

**Universitätsklinikum Hamburg – Eppendorf**

Institut für Humangenetik

Direktor: Prof. A. Gal

**Charakterisierung der Interaktionen des CFTR (Cystic Fibrosis  
Transmembrane Conductance Regulator) mit PDZ-Domänen-Proteinen**

**DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Julia Sieverding aus Kiel

Hamburg 2013

**(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)**

**Angenommen von der**

**Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 12.02.2014**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der**

**Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: PD Dr. H.-J. Kreienkamp**

**Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. P. Heisig**

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>I</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>IV</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>V</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>VI</b>
<b>1 GRUNDLAGEN UND ZIELSETZUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2 MATERIAL .....</b>	<b>8</b>
2.1 Geräte.....	8
2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	9
2.3 Medien und Zusätze.....	10
2.4 Puffer und Lösungen .....	11
2.5 Enzyme und Standards.....	13
2.6 Vektoren und Oligonukleotide.....	13
2.6.1 Oligonukleotide .....	15
2.7 Antikörper .....	19
2.8 siRNA .....	20
<b>3 METHODEN .....</b>	<b>21</b>
3.1 Molekularbiologische Methoden .....	21
3.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	21
3.1.2 DNA-Restriktion .....	22
3.1.3 DNA-Ligation .....	22
3.1.4 Transformation von Plasmid-DNA in <i>E.coli</i> .....	22
3.1.5 Plasmid-Isolation aus chemisch kompetenten <i>E.coli</i> .....	22
3.1.5.1 Mini-Präparation von DNA .....	23
3.1.6 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA.....	23
3.1.7 Agarosegelelektrophorese .....	23
3.1.8 DNA-Sequenzierung .....	24
3.1.9 Verwendung des QuickChange® II Site-Directed Mutagenesis – Kits.....	24
3.1.10 Verwendung des <i>TOPO TA Cloning</i> ® – Kits.....	25
3.1.11 Aufreinigung eines GST-Fusionsproteins .....	25

<b>3.2 Zellbiologische Methoden</b> .....	<b>26</b>
3.2.1 Kultivierung von Zellen .....	26
3.2.2 Transfektion der Zelllinien .....	26
3.2.3 Transfektion mit PIST-siRNA.....	26
<b>3.3 Proteinbiochemische Methoden</b> .....	<b>27</b>
3.3.1 Zellyse .....	27
3.3.2 Biotinylierung an der Zelloberfläche.....	27
3.3.3 Koimmunpräzipitation mit <i>RFP-Trap</i> .....	28
3.3.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page).....	28
3.3.5 Coomassie-Färbung.....	29
3.3.6 Western Blot.....	29
3.3.7 Immundetektion von Proteinen .....	29
3.3.8 <i>Enzyme-linked immuno sorbent assay</i> (ELISA).....	30
<b>4 ERGEBNISSE</b> .....	<b>32</b>
<b>4.1 Interaktionen des CFTR mit PDZ-Domänen-Proteinen</b> .....	<b>32</b>
4.1.1 Herstellung kompensatorischer Mutanten des CFTR und der PDZ-Domänen-Proteine .....	32
4.1.2 Nachweis der verschiedenen Interaktionen .....	33
<b>4.2 Koimmunpräzipitation mit PIST-Fusionsproteinen</b> .....	<b>37</b>
<b>4.3 Knockdown-Versuche von endogenem PIST</b> .....	<b>39</b>
4.3.1 Herstellung von CFTR stabil exprimierenden Zellen.....	40
4.3.2 PIST-Knockdown mit siRNA.....	40
<b>4.4 GST-Fusionsproteine</b> .....	<b>42</b>
<b>4.5 Quantifizierung des CFTR bei Koexpression mit PDZ-Domänen-Proteinen</b> .....	<b>44</b>
4.5.1 Oberflächenbiotinylierung des CFTR .....	44
4.5.2 Quantifizierung des CFTR nach Transfektion aufsteigender PIST-Mengen.....	44
4.5.3 Quantifizierung von CFTR-WT nach Co-Transfektion mit PIST .....	46
<b>4.6 CFTR-ELISA mit PIST und NHERF1</b> .....	<b>47</b>
<b>5 DISKUSSION</b> .....	<b>49</b>
<b>5.1 Diskussion des Bindungsverhaltens des PDZ-Liganden</b> .....	<b>49</b>
<b>5.2 Diskussion der CFTR-Quantifizierungen</b> .....	<b>52</b>
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>56</b>
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>58</b>
<b>8 DANKSAGUNG</b> .....	<b>62</b>

<b>9</b>	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>63</b>
----------	--	-----------

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der funktionellen Domänen des CFTR.....	3
Abbildung 2: Übersicht über intrazelluläre vesikuläre Transportwege.....	4
Abbildung 3: Schematische Darstellung des experimentellen Ansatzes für die Betrachtung einzelner PDZ-Ligand/PDZ-Domänen Interaktionen des CFTR-WT und CFTR T1478F .....	32
Abbildung 4: Interaktionen des CFTR mit verschiedenen PDZ-Domänen-Proteinen in HEK293T-Zellen .....	34
Abbildung 5: Interaktionen des CFTR $\Delta$ F508 mit verschiedenen PDZ-Domänen-Proteinen in HEK293T-Zellen.....	35
Abbildung 6: Untersuchung einer möglichen Interaktion des CFTR mit Snx27 in HEK293T-Zellen .....	36
Abbildung 7: Interaktionen des CFTR T1478F mit verschiedenen PDZ-Domänen-Proteinen in HEK293T-Zellen.....	36
Abbildung 8: Schematische Darstellung der verwendeten PIST-Fusionsproteine in Aminosäuren (AS).....	38
Abbildung 9: Koimmunpräzipitation von PIST-Fusionsproteinen mit CFTR-WT in HEK293T-Zellen .....	39
Abbildung 10: Interaktionen von CFTR-WT und PIST-WT sowie H341V nach Knockdown von endogenem PIST .....	41
Abbildung 11: Immunpräzipitation von PIST mit GST-Fusionsproteinen .....	42
Abbildung 12: Quantifizierung von CFTR-T1478F nach Transfektion verschiedener PIST-H341V-Mengen in stabil den Kanal exprimierende HEK293-Zellen .....	45
Abbildung 13: Quantifizierung von CFTR-WT nach Transfektion von PIST-WT und PIST- H341V in HEK293T-Zellen. ....	46
Abbildung 14: Quantifizierung des RFP-CFTR nach Koexpression mit PIST und NHERF1 durch ELISA.....	48

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Geräte .....	8
Tabelle 2: Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	9
Tabelle 3: Medien und Zusätze für molekularbiologische Methoden.....	10
Tabelle 4: Medien und Zusätze für zellbiologische Arbeiten.....	11
Tabelle 5: Puffer und Lösungen .....	11
Tabelle 6: Enzyme und Standards .....	13
Tabelle 7: Vektoren .....	13
Tabelle 8: Erstantikörper .....	19
Tabelle 9: Zweitantikörper .....	19
Tabelle 10: PCR-Ansatz .....	21
Tabelle 11: Zusammensetzung SDS-Page.....	28
Tabelle 12: Transfektionsschema für ELISA .....	30

## Abkürzungsverzeichnis

<b>ABC-Transporter</b>	<i>ATP-binding cassette</i> -Transporter
<b>AMP/cAMP/ADP/ATP</b>	(cyclisches) Adenosin-5'-monophosphat/ Adenosin-5'-diphosphat /Adenosin-5'-Triphosphat
<b>BHK</b>	<i>baby hamster kidney</i>
<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin
<b>CAL</b>	CFTR- assoziierter Ligand; Synonym für PIST
<b>CAVD</b>	<i>congenital absence of the vas deferens</i>
<b>CC</b>	<i>coiled coil</i> (Proteindomäne)
<b>CFTR</b>	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator</i>
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>DNA/cDNA</b>	(copy) Desoxyribonukleinsäure
<b>EBP50</b>	<i>ERM-binding phosphoprotein 50</i> , Synonym für NHERF1
<b>E. coli</b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>ECL</b>	Elektrochemilumineszenz
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-linked immuno sorbent assay</i>
<b>ER</b>	Endoplasmatisches Retikulum
<b>ERGIC</b>	<i>ER-Golgi-Intermediate-Compartment</i>
<b>ERM</b>	Ezrin, Radixin, Moesin
<b>FCS/FBS</b>	<i>Fetal Calf Serum/Fetal Bovine Serum</i>
<b>FIG</b>	<i>Fused In Glioblastoma</i> ; Synonym für PIST
<b>GFP/ eGFP</b>	(enhanced) <i>Green Fluorescent Protein</i>
<b>GOPC</b>	<i>Golgi-associated PDZ and coiled-coil motif containing protein</i> , Synonym für PIST
<b>GP</b>	<i>Guinea Pig</i> ; Meerschweinchen

