalls an den C-Terminus von AQP2 gebunden

sein. Diese Bindung wird eventuell durch Aktivierung der PKA nach Vasopressin-Einwirkung gelöst und AQP2 am Ser256 phosphoryliert. Dies könnte erklären, weshalb 10xHis-Aha1 schlechter an AQP2-S256D-Peptidspots band, als an AQP2wt-Peptidspots.

Zur Verbesserung der Knockdown-Stabilität wurde die RNAi-Technik von siRNA-Oligonukleotiden auf stabil von einem Vektor exprimierte siRNA erweitert. Dieser wurde in MDCK-II-Zellen eingebracht. Die Erzeugung von Zelllinien, welche dauerhaft diese siRNA exprimieren, konnte nicht erreicht werden.

Jedoch gelang es, MDCK-II-Zelllinien zu erzeugen, welche stabil EGFP-mAQP2wt exprimieren, Ebenfalls entstanden MDCK-II-Zelllinien mit stabiler Expression von EGFP-mAQP2-S256D. Diese beiden Zelllinien stehen für weiterführende Untersuchungen des AQP2-*Traffickings* zur Verfügung.

8 Summary

AQP2 is known to provide a major portion of the water retention in the kidneys. It is located in the apical plasma membrane and subapical storage vesicles. Vasopressin is the effector of the water permeability of collecting tube primary cells. When vasopressin binds to the V2-receptor in these cells AQP2 is phosphorylated at Ser256. On this, AQP2 storage vesicles are recruited to the apical membrane. How the phosphorylation of AQP2 is mediating this translocation is still to be investigated.

During this thesis a putative interaction partner for AQP2 was analyzed - Aha1. Preliminary work showed that Aha1 is membrane associated and it was found at AQP2 vesicles. *Yeast-2-Hybrid-Screening* revealed that Aha1 directly binds to the C-terminus of phosphorylated AQP2.

In vitro analysis of this binding between Aha1 and AQP2 demonstrated a direct binding of recombinant His-Aha1 at peptides representing the C-terminus of AQP2. The strongest binding was determined for wildtype AQP2.

In vitro binding assays with detergent solubilized AQP2 did not give hints for binding of the two proteins.

During this thesis eucaryotic cell culture was established in the research group. HEK-293 and MDCK-II cells were used to address the interaction between Aha1 and AQP2 *in vivo*. Both cell lines do not express AQP2 endogenously. Hence, cells were transfected with AQP2 if needed and after optimization very high transfection rates for the hard to transfect MDCK-II were achieved in this thesis.

Likewise the RNAi technique was established in the course of this thesis. RNAi for the knockdown of Aha1 with oligonucleotide siRNA reached 50 % reduction of Aha1 in MDCK-II cells. Using ELISA this reduction of Aha1 revealed that Aha1 seems to have an inhibiting effect on the *trafficking* of AQP2.

To enhance the stability of the knockdown of Aha1 the RNAi technique was transferred from oligonucleotide siRNA to a stable siRNA expressing plasmid.

This plasmid used for transfection of MDCK-II cells. Yet it was not possible to produce a MDCK-II cell line out of that.

However MDCK-II cell lines that stably express GFP fused wildtype AQP2 and GFP fused AQP2-S256D were accomplished in this thesis. These two cell lines can be used to further investigate the intracellular *trafficking* of AQP2.

9 Literaturverzeichnis

Arya R, Bhattacharya A, Saini KS (2008) Dictyostelium discoideum-a promising expression system for the production of eukaryotic proteins. *FASEB J* 22:4055-66

Bedford JJ, Leader JP, Jing R *et al.* (2008) Amiloride restores renal medullary osmolytes in lithium-induced nephrogenic diabetes insipidus. *Am J Physiol Renal Physiol* 294:F812-F820

Bichet DG (1996) Vasopressin receptors in health and disease. *Kidney Int* 49:1706-1711

Borgnia M, Nielsen S, Engel A, Agre P (1999) Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. *Annu Rev Biochem* 1999;68:425-58

Breyer MD, Breyer RM (2001) G protein-coupled prostanoid receptors and the kidney. *Annu Rev Physiol* 63:579-605

Brodsky FM, Chen CY, Knuehl C *et al.* (2001) Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:517-68

Brown D, Weyer P, Orci L (1988) Vasopressin stimulates endocytosis in kidney collecting duct principal cells. *Eur J Cell Biol* 46:336-41

Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R (2002) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296:550-3

Caplen NJ, Parrish S, Imani F *et al.* (2001) Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:9742-7

Child CG (1938) Observations on the pathological changes following experimental hypertension produced by constriction of the renal artery. *J Exp Med* 67:521-8

Christensen S, Kusano E, Yusufi AN *et al.* (1985) Pathogenesis of nephrogenic diabetes insipidus due to chronic administration of lithium rats. *J Clin Invest* 75:1865-1879

Chung CT, Niemela SL, Miller RH (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2172-5

Davies AH, Jowett JB, Jones IM (1993) Recombinant baculovirus vectors expressing glutathione-S-transferase fusion proteins. *Biotechnology (N Y)* 11:933-6

Deen PM, Verdijk MA, Knoers NV *et al.* (1994) Requirement of human renal water channel aquaporin-2 for vasopressin-dependent concentration of urine. *Science* 264:92-95

deMattia F, Savelkoul PJ, Bichet DG *et al.* (2004) A novel mechanism in recessive nephrogenic diabetes insipidus: wild-type aquaporin-2 rescues the apical membrane expression of intracellularly retained AQP2-P262L. *Hum Mol Genet* 13:3045-3056

de Mattia F, Savelkoul PJ, Kamsteeg EJ *et al.* (2005) Lack of arginine vasopressin-induced phosphorylation of aquaporin-2 mutant AQP2-R254L explains dominant nephrogenic diabetes insipidus. *J Am Soc Nephrol* 16:2872-80

Elbashir SM, Harborth J, Weber K, Tuschl T (2002) Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 26:199-213

Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A *et al.* (2001) Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J* 20:6877-88

- Frank R (2002) The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports--principles and applications. *J Immunol Methods* 267:13-26
- Franki N, Macaluso F, Schubert W *et al.* (1995) Water channel-carrying vesicles in the rat IMCD contain cellubrevin. *Am J Physiol* 269:C797-801
- Fromme JC, Ravazzola M, Hamamoto S *et al.* (2007) The genetic basis of a craniofacial disease provides insight into COPII coat assembly. *Dev Cell* 13:623-34
- Fushimi K, Uchida S, Hara Y *et al.* (1993) Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule. *Nature* 361:549-552
- Gonen T, Walz T (2006) The structure of aquaporins. *Q Rev Biophys* 39:361-96
- Gorelick DA, Praetorius J, Tsunenari T *et al.* (2006) Aquaporin-11: a channel protein lacking apparent transport function expressed in brain. *BMC Biochem* 1;7:14
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36:59-74
- Gray H (1918) *Anatomy of the Human Body*. Philadelphia: *Lea & Febiger*, 20th ed
- Grünweller A, Wyszko E, Bieber B *et al.* (2003) Comparison of different antisense strategies in mammalian cells using locked nucleic acids, 2'-O-methyl RNA, phosphorothioates and small interfering RNA. *Nucleic Acids Res* 31:3185-93
- Hannon GJ, Rossi JJ (2004) Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* 431:371-8
- Hochuli E, Döbeli H, Schacher A (1987) New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J Chromatogr* 411:177-84

Hoffert JD, Pisitkun T, Wang G *et al.* (2006) Quantitative phosphoproteomics of vasopressin-sensitive renal cells: regulation of aquaporin-2 phosphorylation at two sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:7159-64

Holmes JL, Sharp SY, Hobbs S, Workman P (2008) Silencing of HSP90 cochaperone AHA1 expression decreases client protein activation and increases cellular sensitivity to the HSP90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin. *Cancer Res* 68:1188-97