<b>GTP</b>	Guanosin-5' -triphosphat
<b>HBSS</b>	<i>Hanks Balanced Salt Solution</i>
<b>HEK</b>	<i>Human Embryonic Kidney</i>
<b>HRP</b>	<i>Horseradish Peroxidase</i>
<b>kDa</b>	Kilodalton (in der Biochemie gebräuchliche Masseinheit; 1Dalton = 1u)
<b>LB</b>	<i>Lysogeny Broth</i>
<b>NBD</b>	Nukleotid-bindende Domäne
<b>NHERF1</b>	<i>Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange regulatory factor 1</i>
<b>NTP/ dNTP/ ddNTP</b>	(desoxy/didesoxy) Nukleosidtriphosphat
<b>OD</b>	optische Dichte
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PDL</b>	Poly – D- Lysin
<b>PDZ</b>	PSD - 95 / Discs Large / Zonula Occludens – 1
<b>PDZK1</b>	<i>PDZ-domain containing protein in kidney 1</i>
<b>PIST</b>	<i>Protein Interacting Specifically With TC10</i>
<b>PKA</b>	Proteinkinase A
<b>PMSF</b>	Phenylmethylsulfonylfluorid
<b>R-Domäne</b>	Regulatorische Domäne
<b>RFP/mRFP</b>	(monomeres) rot fluoreszierendes Protein
<b>RIPA</b>	<i>Radioimmunoprecipitation Assay Buffer</i>
<b>RNA (m/siRNA/RNAi)</b>	<i>Ribonucleic Acid (messengerRNA /short interfering RNA/ RNAInterference)</i>
<b>SDS -PAGE</b>	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
<b>Snx27</b>	<i>Sorting Nexin 27</i>

<b>SOB</b>	<i>super optimal broth</i>
<b>SOC</b>	SOB + Glukose
<b>TAE- Puffer</b>	Tris-Acetat-EDTA- Puffer
<b>Taq</b>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
<b>TBST</b>	<i>Tris-Buffered Saline and Tween 20</i>
<b>TEMED</b>	Tetramethylethylendiamin
<b>TGN</b>	Trans-Golgi-Netzwerk
<b>TMB</b>	Tetramethylbenzidin
<b>TMD</b>	Transmembrandomäne
<b>Tris</b>	Abkürzung für Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>WB</b>	Western Blot
<b>WT</b>	Wildtyp

# 1 Grundlagen und Zielsetzung

---

Für das *CFTR* (engl. *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) -Gen sind vielerlei Mutationen unterschiedlicher Art bekannt, die verschiedene Konsequenzen nach sich ziehen. Die in diesem Zusammenhang bekanntesten und häufigsten Krankheiten sind die Zystische Fibrose (auch: Mukoviszidose) und die CAVD (engl. *congenital bilateral absence of the vas deferens*). Allein für die Zystische Fibrose sind über 1000 ursächliche Mutationen identifiziert. Die mit ca. 70% am häufigsten vorkommende ist die Deletion der Aminosäure Phenylalanin an Position 508 des CFTR ( $\Delta F508$ ). Diese Mutation führt zu einer fehlerhaften Raumstruktur des Proteins und so oft zu einer Retention des Kanals im endoplasmatischen Retikulum (ER) (Cheng et al., 1990). Je nach Schweregrad des genetischen Defektes kommt es zur Ausprägung unterschiedlicher Symptomatiken, die im Folgenden näher erläutert werden.

Der CFTR kommt an der Zelloberfläche sezernierender Epithelien vor, zum Beispiel in der Lunge, dem Pankreas, den Geschlechtsorganen sowie den Schweißdrüsen. Seine Funktion liegt dabei im Transport von negativ geladenen, osmotisch aktiven Chloridionen über die Zellmembran. Werden Chloridionen in den extrazellulären Raum sezerniert, so bewirkt dieses einen Nachstrom von Wasser aus der Zelle heraus. Diese Anreicherung mit Wasser ist für das in den sezernierenden Epithelien gebildete Sekret wichtig, um eine gewisse Fluidität zu gewährleisten und somit auch den Abtransport aus der Drüse. Ist der Transport der Chlorid-Ionen in den extrazellulären Raum durch einen mutierten und somit nicht mehr voll funktionsfähigen CFTR gestört, so strömt kein Wasser mehr nach und es kann sich kein ausreichend flüssiges Sekret bilden. Man spricht dann vom Krankheitsbild der Mukoviszidose. Dieses hat in den unterschiedlichen Organen verschiedene Auswirkungen. Für die Lunge bedeutet das, dass der zähe Mukus der Bronchialdrüsen nicht ausreichend von den Zilien des Flimmerepithels befördert werden kann, was den Abtransport von Bakterien, Staub und anderen Partikeln aus der Lunge erschwert und zu Erkrankungen wie rezidivierenden Pneumonien führt. Eine Beteiligung des Pankreas äußert sich hauptsächlich in Mangelernährung und Verdauungsstörungen, da das Pankreassekret mit den

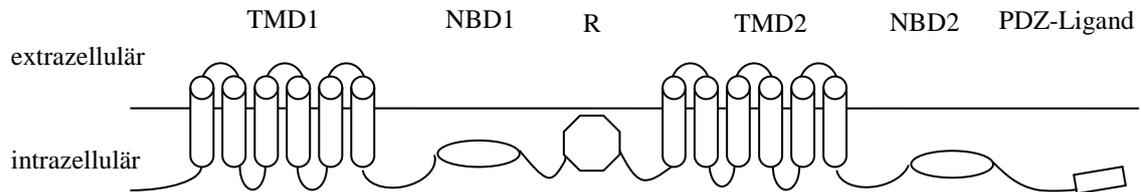
Verdauungsenzymen ebenfalls zu dickflüssig ist, als dass es den Nahrungsbrei zersetzen könnte. Weiterhin kann es durch Störung der endokrinen Funktion des Pankreas zu einem Insulin-Mangel und somit zu einem Diabetes mellitus kommen.

Der Erbgang der Zystischen Fibrose ist autosomal rezessiv; viele Patienten sind komplex heterozygot. Das heißt, dass auch zwei verschiedene Mutationen auf den beiden Allelen des für den CFTR kodierenden Gens zur Ausprägung der Erkrankung führen können. Das *CFTR*-Gen befindet sich auf Chromosom 7 in der Region q31.2 (Riordan et al., 1989). Das translatierte reife Protein hat eine Länge von 1480 Aminosäuren und eine Masse von 168 kDa, die sich durch posttranslationale Modifikationen noch weiter erhöht. In Deutschland liegt die Erkrankungsquote bei Neugeborenen bei etwa 1:2000; die Zystische Fibrose ist damit die zweithäufigste angeborene Stoffwechselerkrankung unter hellhäutigen Menschen. Eine kurative Therapie gibt es bis heute nicht. Durch symptomatische Behandlung gelingt es heutzutage, ein Lebensalter von bis zu 50 Jahren zu erreichen.

Der CFTR vereint verschiedene Charakteristika von unterschiedlichen Gruppen von Transportern und Kanälen in sich, die ihn in seiner Funktionsweise einzigartig machen. Die Zugehörigkeit des CFTR zur Gruppe der ABC-Transporter (engl. *ATP-binding cassette*, ATP = Adenosin-Triphosphat) zeigt sich primär in seiner Struktur. Diese Gruppe beinhaltet Membranproteine, die als gemeinsames Element eine ATP-bindende Kassette besitzen. Die meisten dieser Proteine transportieren aktiv Stoffe über die Zellmembran, das heißt unter Verbrauch von Energie. Diese wird durch die Bindung und Hydrolyse von ATP an der ABC-Einheit bereitgestellt. An diesem Punkt jedoch unterscheidet sich der CFTR von den meisten anderen ABC-Transportern. Als Folge der ATP-Hydrolyse tritt hier kein aktiver Transport ein, sondern ein Zyklus aus Öffnen und Schließen einer Pore, durch die Chlorid-Ionen die Zellmembran passieren können. Diese Tatsache ordnet den CFTR somit der Gruppe der Liganden-gesteuerten Ionenkanäle zu.