Huppi K, Martin SE, Caplen NJ (2005) Defining and assaying RNAi in mammalian cells. *Mol Cell* 17:1-10

Ishibashi K, Kuwahara M, Gu Y *et al.* (1997) Cloning and functional expression of a new water channel abundantly expressed in the testis permeable to water, glycerol, and urea. *J Biol Chem* 272:20782-20786

Kachadorian WA, Wade JB, DiScala VA (1975) Vasopressin: induced structural change in toad bladder luminal membrane. *Science* 190:67-69

Kamsteeg EJ, Bichet DG, Konings IB *et al.* (2003) Reserved polarized delivery of an aquaporin-2 mutant causes dominant nephrogenic diabetes insipidus. *J Cell Biol* 163:1099-1109

Kamsteeg EJ, Heijnen I, van Os CH, Deen PM (2000) The subcellular localization of an aquaporin-2 tetramer depends on the stoichiometry of phosphorylated and nonphosphorylated monomers. *J Cell Biol* 151:919-30

Katsura T, Ausiello DA, Brown D (1996) Direct demonstration of aquaporin-2 water channel recycling in stably transfected LLC-PK1 epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 270:F548-F553

Katsura T, Gustafson CE, Ausiello DA, Brown D (1997) Protein kinase A phosphorylation is involved in regulated exocytosis of aquaporin-2 in transfected LLC-PK1 cells. *Am J Physiol* 272:F817-822

Kim GH, Lee JW, Oh YK *et al.* (2004) Antidiuretic effect of hydrochlorothiazide in lithium-induced nephrogenic diabetes insipidus is associated with upregulation of aquaporin-2, Na-Cl-co-transporter, and epithelial sodium channel. *J Am Soc Nephrol* 15:2836-2843

King LS, Choi M, Fernandez PC *et al.* (2004) From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:687-698

King LS, Choi M, Fernandez PC *et al.* (2001) Defective urinary-concentrating ability due to a complete deficiency of aquaporin-1. *N Engl J Med* 345:175-179

King, LS, Yasui, M (2002) Aquaporins and disease: lessons from mice to humans. *Trends Endocrin Metab* 13, 355–360

Kins S, Lauther N, Szodorai A, Beyreuther K (2006) Subcellular *Trafficking* of the amyloid precursor protein gene family and its pathogenic role in Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis* 3:218-26

Klimka A, Tur MK, Huhn M *et al.* (2005) Measurement of antibody-membrane interactions by surface plasmon resonance. *Int J Mol Med*. 14:765-8.

Klussmann E, Rosenthal W (2001) Role and identification of protein kinase A anchoring proteins in vasopressin-mediated aquaporin-2 translocation. *Kidney Int* 60:446-9

Kuwahara M, Iwai K, Oodea T *et al.* (2001) Three families with autosomal dominant nephrogenic diabetes insipidus caused by aquaporin-2 mutations in the C-terminus. *Am J Hum Genet* 69:738-748

Kuwahara M, Verkman AS (1989) Pre-steady-state analysis of the turn-on and turn-off of water permeability in the kidney collecting tubule. *J Membr Biol* 110:57-65

Kwon TH, Hager H, Njesum LN *et al.* (2001) Physiology and pathophysiology of renal aquaporins. *Semin Nephrol* 21:231-238

Kwon TH, Laursen UH, Marples D *et al.* (2000) Altered expression of renal AQPs and Na⁺-transporters in rats with lithium-induced NDI. *Am J Physiol Renal Physiol* 279:F552-F564

Lee NS, Dohjima T, Bauer G *et al.* (2002) Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nat Biotechnol* 20:500-5

Loonen AJ, Knoers NV, van Os CH *et al.* (2008) Aquaporin 2 mutations in nephrogenic diabetes insipidus. *Semin Nephrol* 28:252-265