Der CFTR-Kanal setzt sich aus zwei Untereinheiten mit jeweils sechs Transmembrandomänen (TMD) zusammen, welche den Ionenkanal bilden. Des Weiteren besitzt er zwei Nukleotid-Bindedomänen (NBD 1 und 2), an die ATP binden kann, sowie eine intrazellulär gelegene regulatorische Domäne (R). Diese kann von dem

Enzym Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert werden, was zu einer Aktivierung des Kanals führt.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der funktionellen Domänen des CFTR**

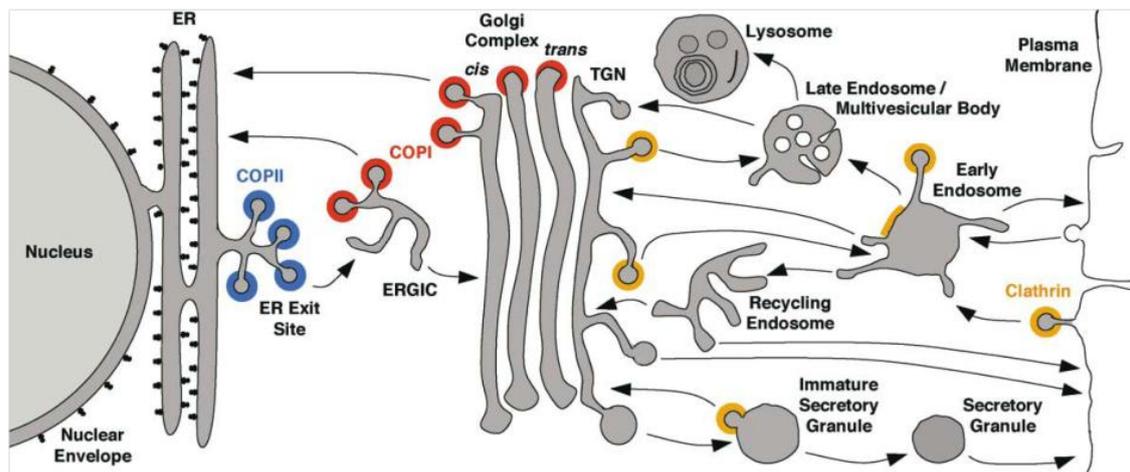
TMD: Transmembrandomäne; NBD: Nukleotid-Bindedomäne; R: Regulatorische Domäne; PDZ-Ligand: PSD-95, *discs large, zonula occludens-1*, am C-Terminus des CFTR.

Binden nun ATP-Moleküle an eine NBD, so führt dieses zur Dimerbildung mit der zweiten NBD. Dabei können zwei ATP-Moleküle in Taschen an der Grenze zwischen den beiden NBDs gebunden sein. Die Dimerisierung bewirkt eine Konformationsänderung des CFTR von einer nach innen gerichteten Konformation hin zu einer Porenbildung durch die TMD. Die Pore bleibt so lange bestehen, bis das gebundene ATP hydrolysiert ist und die Produkte, ADP und Phosphat, freigelassen sind. Dadurch zerfällt das NBD-Dimer und der CFTR geht zurück in die geschlossene Konformation. Der genaue Mechanismus, über den die regulatorische Domäne auf diesen Zyklus der Kanalöffnung Einfluss nehmen kann, ist nicht vollständig geklärt. Tatsache ist, dass eine durch die PKA phosphorylierte R-Domäne die Dimerisierung der NBD beschleunigt bzw. im unphosphorylierten Zustand verlangsamt. Vermutlich gibt es jedoch zusätzlich noch andere Wege, über die die Domäne in den Öffnungszyklus des CFTR eingreifen kann.

Zum Verständnis und letztendlich zur Entwicklung einer Therapie der Zystischen Fibrose ist es wichtig, diejenigen Faktoren zu kennen, die auf die Expression des CFTR an der Zelloberfläche Einfluss nehmen, da der CFTR  $\Delta F508$  durchaus funktionsfähig sein kann, wenn er bis an die Zelloberfläche kommt. Der Kanal interagiert während der Beförderung zur Zellmembran mit verschiedenen membranassoziierten Proteinen, die sein Transportziel beeinflussen können. Außerhalb der erwähnten funktionellen Domänen weist der CFTR noch mehrere Domänen auf, an denen eine Interaktion mit weiteren Proteinen stattfinden kann. Für diese Arbeit am bedeutsamsten ist der PSD-95,

*discs large, zonula-occludens-1* (PDZ)-Ligand am intrazellulär gelegenen C-Terminus des Kanals.

Für die Bindung an den PDZ-Liganden sind sogenannte PDZ-Domänen verantwortlich; dabei handelt es sich um zwischen 80 und 90 Aminosäuren lange Sequenzen, die erstmals in den Proteinen PSD95/SAP90, dem *Drosophila* Tumorsuppressor dlg-A und dem *tight-junction*-Protein ZO-1 identifiziert wurden. Ihnen wird eine Funktion als Gerüstproteine zugeschrieben. Innerhalb eukaryotischer Zellen gibt es unterschiedliche Transportwege, die einen Molekülaustausch zwischen den einzelnen Zellkompartimenten bewerkstelligen (s. Abb. 2). Verschiedenen in dieser Arbeit näher betrachteten Proteinen kommen dabei unterschiedliche Funktionen zu.



**Abbildung 2: Übersicht über intrazelluläre vesikuläre Transportwege**

Farblich gekennzeichnet die intrazelluläre Lokalisation der Hüllproteine Clathrin (gelb), COP I (*coat protein I*, rot) und COP II (blau); ER = Endoplasmatisches Retikulum; ERGIC = *ER-Golgi-intermediate compartment*; TGN = Trans-Golgi-Netzwerk (Bonifacino & Glick, 2004) .

PIST (*PDZ domain protein interacting specifically with TC10*), auch beschrieben unter den Akronymen FIG (*fused in glioblastoma* (Charest et al., 2001), GOPC (*Golgi-associated PDZ- and coiled-coil motif-containing protein* (Yao et al., 2001) und CAL (*CFTR associated ligand* (Cheng et al., 2002), ist ein am Golgi-Apparat lokalisiertes Protein. Ihm wird eine Rolle beim Transport des CFTR zu den Lysosomen zugeschrieben. Es hat eine Länge von 462 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 55 kDa. Für Antagonisten dieses Proteins wird die Rolle als Pharmaka für die

Behandlung der Zystischen Fibrose diskutiert, da diese den Abbau des funktionsfähigen Rezeptors inhibieren könnten und den Zellen somit wieder mehr CFTR zur Verfügung stünde.

NHERF 1 (*Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor isoform 1*), auch bekannt als EBP50 (*ezrin-binding-protein, 50kDa*), ist ein Protein, welches an der Plasmamembran lokalisiert ist. Von dort aus kann es Einfluss nehmen auf die Signalwege von G-Proteingekoppelten Rezeptoren (Ardura & Friedman, 2011). Auch eine Interaktion mit dem CFTR findet dort statt (Wang et al. 2000, Raghuram et al. 2001 und Bezprozvanny & Maximov 2001). Außerdem fördert NHERF 1 das postendozytotische Recycling seiner Liganden und wird somit als funktioneller Gegenspieler von PIST gehandelt.

Shank 2, welches ebenfalls in sezernierenden Epithelien vorkommt, scheint neben der Inhibierung der cAMP-induzierten Phosphorylierung und somit Unterdrückung der CFTR-Aktivierung auch den Transport des CFTR von der Zellmembran zu frühen Endosomen hin zu fördern (Kim et al., 2004).

PDZK1 (*PDZ-domain containing protein*, auch NHERF 3 oder CAP70 (*CFTR-associated protein of 70kDa*)) kann über 3 seiner 4 PDZ-Domänen ebenfalls an der Zellmembran Einfluss auf die CFTR-Aktivität nehmen, indem es zwei CFTR-Kanäle untereinander verbindet (Wang et al., 2000).