Lu HA, Sun TX, Matsuzaki T *et al.* (2007) Heat shock protein 70 interacts with aquaporin-2 and regulates its trafficking. *J Biol Chem* 282:28721-32

Ma T, Yang B, Verkman AS (1997) Cloning of a novel water and urea-permeable aquaporin from mouse expressed strongly in colon, placenta, liver, and heart. *Biochem Biophys Res Commun* 240:324-328

Madin SH, Darby NB Jr (1958) Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin. *Proc Soc Exp Biol Med* 98:574-6

Manley GT, Fujimura M, Ma T *et al.* (2000) Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nat Med* 6:159-163

Marples D, Christensen S, Christensen EI *et al.* (1995) Lithium-induced downregulation of aquaporin-2 water channel expression in rat kidney medulla. *J Clin Invest* 95:1838-1845

Marples D, Schroer TA, Ahrens N *et al.* (1998) Dynein and dynactin colocalize with AQP2 water channels in intracellular vesicles from kidney collecting duct. *Am J Physiol* 274:F384-94

Marr N, Bichet DG, Lonergran M *et al.* (2002) Heterooligomerization of an aquaporin-2 mutant with wild-type aquaporin-2 and their misrouting to late endosomes/lysosomes explains dominant nephrogenic diabetes insipidus. *Hum Mol Genet* 11:779-789

Mayer MP, Nikolay R, Bukau B (2002) Aha, another regulator for Hsp90 chaperones. *Mol Cell* 10:1255-6

Moeller HB, MacAulay N, Knepper MA, Fenton RA (2009) Role of multiple phosphorylation sites in the COOH-terminal tail of aquaporin-2 for water transport: evidence against channel gating. *Am J Physiol Renal Physiol* 296:F649-57

Mulders SM, Bichet DG, Rijss JP *et al.* (1998) An aquaporin-2 water channel mutant which causes autosomal dominant nephrogenic diabetes insipidus is retained in the Golgi complex. *J Clin Invest* 102:57-66

Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R (1990) Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 2:279-289

Nielsen S (2002) Renal aquaporins: an overview. *BJU Int* 90 Suppl 3:1-6

Nielsen S, Chou CL, Marples D *et al.* (1995a) Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:1013-1017

Nielsen S, DiGiovanni SR, Christensen EI *et al.* (1993a) Cellular and subcellular immunolocalization of vasopressin-regulated water channel in rat kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:11663-11667

Nielsen S, Frøkiaer J, Marples D *et al.* (2002) Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine. *Physiol Rev* 82:205-244

- Nielsen S, Kwon TH, Frøkiaer J *et al.* (2007) Regulation and dysregulation of aquaporins in water balance disorders. *J Intern Med* 261:53-64
- Nielsen S, Kwon TH, Praetorius J *et al.* (2006) Aldosterone increases urine production and decreases apical AQP2 expression in rats with diabetes insipidus. *Am J Physiol Renal Physiol* 290:F438-F449
- Nielsen S, Marples D, Birn H *et al.* (1995) Expression of VAMP-2-like protein in kidney collecting duct intracellular vesicles. Colocalization with Aquaporin-2 water channels. *J Clin Invest* 96:1834-44
- Nielsen S, Smith BL, Christensen EI *et al.* (1993) CHIP28 water channels are localized in constitutively water-permeable segments in the nephron. *J Cell Biol* 120:371-383
- Nishimoto G, Zelenina M, Li D *et al.* (1999) Arginine vasopressin stimulates phosphorylation of aquaporin-2 in rat renal tissue. *Am J Physiol* 276:F254-9
- Noda Y, Horikawa S, Katayama Y, Sasaki S (2004) Water channel aquaporin-2 directly binds to actin. *Biochem Biophys Res Commun* 322:740-5
- Noda Y, Horikawa S, Katayama Y, Sasaki S (2005) Identification of a multiprotein "motor" complex binding to water channel aquaporin-2. *Biochem Biophys Res Commun* 330:1041-7
- Noda Y, Sasaki S (2006) Regulation of aquaporin-2 *Trafficking* and its binding protein complex. *Biochim Biophys Acta* 1758:1117-25
- Ostuni MA, Iatmanen S, Teboul D *et al.* (2010) Characterization of membrane protein preparations: measurement of detergent content and ligand binding after proteoliposomes reconstitution. *Methods Mol Biol* 654:3-18
- Paddison PJ, Caudy AA, Hannon GJ (2002) Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:1443-8