Snx27 (*Sorting Nexin 27*) ist ein zytoplasmatisches PDZ-Protein, welches für das Recycling seiner Liganden verantwortlich ist (Lunn et al. 2007, Lauffer et al. 2010 und Temkin et al. 2011). Es konnte bereits in anderen Arbeiten gezeigt werden, dass Snx27 mit verschiedenen Rezeptoren, die auch mit PDZ-Proteinen wie PIST interagieren, eine Bindung eingehen kann, wie zum Beispiel mit dem SSTR5. Eine Interaktion mit dem CFTR ist bisher nicht beschrieben, wäre aber sehr interessant, um eventuell so einen für das Recycling von funktionsfähigem CFTR entscheidenden Faktor in der Therapie der Zystischen Fibrose zu haben.

## ZIELSETZUNG

Untersuchungen aus der Arbeitsgruppe an einem weiteren Interaktionspartner von PIST, dem Somatostatinrezeptor Subtyp 5, konnten die oben beschriebene Beobachtung, dass eine Überexpression von PIST eine verminderte Oberflächenexpression seines assoziierten Membranproteins zur Folge hat, nicht bestätigen. Auch eine Steigerung der Rezeptor-Expression bei Abwesenheit von PIST (wie im Falle des CFTR beschrieben; Cheng et al. 2004, Cheng et al. 2005 und Wolde et al. 2007) konnte nicht reproduziert werden. Dieses führte zu der Überlegung, dass PDZ-Proteinen wie PIST offenbar nicht nur eine einzige definierte Funktion in der Wirkung auf ihre Bindungspartner zugeschrieben werden kann, sondern dass sie je nach Rezeptor unterschiedliche Wirkungen haben können (Abbau im Falle des CFTR, kein Abbau im Falle des SSTR5). Ein detailliertes Verständnis des Interaktionsnetzwerks innerhalb der Zelle ist essentiell dafür, in Zukunft in dieses Netz eingreifen zu können und die jeweiligen Vorgänge beeinflussen zu können. So liegt der Fokus dieser Arbeit auf dem CFTR, der bei den oben erwähnten Erkrankungen aufgrund von Fehlfaltungen im Protein entweder direkt dem lysosomalen Abbau zugeführt wird oder aber es zumindest kurzzeitig an die Zelloberfläche schafft, wo er eingeschränkt funktionsfähig ist. Wären also nicht nur die Regulatoren selbst bekannt, die sowohl positiv als auch negativ mit dem CFTR in einem der Zellkompartimente interagieren, sondern auch das genaue Bindungsverhalten, die dafür wichtigen strukturellen Eigenschaften sowie eventuell weitere Einflussfaktoren, so könnten sich Schnittstellen ergeben, an denen man in das Netzwerk eingreifen kann. Hierdurch könnte es möglich werden, in den Pathomechanismus von Erkrankungen wie der Zystischen Fibrose einzugreifen und den Patienten eine Linderung der Symptome zu verschaffen.

Aus diesem Grund beschäftigt sich diese Arbeit näher mit der Charakterisierung des Bindungsverhaltens des CFTR zu PDZ-Domänen-Proteinen, die eine wichtige Gruppe der Interaktionspartner in der Zelle darstellen. Zunächst soll durch den Einsatz kompensatorischer Mutanten die PDZ-Interaktion zwischen Rezeptor und den Proteinen PIST, PDZK1, NHERF1 und Shank2 untersucht werden. Eine mögliche Bindung von Snx27 an den CFTR soll durch Koimmunpräzipitation getestet werden. Im Anschluss

daran wird mithilfe von Fusionsproteinen von PIST, die unterschiedliche Domänen enthalten, sowie mit siRNA eine eventuelle Interaktion außerhalb der PDZ-Domäne des Proteins im Western Blot untersucht. Abschließend folgen Versuche, in denen die CFTR-Menge nach Koexpression mit PIST und NHERF1 quantifiziert wird. Dieses soll sowohl im Western Blot als auch mittels ELISA geschehen.

Da es zu diesen Interaktionen noch viele ungeklärte Beobachtungen gibt, soll es das Ziel dieser Arbeit sein, einen weiteren Beitrag zum Verständnis der für die Expression des CFTR in Zellen wichtigen Faktoren zu leisten.

## 2 Material

---

### 2.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Geräte	Hersteller
Autoklav	Tecnomara, Fernwald, D
CO <sub>2</sub> Water-Jacketed Inkubator	Nuaire US AUTOFLOW, USA
Elektrophoreseapparaturen für	
Agarosegele	BioRad, München, D
Polyacrylamidgele	BioRad, München, D
Filmentwickler OPTIMAX X-Ray Film Processor	Protec, Oberstenfeld-Gronau, D
Geldokumentationssystem	Bachofer, Reutlingen, D
Heizbad	Wilke, Hamburg, D
Inkubationsschüttler Multitron	Infors, CH
pH-Meter	WTW, Weilheim, D
Photometer BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, D
Sequenziergerät ABI PRISM 3130	Applied Biosystems, Darmstadt, D
DNASEQUENCER	
Sterilwerkbänke	
HERA safe Typ 12/2, 1995	Heraeus, Hanau, D
Lamin Air Instruments	Heraeus, Hanau, D
Stromversorgungsgerät Power Pac Basic 300	Biorad, München, D
Thermocycler Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg, D
Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg, D
Waage Mettler PE 3600	Mettler, Gießen, CH
Zentrifugen	
Tischzentrifuge Mikro 20	Hettich, Tuttlingen, D
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, D

## 2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Chemikalie	Hersteller
40% (w/v) Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid (19:1)	Roth, Karlsruhe, D
Agar (Select)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe, D
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Bacto-Trypton	AppliChem, Darmstadt, D
Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP)	Invitrogen, Karlsruhe, D
ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific, Waltheim, USA
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt, D
EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin	Thermo Scientific, Waltheim, USA
EZview Red Streptavidin Affinity Gel	Thermo Scientific, Waltheim, USA
GFP-Trap <sup>®</sup>	ChromoTek, Martinsried, D
Kanamycinsulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Leupeptin	Roche, Mannheim, D
Lipofectamine RNAiMAX	Invitrogen, Karlsruhe, D
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe, D
Pepstatin A	Roche, Mannheim, D
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roche, Mannheim, D
Poly-D-Lysinhydrobromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
RFP-Trap <sup>®</sup>	ChromoTek, Martinsried, D
Triton X-100	Roth, Karlsruhe, D
TurboFect	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
100 mm Polystyrol-Zellkulturschalen	Sarstedt, Nümbrecht, D
6-Loch- und 12-Loch-Zellkulturschale	Sarstedt, Nümbrecht, D
Agarplatten	Greiner, Essen, D
Einwegpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Falcontubes (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
F96 Maxisorp Immuno-Plate	Nunc, Roskilde, DK
Kulturröhrchen (14 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
PROTRAN <sup>®</sup> Nitrocellulose Transfer Membrane	GE Healthcare, Dassel, D
PCR-Tubes (0,5 ml)	Biozym Diagnostik GmbH
Pipettenspitzen	Oldenburg, D
Röntgenfilme (Cronex 5)	Agfa, Düsseldorf, D

## 2.3 Medien und Zusätze

**Tabelle 3: Medien und Zusätze für molekularbiologische Methoden**

<b>Medien und Zusätze für Bakterienkultivierung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
LB-Medium	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl pH 7,5
LB-Agar	LB-Medium 15 g/l Agar-Agar pH 7,5
SOC-Medium	20 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 0,5 g/l NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> 20 mM Glucose pH 7,0

Ampicillin-Stocklösung	100 mg/ml Ampicillin 70 % Ethanol
Kanamycin-Stocklösung	100 mg/ml Kanamycin 70 % Ethanol

**Tabelle 4: Medien und Zusätze für zellbiologische Arbeiten**

<b>Medien und Zusätze für die Zellkultur</b>	<b>Zusammensetzung</b>
DMEM	Lonza, Walkersville, USA
FBS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
HBSS	PAA, Cölbe, D
Opti-MEM <sup>®</sup> I serumreduziertes Medium mit GlutaMAX I	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe, D
Penicillin/Streptomycin (100 U/ml / 100 mg/ml)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Trypsin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D

## 2.4 Puffer und Lösungen

**Tabelle 5: Puffer und Lösungen**

<b>Puffer und Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>
5x KCM	0,5 M KCl, 0,15 M CaCl <sub>2</sub> , 0,25 M MgCl <sub>2</sub>
TAE-Puffer	100 mM Tris, 5 mM EDTA (pH 8,0)
Versenepuffer	137 mM NaCl, 8,8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2,7 mM KCl, 0,7 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1 mM EDTA
PBS	137 mM NaCl, 8,8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2,7 mM KCl, 0,7 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
RIPA-Puffer	150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 0,5% Natriumdeoxycholat, 0,1% SDS, 50 mM Tris/HCl (pH 8,0), Proteaseinhibitoren (10 µg/ml Leupeptin, 100 µM PMSF, 1 µg/ml Pepstatin A)

5 x Lämmli-puffer	300 mM Tris-HCl pH 6,8, 50% (v/v) Glycerin, 500 mM DTT, 7,5% (w/v) SDS, 0,5% (w/v) Bromphenolblau
Laufpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycerin, 0,1% (w/v) SDS (pH 8,3)
Transferpuffer	20% Methanol, 9 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,02% SDS
TBS-T	150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8, 0,2% Tween 20
Poly-D-Lysin-Lösung	0,1 mg/ml PDL In H <sub>2</sub> O

<b>Lösungen zur Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli (Mini-Präparation)</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Lösung I	50 mM Tris-HCl pH 8 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A
Lösung II	200 mM NaOH 1 % SDS (w/v)
Lösung III	3 M Kaliumacetat pH 5,5

<b>Lösungen für Coomassie-Färbung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Coomassie-Färbelösung	10% Eisessigsäure 40% Methanol 0,1% Coomassie R-250
Coomassie-Entfärbelösung	40% Methanol 10% Eisessig

## 2.5 Enzyme und Standards

**Tabelle 6: Enzyme und Standards**

<b>Enzyme</b>	<b>Hersteller</b>
Calf Intestine Alkaline Phosphatase	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Restriktionsendonukleasen	Fermentas, St. Leon-Rot, D New England Biolabs, Ipswich, USA
PfuULTRA HF DNA Polymerase	Stratagene, Waldbronn, D
T4 DNA-Ligase	Fermentas, Burlington, CDN
T4 Polynukleotidkinase	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Taq DNA Polymerase	Qiagen, Hilden, D

<b>Standard</b>	<b>Hersteller</b>
PageRuler Plus Prestained Protein	Fermentas, St. Leon-Rot, D
100 bp DNA-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe, D
1 kb DNA-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe, D

## 2.6 Vektoren und Oligonukleotide

**Tabelle 7: Vektoren**

<b>Zur Verfügung gestellte Konstrukte</b>	<b>Herkunft</b>
pcDNA3-CFTR-WT	B. Kleizen, Utrecht University, Utrecht
pcDNA3-CFTR $\Delta$ F508	B. Kleizen, Utrecht University, Utrecht
peGFP-PIST	AG Kreienkamp, UKE, Hamburg
peGFP-PIST N-CC-link	AG Kreienkamp, UKE, Hamburg
peGFP-PIST CC	AG Kreienkamp, UKE, Hamburg
peGFP-PIST link-PDZ-C	AG Kreienkamp, UKE, Hamburg
peGFP-PIST PDZ	AG Kreienkamp, UKE, Hamburg
peGFP-PIST PDZ-C	AG Kreienkamp, UKE, Hamburg

peGFP-PIST link	AG Kreienkamp, UKE, Hamburg
peGFP-PIST H341V	AG Kreienkamp, UKE, Hamburg
peGFP-PDZK1	AG Kreienkamp, UKE, Hamburg
peGFP-PDZK1 H301V	AG Kreienkamp, UKE, Hamburg
peGFP-N3 SNX27	AG Kreienkamp, UKE, Hamburg
peGFP-N3 SNX27 H112V	AG Kreienkamp, UKE, Hamburg
pcDNA3.1-Shank 2	AG Kreienkamp, UKE, Hamburg
pGEX-4T2	GE Healthcare, Dassel, D

<b>Ausgangsvektoren für eigens hergestellte Konstrukte</b>	<b>Kommentar</b>	<b>Herkunft</b>
peGFP-C3	eGFP-Tag, CMV Promoter, Kan <sup>R</sup> , zur Herstellung von GFP- NHERF1-Konstrukten	Clontech
pmRFP-C1	mRFP-Tag, CMV Promoter, Kan <sup>R</sup> , zur Herstellung von RFP-CFTR- Konstrukten	AG Kreienkamp, UKE, Hamburg
pCMV-SPORT6 NHERF1	Kan <sup>R</sup> , zur Herstellung von GFP- NHERF1 -Konstrukten	AG Kreienkamp, UKE, Hamburg
pcDNA3.1-Shank 2	Zur Herstellung von pcDNA3.1- Shank2 H699V	AG Kreienkamp, UKE, Hamburg

### 2.6.1 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden als Auftragssynthese von der Firma Sigma-Aldrich hergestellt.

Bei der PCR-Amplifizierung der NHERF-cDNA zur späteren Klonierung in den GFP-Vektor wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

JS-NHERF-XhoI-fwd:

5' – AAAA **CTC GAG** ATG AGC GCG GAC GCA GCG GCC – 3'

JS-NHERF-BamHI-rev

5' – TTT T **GG ATC C** TC AGA GGT TGC TGA AGA GTT CGT TTT TCT TGC – 3'

Fett gedruckt die Schnittstellen von XhoI und BamHI

Folgende Primer dienen dem Einfügen der Mutation in den für die PDZ-Domänen kodierenden Bereich von

#### 1. GFP-NHERF:

JS-NHERF-fwd

5' – C GTG GAG AAG GAG ACC **GTC** CAG CAG GTG GTG AGC CGC – 3'

JS-NHERF-rev

5' - GCG GCT CAC CAC CTG CTG **GAC** GGT CTC CTT CTC CAC G - 3'

#### 2. Shank2:

JS-mutShank2-fwd

5' - GTC GTC AAG GTG GGC **GTC** AGG CAG GTG GTG AAC – 3'

JS-mutShank2-rev

5' - GTT CAC CAC CTG CCT **GAC** GCC CAC CTT GAC GAC – 3'

Fett gedruckt die jeweils mutierten Basen

Zur Klonierung der mRFP-cDNA in den CFTR-WT-pcDNA3-Vektor wurden NotI-Schnittstellen mit folgenden Primern eingefügt:

JS-NotI-RFP-fwd

5' - TTT T **GC GGC CGC** AGC ATG GCC TCC TCC GAG GAC G – 3'

JS-RFP-NotI-rev

5' - TTT T **GC GGC CGC** CTC GAG AGC GGC CCT CGG C - 3'

Fett gedruckt die NotI-Schnittstellen

Zum Einfügen der Mutation im für den PDZ-Liganden des CFTR kodierenden Bereich wurden diese Primer verwendet:

JS-CFTRmut-fwd

5' - GAA GAA GAG GTG CAA GAT **TTC** AGG CTT TAG AGA GCA GC – 3'

JS-CFTRmut-rev

5' - GCT GCT CTC TAA AGC CTG **AAA** TCT TGC ACC TCT TCT TC – 3'

Fett gedruckt die mutierten Basen

Für Sequenzierungen wurden folgende Primer verwendet:

1. Shank2:

JS-Shank2-Seq-1

5' – CCTCGAGGTACGATGCGAAGG – 3'

JS-Shank2-Seq-2

5' – CCGCTATTGCCTACCCCTGG – 3'

JS-Shank2-Seq-3

5' – GACACCCCTCAGCCCCCTTC – 3'

JS-Shank2-Seq-4

5' - CCC TCC ACA GTG CCA GAA GGC – 3'

T7-Primer

5' – TAATACGACTCACTATAGG - 3'

2. CFTR:

T7-Primer

5' – TAATACGACTCACTATAGG - 3'

JS-CFTR-Seq1

5' - CAT TGG CAC ATT TCG TGT G – 3'

JS-CFTR-Seq2

5' - GAC AGT TGT TGG CGG TTG C – 3'

JS-CFTR-Seq3

5' - CCA TTG TGC AAA AGA CTC CC – 3'

JS-CFTR-Seq4

5' - CTC AAC ACG TTG AAA GCA G – 3'

JS-CFTR-Seq5

5' - C ACA GCA AAA TAC ACA GAA GG – 3'

pcDNArev

5'-GGCTGGCAACTAGAAGGC-3'

Zur Klonierung von Expressionsvektoren für die Expression von GST-Fusionsproteinen mit C-terminalem PDZ-Ligand wurden die folgenden Primer genutzt:

Für die PDZ-Mutante:

JS-GSTmut1

5' - GA TCC GAA GAA GAG GTG CAA GAT TTC AGG CTT TAG TCT AGA ACT  
CGA GCG GCC GCA TCG TGA CTG ACT GAC GAT CTG CCT CGC GCG TTT  
CGG TGC – 3'