Paul CP, Good PD, Winer I, Engelke DR (2002) Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat Biotechnol* 20:505-8

Preston GM, Smith BL, Zeidel ML *et al.* (1994) Mutations in aquaporin-1 in phenotypically normal humans without functional CHIP water channels. *Science* 265:1585-1587

Pringle AT, Forsdyke J, Rose AH (1979) Scanning electron microscope study of *Saccharomyces cerevisiae* spheroplast formation. *J Bacteriol* 140:289-293

Procino G, Carmosino M, Tamma G *et al.* (2004) Ser-256 phosphorylation dynamics of aquaporin 2 during maturation from the ER to the vesicular compartment in renal cells. *FASEB J* 17:1886-1888

Robinson LJ, Pang S, Harris DS *et al.* (1992) Translocation of the glucose transporter (GLUT4) to the cell surface in permeabilized 3T3-L1 adipocytes: effects of ATP, insulin, and GTP gamma S and localization of GLUT4 to clathrin lattices. *J Cell Biol* 117:1181-96

Sabolic I, Katsura T, Verbavatz JM *et al.* (1995) The AQP2 water channel: effect of vasopressin treatment, microtubule disruption, and distribution in neonatal rats. *J Membr Biol* 143:165-175

Sabolic I, Valenti G, Verbavatz JM *et al.* (1992) Localization of the CHIP28 water channel in rat kidney. *Am J Physiol* 263:C1225-C1233

Sanada H, Yatabe J, Midorikawa S *et al.* (2006) Amelioration of genetic hypertension by suppression of renal G protein-coupled receptor kinase type 4 expression. *Hypertension* 47:1131-9

Sevier CS, Machamer CE (2001) p38: A novel protein that associates with the vesicular stomatitis virus glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 287:574-82

Schmitz JM, Graham RM, Sagalowsky A, Pettinger WA (1981) Renal alpha-1 and alpha-2 adrenergic receptors: biochemical and pharmacological correlations. *J Pharmacol Exp Ther* 219:400-6

Schrier RW, Gross P, Gheorghide M *et al.*, SALT Investigators (2006) Tolvaptan, a selective oral vasopressin V2-receptor antagonist, for hyponatremia. *N Engl J Med* 355:2099-112

Schrier RW (2008) Vasopressin and aquaporin 2 in clinical disorders of water homeostasis. *Semin Nephrol* 28:289-296

Smith HW (1951) Comparative physiology of the kidney, in Smith HW (ed): *The Kidney: Structure and Function in Health and Disease*. New York, NY, Oxford University Press: 520-574

Smith R, Klein P, Koc-Schmitz Y *et al.* (2007) Loss of SNAP-25 and rabphilin 3a in sensory-motor cortex in Huntington's disease. *J Neurochem* 103:115-23

Song YH, Mandelkow E (1993) Recombinant kinesin motor domain binds to beta-tubulin and decorates microtubules with a B surface lattice. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:1671-5

Spang A (2008) The life cycle of a transport vesicle. *Cell Mol Life Sci* 65:2781-9

Stefan E, Wiesner B, Baillie GS *et al.* (2007) Compartmentalization of cAMP-dependent signaling by phosphodiesterase-4D is involved in the regulation of vasopressin-mediated water reabsorption in renal principal cells. *J Am Soc Nephrol* 18:199-212

Stewart PS, Costerton JW (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358:135-8