JS-GSTmut2

5' – GGCC GC AC CGA AAC GCG CGA GGC AGA TCG TCA GTC AGT CAC  
GAT GC GGCC GCT CGA GT T CTA GA C TAA AGC CT GAA A TCT TGC ACC  
TCT TCT TCG– 3'

Rosa: NotI, blau: XbaI, grün: XhoI, rot: BamHI

Primer zum Sequenzieren der pGEX-Vektoren:

pGEX4T2 fwd

5' - GGA CCC AAT GTG CCT GGA TG – 3

## 2.7 Antikörper

Tabelle 8: Erstantikörper

Primärantikörper	Hersteller	Generiert in	Verdünnung für Western Blot	Verdünnung für ELISA
GFP	Covance, Princeton, USA	mouse	1:2000	-
RFP	ChromoTek, Planegg-Martinsried, D	rat	1:3000	1:2000
CFTR-AK 660	Tim Jensen, University of North Carolina, Chapel Hill	mouse	1:1500	-
Anti-STRIP-PDZ (90.Tag)	AG Kreienkamp	rabbit	1:5000	-
Anti-PIST ms8	AG Kreienkamp	guinea pig	1:6000	-
GAPDH	Abcam, Cambridge, UK	mouse	1:6000	-
Anti-Transferrinrezeptor-Antikörper	Invitrogen, Karlsruhe, D	mouse	-	1:500
Anti-Actin-Antibody	Abcam, Cambridge, UK	mouse	1:1000	-

Tabelle 9: Zweitantikörper

Sekundärantikörper	Hersteller	Western Blot
HRP- $\alpha$ mouse	Jackson ImmunoResearch, Newmarket, UK	1:2500
HRP- $\alpha$ rat	Jackson ImmunoResearch, Newmarket, UK	1:2500
HRP- $\alpha$ rabbit	Jackson ImmunoResearch, Newmarket, UK	1:2500
HRP- $\alpha$ guinea pig	Jackson ImmunoResearch, Newmarket, UK	1:2500

## 2.8 siRNA

Die in dieser Arbeit verwendete doppelsträngige siRNA entstammt der Firma Qiagen. Die PIST-siRNA zum Knockdown von endogenem PIST hatte folgende Zielsequenz, dargestellt ist der *sense*-Strang:

TCCATTGTAGCAGACCCGAAA (human)

## 3 Methoden

---

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion dient der Vervielfältigung von DNA-Fragmenten *in vitro*. Die Amplifikation erfolgt zwischen zwei bekannten Oligonukleotidsequenzen (Primern) durch eine thermostabile DNA-Polymerase. Der Reaktionsansatz setzte sich in dieser Arbeit immer folgendermaßen zusammen:

Tabelle 10: PCR-Ansatz

Reagenz	Menge
10 x <i>Reaction Buffer</i>	5 µl
10 mM dNTP	1 µl
100 µM <i>Forward Primer</i>	0,5 µl
100 µM <i>Reverse Primer</i>	0,5 µl
<i>Template</i> -DNA	10-50 ng
2,5 U/µl DNA-Polymerase	1 µl
Aqua dest.	ad 50 µl

Ein PCR-Zyklus beginnt mit der Denaturierung des DNA-Doppelstrangs in zwei Einzelstränge durch Erhitzung auf 95°C für 30 s. Anschließend erfolgt das Hybridisieren der Primer (*annealing*) bei 55-65°C für 30 s. Die *Annealing*-Temperatur richtet sich dabei jeweils nach der Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotide. Die nun folgende Verlängerung der DNA-Stränge wird von der Taq-DNA-Polymerase katalysiert, welche dNTPs an das freie 3'-OH-Ende der entstehenden Stränge heftet (72°C, 1-3 min). Diese Folge aus Denaturierung, Annealing und Elongation erfolgt 25mal und ermöglicht so einen exponentiellen Anstieg der DNA-Menge im Ansatz über die Zyklenzahl. Die Reaktion endet mit einer abschließenden Elongation über 10 min bei 72°C.

### 3.1.2 DNA-Restriktion

Die Spaltung von DNA bei Klonierungen oder zu analytischen Zwecken geschah mithilfe von *Fast digest*-Restriktionsenzymen der Firma *fermentas*, welche DNA sequenzspezifisch spalten und dabei *sticky* oder *blunt ends* produzieren.

Ein Restriktionsansatz bestand dabei aus 1-10 µg DNA, 1-2 *Units* des Restriktionsenzymen sowie dem Enzym entsprechenden Pufferbedingungen und H<sub>2</sub>O dest. in einem 40 µl Ansatz. Dieser wurde 45-60 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend durch Agarosegelelektrophorese analysiert.

### 3.1.3 DNA-Ligation

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurde für 20 µl Ligationsansatz 1 Weiss-*Unit* der T4-Ligase verwendet. Der übrige Ansatz setzte sich aus 10-fachem ATP-haltigen Ligasepuffer, linearisiertem Plasmid und Insert sowie destilliertem Wasser zusammen. Das Insert wurde die Molekülmenge betreffend in 5-fachem Überschuss zum Vektor eingesetzt. Der gesamte Ansatz wurde über Nacht bei 16°C inkubiert.

### 3.1.4 Transformation von Plasmid-DNA in *E.coli*

Die chemisch kompetenten Zellen vom Stamm *Escherichia Coli* wurden auf Eis aufgetaut. Einem Ansatz aus 10 µl Ligationsprodukt, 20 µl einer 5x KCM-Lösung und 70 µl destilliertem Wasser wurden 100 µl der *E.coli*-Zellen zugefügt und anschließend zwanzig Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem darauf folgenden „Hitzeschock“ für fünf Minuten bei 37°C wurde 1 ml eines vorgewärmten LB-Mediums hinzugegeben und dann erneut für 45-60 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden auf LB-Platten mit einem Selektionsantibiotikum (100 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/ml Kanamycin) ausplattiert und über Nacht im Inkubator bei 37°C gelagert.

### 3.1.5 Plasmid-Isolation aus chemisch kompetenten *E.coli*

*E.Coli*-Zellen, welche das gewünschte Plasmid enthielten, wurden bei 37°C über Nacht im Schüttelinkubator in selektivem Medium (100 µg/ml Ampicillin bzw. 30 µg/ml

Kanamycin in LB-Medium) kultiviert. Je nach angestrebter DNA-Menge wurden für eine Mini-Präparation 5 ml Medium, für eine Midi-Präparation 100 ml Medium verwendet. Die Plasmid-Präparation erfolgte dann durch alkalische Lyse mithilfe des Kits NucleoBond Xtra Midi (Macherey&Nagel) bzw. durch die unten beschriebene Mini-Präparation.

#### **3.1.5.1 Mini-Präparation von DNA**

Zur Gewinnung kleinerer DNA-Mengen wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur für 1 min bei 13.000g zentrifugiert, um ein Bakterienpellet zu erhalten. Dieses wurde in 100 µl von Lösung I aufgenommen. Durch Zugabe von 100 µl Lösung II erfolgte die Lyse der Bakterien unter alkalischen Bedingungen innerhalb von 2 min bei Raumtemperatur. Die Neutralisierung des Ansatzes erfolgte mit 100 µl Lösung III, woraufhin erneut für 30 min bei 13.000g zentrifugiert wurde. Der klare Überstand wurde in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt und die DNA mit 210 µl Isopropanol präzipitiert. Nach weiterer Zentrifugation für 20 min bei 13.000 g konnte das DNA-Pellet mit 500 µl 70%igem Ethanol zweimal gewaschen, anschließend getrocknet und in 50 µl entionisiertem Wasser gelöst werden.

#### **3.1.6 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA**

Zur Messung des DNA-Gehalts einer Probe wurde diese in einer 1:100 Verdünnung im Photometer bei 260 nm analysiert. Hierzu wurden 100 µl der Verdünnung in eine Quarzküvette überführt und in dem *GeneQuant* Photometer der Firma Pharmacia die optische Dichte ermittelt.

#### **3.1.7 Agarosegelelektrophorese**

Die Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten zu analytischen oder präparativen Zwecken. Die Gele bestanden aus 1-2% Agarose in TAE-Puffer, welche zur DNA-Detektion mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt wurden. Die Auswertung erfolgte unter Bestrahlung mit UV-Licht bei einer

Wellenlänge von 254 nm, welches die Ethidiumbromid-Moleküle zur Fluoreszenz anregte. Das dadurch sichtbar gewordene Signal wurde per digitaler Bilderfassung dokumentiert.