Strange K, Willingham MC, Handler JS, Harris HW Jr. (1988) Apical membrane endocytosis via coated pits is stimulated by removal of antidiuretic hormone from isolated, perfused rabbit cortical collecting tubule. *J Membr Biol* 103:17-28

Sui G, Soohoo C, Affar el B *et al.* (2002) A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:5515-20

Takahashi K, Miyoshi H, Otomo M *et al.* (2010) Suppression of dynamin GTPase activity by sertraline leads to inhibition of dynamin-dependent endocytosis. *Biochem Biophys Res Commun* 391:382-7

Tuschl T (2001) RNA interference and small interfering RNAs. *Chembiochem* 2:239-45

Valenti G, Procino G, Carmosino M *et al.* (2000) The phosphatase inhibitor okadaic acid induces AQP2 translocation independently from AQP2 phosphorylation in renal collecting duct cells. *J Cell Sci* 113 1985-92

Valenti G, Procino G, Liebenhoff U *et al.* (1998) A heterotrimeric G protein of the Gi family is required for cAMP-triggered trafficking of aquaporin 2 in kidney epithelial cells. *J Biol Chem* 273:22627-34

van Balkom BW, Savelkoul PJ, Markovich D *et al.* (2002) The role of putative phosphorylation sites in the targeting and shuttling of the aquaporin-2 water channel. *J Biol Chem* 277:41473-9

Verkman AS (2000) Physiological importance of aquaporins: lessons from knockout mice. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 9:517-522

Wade JB, Stetson DL, Lewis SA (1981) ADH action: evidence for a membrane shuttle mechanism. *Ann N Y Acad Sci* 372:106-117

Wall SM, Han JS, Chou CL *et al.* (1992) Kinetics of urea and water permeability activation by vasopressin in rat terminal IMCD. *Am J Physiol* 262:F989-998

- Watson R, Pessin JE (2001) Subcellular compartmentalization and trafficking of the insulin-responsive glucose transporter, GLUT4. *Exp Cell Res* 15;271:75-83
- Wenschuh H, Volkmer-Engert R, Schmidt M *et al.* (2000) Coherent membrane supports for parallel microsynthesis and screening of bioactive peptides. *Biopolymers* 55:188-206
- Wittig I, Schägger H (2008) Features and applications of blue-native and clear-native electrophoresis. *Proteomics* 8:3974-90
- Wumaier Z, Nübel E, Wittig I, Schägger H (2009) Chapter 8 Two-dimensional native electrophoresis for fluorescent and functional assays of mitochondrial complexes. *Methods Enzymol* 456:153-68
- Yamamoto T, Sasaki S, Fushimi K *et al.* (1995) Vasopressin increases AQP-CD water channel in apical membrane of collecting duct cells in Brattleboro rats. *Am J Physiol* 268:C1546-51
- Yasui M, Kwon TH, Knepper MA *et al.* (1999) Aquaporin-6: An intracellular vesicle water channel protein in renal epithelia. *Proc Natl Acad Sci* 96:5808-5813
- Yui N, Okutsu R, Sohara E *et al.* (2009) FAPP2 is required for aquaporin-2 apical sorting at trans-Golgi network in polarized MDCK cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 297:C1389-96
- Zamore PD (2001) RNA interference: listening to the sound of silence. *Nat Struct Biol* 8:746-50
- Zardoya R (2005) Phylogeny and evolution of the major intrinsic protein family. *Biol Cell* 97:397-414.

10 Anhang

10.1 Peptidspotmembranen

AQP2wt C-Terminus

Spot Sequenz

Spot	Sequenz
A1	S-A-K-S-L-Q-E-R-L-A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E
A2	S-L-Q-E-R-L-A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R
A3	E-R-L-A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q- S
A4	A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q- S -V-E-L
A5	K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q- S -V-E-L-H-S-P
A6	E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q- S -V-E-L-H-S-P-Q-S-L
A7	T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q- S -V-E-L-H-S-P-Q-S-L-P-R-G
A8	E-E-R-E-V-R-R-R-Q- S -V-E-L-H-S-P-Q-S-L-P-R-G-S-K-A

B1	S-A-K-S-L-Q-E-R-L-A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E
B2	S-L-Q-E-R-L-A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R
B3	E-R-L-A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q- S
B4	A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q- S -V-E-L
B5	K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q- S -V-E-L-H-S-P
B6	E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q- S -V-E-L-H-S-P-Q-S-L
B7	T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q- S -V-E-L-H-S-P-Q-S-L-P-R-G
B8	E-E-R-E-V-R-R-R-Q- S -V-E-L-H-S-P-Q-S-L-P-R-G-S-K-A

C1	S-A-K-S-L-Q-E-R-L-A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E
C2	S-L-Q-E-R-L-A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R
C3	E-R-L-A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q- S
C4	A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q- S -V-E-L
C5	K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q- S -V-E-L-H-S-P
C6	E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q- S -V-E-L-H-S-P-Q-S-L
C7	T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q- S -V-E-L-H-S-P-Q-S-L-P-R-G
C8	E-E-R-E-V-R-R-R-Q- S -V-E-L-H-S-P-Q-S-L-P-R-G-S-K-A

D1	S-A-K-S-L-Q-E-R-L-A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E
D2	S-L-Q-E-R-L-A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R
D3	E-R-L-A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q- S
D4	A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q- S -V-E-L
D5	K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q- S -V-E-L-H-S-P
D6	E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q- S -V-E-L-H-S-P-Q-S-L
D7	T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q- S -V-E-L-H-S-P-Q-S-L-P-R-G
D8	E-E-R-E-V-R-R-R-Q- S -V-E-L-H-S-P-Q-S-L-P-R-G-S-K-A

AQP2-S256D C-Terminus

Spot Sequenz

A1	S-A-K-S-L-Q-E-R-L-A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E
A2	S-L-Q-E-R-L-A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R
A3	E-R-L-A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-D
A4	A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-D-V-E-L
A5	K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-D-V-E-L-H-S-P
A6	E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-D-V-E-L-H-S-P-Q-S-L
A7	T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-D-V-E-L-H-S-P-Q-S-L-P-R-G
A8	E-E-R-E-V-R-R-R-Q-D-V-E-L-H-S-P-Q-S-L-P-R-G-S-K-A
B1	S-A-K-S-L-Q-E-R-L-A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E
B2	S-L-Q-E-R-L-A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R
B3	E-R-L-A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-D
B4	A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-D-V-E-L
B5	K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-D-V-E-L-H-S-P
B6	E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-D-V-E-L-H-S-P-Q-S-L
B7	T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-D-V-E-L-H-S-P-Q-S-L-P-R-G
B8	E-E-R-E-V-R-R-R-Q-D-V-E-L-H-S-P-Q-S-L-P-R-G-S-K-A
C1	S-A-K-S-L-Q-E-R-L-A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E
C2	S-L-Q-E-R-L-A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R
C3	E-R-L-A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-D
C4	A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-D-V-E-L
C5	K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-D-V-E-L-H-S-P
C6	E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-D-V-E-L-H-S-P-Q-S-L
C7	T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-D-V-E-L-H-S-P-Q-S-L-P-R-G
C8	E-E-R-E-V-R-R-R-Q-D-V-E-L-H-S-P-Q-S-L-P-R-G-S-K-A
D1	S-A-K-S-L-Q-E-R-L-A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E
D2	S-L-Q-E-R-L-A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R
D3	E-R-L-A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-D
D4	A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-D-V-E-L
D5	K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-D-V-E-L-H-S-P
D6	E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-D-V-E-L-H-S-P-Q-S-L
D7	T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-D-V-E-L-H-S-P-Q-S-L-P-R-G
D8	E-E-R-E-V-R-R-R-Q-D-V-E-L-H-S-P-Q-S-L-P-R-G-S-K-A