### **3.1.8 DNA-Sequenzierung**

Vor dem Gebrauch von Plasmiden wurden diese mit der Didesoxy-Kettenabbruchmethode nach Sanger sequenziert.

Ein Sequenzieransatz bestand aus 0,5 µg zu sequenzierender DNA, 10 pmol Primer, 2 µl 5x Sequenzierungspuffer, 1 µl *Big Dye*-Puffer (Applied Biosystems), welcher die Polymerase, dNTPs und fluoreszenzmarkierte ddNTPs enthielt sowie Aqua dest. in einem Gesamt-Reaktionsvolumen von 10 µl.

Zur Amplifikation in einem Thermocycler wurde die DNA 1 Minute bei 96°C denaturiert, um anschließend 25 Zyklen aus 10 Sekunden bei 96°C, 5 Sekunden bei 50°C sowie 4 Minuten bei 60°C zur Polymerisation zu durchlaufen. Im Anschluss daran wurde die DNA mit 5 µl Natriumacetat (3M) und 130 µl Ethanol für 30 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert und dabei gefällt. Nach zwei Waschgängen mit je 250 µl 70% Ethanol und 10 Minuten Zentrifugation bei 14000 rpm trocknete das Pellet bei Raumtemperatur, um dann mit dem Sequenziergerät analysiert zu werden.

### **3.1.9 Verwendung des QuickChange® II Site-Directed Mutagenesis – Kits**

Das *QuickChange® II Site-Directed Mutagenesis* – Kit der Firma Stratagene diente zum Einfügen von Punktmutationen in GFP-NHERF1-WT und Shank 2-WT. Dabei wird als erstes eine PCR mit die gewünschte Mutation enthaltenden Primern durchgeführt, um mutierte Konstrukte zu erhalten. Die Polymerisation erfolgt dabei durch die *PfuUltra* DNA-Polymerase. Die ursprüngliche Template-DNA, welche die Mutation nicht enthält, wird dann von der *Dpn I* – Endonuklease erkannt und gespalten. Anschließend wird der Ansatz in *XL1-Blue* superkompetente Zellen transformiert.

Die Klonierungsreaktion erfolgte nach Angaben der Hersteller Stratagene. Die hergestellten Plasmide wurden durch Sequenzierung überprüft.

### 3.1.10 Verwendung des *TOPO TA Cloning*<sup>®</sup> – Kits

Zum Einfügen der PDZ-Mutation in die CFTR-Konstrukte wurde das *TOPO TA Cloning*<sup>®</sup> – Kit von Invitrogen verwendet. Das Prinzip ist hierbei, zunächst eine PCR mit den die Mutation enthaltenden Primern durchzuführen. Die Taq-Polymerase fügt durch ihre Transferase-Aktivität dabei an jedes PCR-Produkt am 3'-Ende ein Desoxy-Adenosin an. Der pCR<sup>®</sup>II-TOPO-Vektor, in den das PCR-Produkt im Anschluss ligiert wird, hat am 3'-Ende einen Desoxy-Thymidin-Überhang, was eine effiziente Ligation ermöglicht. Die Durchführung der Reaktionen erfolgte nach Angaben des Herstellers.

### 3.1.11 Aufreinigung eines GST-Fusionsproteins

Zur Herstellung eines an Gluthation-S-Transferase (GST)- gekoppelten Fusionsproteins wurde das gewünschte Oligonukleotid, in dieser Arbeit die für die 10 C-terminalen Aminosäuren des CFTR-T1478F kodierenden Basen, zunächst in einen prokaryotischen Expressionsvektor der pGEX-Gruppe kloniert und anschließend in *E.coli*-Bakterien transformiert. Eine Vorkultur wurde in 200 ml selektierendem Medium (Ampicillin 100µg/ml) bei 37°C und 200 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1 inkubiert. Durch Zugabe von IPTG (20%) und Inkubation für weitere 2 h bei 37°C ließ sich die Expression des GST-Fusionsproteins induzieren. Die Bakterien wurden während der nun folgenden Zentrifugation für 15 min bei 5000 rpm geerntet und das Pellet in 10 ml STE-Puffer resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch 100 µl Lysozym (10 mg/ml), 10 µl PMSF (100 mM) und 10 µl Pepstatin (1 mg/ml) für 20 min auf Eis sowie anschließendes Einfrieren des Ansatzes. Nach dem Auftauen wurde 10% Triton X-100 in PBS mit einer Endkonzentration von 2% hinzugegeben, wiederum für 20 min auf Eis inkubiert und erneut bei 16000 rpm für 25 min zentrifugiert.

Auf zuvor zweimal mit STE 2x –Puffer gewaschene 1 ml Glutathion-Sepharose wurde nun der erhaltene Überstand gegeben und das Gemisch für 1 h bei 4°C rotiert, um die GST-Fusionsproteine an die Sepharose zu binden. Im Anschluss daran wurde bei 500 g für 5 min die Sepharose mit den immobilisierten GST-Fusionsproteinen abzentrifugiert und das entstandene Pellet dreimal mit 10 ml kaltem STE-Puffer gewaschen. Abschließend wurde das fertige Sepharose-Pellet in 1ml STE-Puffer aufgenommen.

## **3.2 Zellbiologische Methoden**

### **3.2.1 Kultivierung von Zellen**

Die Kultivierung der verschiedenen Zelllinien erfolgte nach einem einheitlichen Prinzip. Die Zellen wurden bei 37°C im Inkubator mit 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert. Als Medium wurde mit 10% FCS und 1% Antibiotikum (Penicillin 100 u/ml und Streptomycin 100 µg/ml) versetztes DMEM benutzt. Das Umsetzen erfolgte 2-3mal pro Woche, indem die Zellen zunächst mit Versene gewaschen und anschließend mit 1 ml Trypsin pro Platte behandelt wurden. Nach einer Inkubationszeit von etwa 3 Minuten lösten sich die Zellen, sodass sie in frisches Medium aufgenommen und auf neue Platten verteilt werden konnten.

### **3.2.2 Transfektion der Zelllinien**

Die Transfektion der Zellen mit DNA erfolgte mit Hilfe des *TurboFect in vitro Transfection Reagent* der Firma Fermentas. Hierzu wurden die Zellen am Vortag gesplittet, um am Tag der Transfektion in einer Dichte von ca. 70% vorzuliegen. Die zu transfizierende DNA-Menge wurde in 1 ml serumfreiem Medium gelöst und mit 20 µl des Transfektionsreagenzes versetzt. Nach gründlichem Mischen inkubierte die Lösung für 15-20 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte die tröpfchenweise Verteilung auf den Zellen. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt, nach 48 h wurden die Zellen lysiert.

### **3.2.3 Transfektion mit PIST-siRNA**

Um isoliert die Interaktionen des transfizierten PISTs betrachten zu können, wurde in dieser Arbeit in den Zellen die Expression des endogenen PISTs durch siRNA inhibiert. Hierzu wurden die für den Versuch benutzten 6-Well-Schalen zunächst mit 1 ml Poly-D-Lysin pro Well für 20 min beschichtet und anschließend mit Aqua dest. gewaschen. Diese Beschichtung gewährleistet eine bessere Adhäsion der Zellen an den Untergrund. Im Anschluss erfolgte die Transfektion mit siRNA je Well in folgendem Ansatz: 300 µl OptiMEM, 8 µl siRNA bzw. negativ-siRNA als Kontrolle sowie 8 µl Lipofectamin als Transfektionsreagenz. Nach 15 min wurde die in DMEM+FBS aufgenommene

Zellsuspension hinzugegeben. Die transiente Transfektion mit PIST-Konstrukten geschah am Folgetag, die Lyse der Zellen weitere 48 h später.

### **3.3 Proteinbiochemische Methoden**

#### **3.3.1 Zellyse**

Zur Extraktion von Proteinen aus Zellen wurden diese zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Die Lyse erfolgte dann durch RIPA + Proteaseinhibitoren (Verdünnung 1:500) für 15 min auf Eis. Anschließend wurde das Lysat bei 4°C für 15 min bei 20.000 g zentrifugiert, um die Proteine von Zelltrümmern zu trennen. Der die Proteine enthaltende Überstand konnte nun für Immunpräzipitationen verwendet werden.