AQP2-S256D C-Terminus

Spot Sequenz

A1 S-A-K-S-L-Q-E-R-L-A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E
A2 S-L-Q-E-R-L-A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R
A3 E-R-L-A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-**A**
A4 A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-**A**-V-E-L
A5 K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-**A**-V-E-L-H-S-P
A6 E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-**A**-V-E-L-H-S-P-Q-S-L
A7 T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-**A**-V-E-L-H-S-P-Q-S-L-P-R-G
A8 E-E-R-E-V-R-R-R-Q-**A**-V-E-L-H-S-P-Q-S-L-P-R-G-S-K-A

B1 S-A-K-S-L-Q-E-R-L-A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E
B2 S-L-Q-E-R-L-A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R
B3 E-R-L-A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-**A**
B4 A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-**A**-V-E-L
B5 K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-**A**-V-E-L-H-S-P
B6 E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-**A**-V-E-L-H-S-P-Q-S-L
B7 T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-**A**-V-E-L-H-S-P-Q-S-L-P-R-G
B8 E-E-R-E-V-R-R-R-Q-**A**-V-E-L-H-S-P-Q-S-L-P-R-G-S-K-A

C1 S-A-K-S-L-Q-E-R-L-A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E
C2 S-L-Q-E-R-L-A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R
C3 E-R-L-A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-**A**
C4 A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-**A**-V-E-L
C5 K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-**A**-V-E-L-H-S-P
C6 E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-**A**-V-E-L-H-S-P-Q-S-L
C7 T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-**A**-V-E-L-H-S-P-Q-S-L-P-R-G
C8 E-E-R-E-V-R-R-R-Q-**A**-V-E-L-H-S-P-Q-S-L-P-R-G-S-K-A

D1 S-A-K-S-L-Q-E-R-L-A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E
D2 S-L-Q-E-R-L-A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R
D3 E-R-L-A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-**A**
D4 A-V-L-K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-**A**-V-E-L
D5 K-G-L-E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-**A**-V-E-L-H-S-P
D6 E-P-D-T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-**A**-V-E-L-H-S-P-Q-S-L
D7 T-D-W-E-E-R-E-V-R-R-R-Q-**A**-V-E-L-H-S-P-Q-S-L-P-R-G
D8 E-E-R-E-V-R-R-R-Q-**A**-V-E-L-H-S-P-Q-S-L-P-R-G-S-K-A

10.2 Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide

Name	Herstellung
pTrc-10xHis-Aha1	AK Prof. Beitz
pGEX4T-1-Aha1	AK Dr. Enno Klussmann
pmaxFP-Green-N	amaxa
pSilencer™4.1-CMVneoOligo2	diese Arbeit
pSilencer™4.1-CMVneoOligo3	diese Arbeit
pIRES-EGFPneo-mAQP2wt	AK Prof. Beitz
pIRES-EGFPneo-mAQP2-S256D	AK Prof. Beitz

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die Abhandlung, abgesehen von der Beratung durch den Betreuer, nach Inhalt und Form die eigene Arbeit ist. Ich habe die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Die Arbeit ist entstanden unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Nadine Fricke

Kiel, Januar 2011

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Nadine Fricke
Geburtsdatum	23. Februar 1981
Geburtsort	Jena
Nationalität	Deutsch

Schulbildung

1987 bis 1991	J. W. von Goethe-Grundschule Jena
1991 bis 1999	Ernst-Abbe-Gymnasium Jena

Studium

Oktober 1999 bis März 2006	Studium der Biochemie an der Ernst Moritz Arndt Universität Greifswald
März 2006 bis Dezember 2006	Anfertigung der Diplomarbeit in englischer Sprache mit dem Titel: „Molekulargenetische und chemotaxonomische Charakterisierung vietnamesischer Cyanobakterienstämme“

Promotion

Seit April 2007	wissenschaftliche Mitarbeiterin am pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts- Universität zu Kiel und Anfertigung einer Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. Eric Beitz
-----------------	--