#### **3.3.2 Biotinylierung an der Zelloberfläche**

Zur quantitativen Untersuchung der CFTR-Expression an der Zellmembran wurden Biotinylierungsassays durchgeführt. Hierzu wurden HEK293T-Zellen auf mit Poly-D-Lysin beschichteten 10 cm Platten ausgesät und mit CFTR transfiziert. Nach Kultivierung für 48 h wurden die Zellen zweimal mit kaltem HBSS gewaschen und pro Platte 5 ml Biotinlösung (0,5 mg/ml Sulfo-NHS-SS-Biotin in HBSS) auf die Zellen gegeben. Die Platten wurden für 30 min bei 4°C unter Schwenken inkubiert, sodass das Biotin an die Oberflächenmoleküle der Zellmembranen koppeln konnte. Anschließend wurde die Lösung abgenommen und 5 ml kaltes HBSS mit 5 mM Tris (pH 7,5) auf die Zellen gegeben, um überschüssiges Biotinreagenz zu entfernen. Die Zellyse erfolgte mit RIPA + Proteaseinhibitoren für 15 min auf Eis. Die Lysate wurden bei 4°C für 15 min bei 20.000 g zentrifugiert und der Überstand auf 30 µl Avidin-Agarose pro Ansatz gegeben. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 3 h bei 4°C auf dem Rotator hatten die Agarosekügelchen die mit Biotin markierten Oberflächenproteine präzipitiert und wurden durch 5maliges Waschen mit RIPA und Zentrifugation für 5 min bei 1000 g vom übrigen Ansatz getrennt. Es wurden 50 µl Lämmli-Puffer pro Ansatz hinzugegeben und für 5 min bei 95°C gekocht, bevor die Analyse mittels SDS-Gel und Western Blot erfolgte.

### 3.3.3 Koimmunpräzipitation mit *RFP-Trap*

Um in den Zellen vorhandene RFP-markierte Proteine zu detektieren, mussten diese zunächst aus dem Zelllysats präzipitiert werden, wozu in dieser Arbeit *RFP-Trap* verwendet wurde. Dabei handelt es sich um einen spezifischen Antikörper gegen Rot Fluoreszierendes Protein (RFP), welcher während einer Inkubationszeit von 2 h bei 4°C an RFP binden kann, an das Proteine gekoppelt sind. Andere Proteine, die eine Interaktion mit dem RFP-Konstrukt eingegangen sind, wurden dadurch ebenfalls indirekt an *RFP-Trap* gebunden. Als Negativkontrolle diente ein GFP-Leervektor.

Der Antikörper von *RFP-Trap* ist an Agarosekügelchen (Durchmesser 80 µm) gekoppelt. Diese Tatsache ermöglicht die Trennung der gebundenen Proteine vom Rest des Zelllysats durch fünffaches Waschen mit 1 ml RIPA sowie jeweils Zentrifugation bei 500 g und 4°C für 1 min. Vor der Analyse der Proteinfraction mittels SDS-Page und Western Blot wurde die Bindung an die Agarosekügelchen zerstört, indem der Ansatz zusammen mit Lämmli-Puffer für 5 min bei 95°C gekocht wurde.

### 3.3.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

Zur Auftrennung verschiedener Proteine anhand ihres Molekulargewichts wurde die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese verwendet. Das 8%ige Trenngel setzte sich folgendermaßen zusammen:

**Tabelle 11: Zusammensetzung SDS-Page**

Reagenzien	Menge in ml
ddH <sub>2</sub> O	4,6
30% Acrylamid Mix	2,7
1,5M Tris (pH 8,8)	2,5
10% SDS	0,1
10% Ammoniumperoxodisulfat (APS)	0,1
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	0,06

Die Polymerisation des Ansatzes erfolgt durch APS als Radikalkettenstarter. Das weiterhin zugefügte TEMED wirkt dabei als Katalysator der Kettenreaktion.

Die zu analysierenden Proben wurden in 5x Lämmli-Puffer aufgenommen und für 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Anschließend folgte die Auftrennung der Proteine über das SDS-Gel bei 140 V. Für die Elektrophorese in Laufpuffer wurden Mini-Protean III-PAGE Kammern von Biorad verwendet.

### **3.3.5 Coomassie-Färbung**

Im SDS-Gel aufgetrennte Proteine können mit organischen Farbstoffen, zum Beispiel Coomassie-Blau, sichtbar gemacht werden. Dazu wurde das Gel für 45 Minuten in 100 ml Färbelösung unter Schwenken inkubiert. Anschließend wurde überschüssiger Farbstoff mit Entfärbelösung (100 ml alle 10 Minuten) vom Gel gewaschen, ebenfalls unter leichtem Schwenken.

### **3.3.6 Western Blot**

Zum Transfer der im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran wurden Nassblot-Apparaturen der Firma Biorad verwendet. Die Übertragung erfolgte in Transferpuffer für 80 Minuten bei konstanten 400 mA. Im Anschluss wurden freie Proteinbindungsstellen auf der Membran durch Inkubation in 10 ml 5% Magermilchpulver in TBS-T auf dem Schwenkrotator für 30 Minuten blockiert.

### **3.3.7 Immundetektion von Proteinen**

Der proteinspezifische erste Antikörper wurde in der jeweiligen Verdünnung in 5% Milchpulver in TBS-T gelöst und die die Proteine enthaltende Nitrocellulosemembran darin über Nacht auf dem Rotator bei 4°C inkubiert. Durch dreimaliges Waschen mit je 10 ml TBS-T wurde überschüssiger Antikörper entfernt. Die Detektion des gebundenen Erstantikörpers erfolgte mit einem HRP-gekoppelten Zweitantikörper in TBS-T durch Inkubation für 1 h. Erneutes Waschen mit TBS-T entfernte den Zweitantikörper, bevor

eine Detektion der Proteinbanden durch Chemilumineszenz-Substrat *Pierce ECL Western Blotting Substrate* nach Protokoll erfolgte.

### 3.3.8 *Enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA)*

Der *Enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA)* dient dem Nachweis von Proteinen durch spezifische Antigen-Antikörper-Interaktionen. Das Prinzip beruht dabei auf der Erkennung zu detektierender Proteine durch einen auf dem Boden der Versuchsplatte adhäsiven Antikörper. Ein zweiter Antikörper bindet dann an ein anderes Epitop des gesuchten Proteins, sodass ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex entsteht. Der Zweitantikörper ist an ein Enzym (meist die Meerrettichperoxidase) gekoppelt, welches ein passendes chromogenes Substrat umsetzen kann und somit einen Farbumschlag herbeiführt. Diese Reaktion kann durch Phosphorsäure gestoppt und das Ergebnis photometrisch gemessen werden.

In dieser Arbeit wurden an Tag 1 je 4 Wells einer 6-Well-Platte mit PDL beschichtet (s. Abschnitt 3.2.3). In jedes Well wurden anschließend 2 ml Medium pipettiert, in das daraufhin stabil RFP-CFTR exprimierende Zellen gegeben wurden. Es wurde eine Zelldichte von ca. 70% für den Folgetag angestrebt.

An Tag 2 erfolgte die Transfektion mit *TurboFect* (s. 3.2.2) nach folgendem Schema:

**Tabelle 12: Transfektionsschema für ELISA**

<b>Plasmid</b>	<b>Well 1</b>	<b>Well 2</b>	<b>Well 3 (NK)</b>	<b>Well 4</b>
GFP-PIST-WT	0,5 µg	-	-	0,5 µg
GFP-NHERF- WT	-	0,5 µg	-	0,5 µg
pEGFP-C3	0,5 µg	0,5 µg	1 µg	-

Nach fünf Stunden wurde das Medium erneuert.

Von der ELISA-Platte wurden 24 Wells mit je 100 µl eines anti-RFP rat-Antikörpers in PBS befüllt (*coating*), der gegen das RFP der CFTR-Konstrukte gerichtet war. 12 Wells wurden mit je 100 µl anti-Transferrinrezeptor-Antikörper (*mouse*, in PBS) beschichtet,

was im Versuch als Positivkontrolle dienen sollte, da dieser Rezeptor auf den Oberflächen aller Zellen exprimiert wird. Als Negativkontrolle wurden weitere 12 Wells mit 5% FBS in PBS gecoatet. Die Platte wurde anschließend mit Parafilm luftdicht verschlossen und über Nacht bei 4°C gelagert.

Am 3. Tag wurde überschüssiger Antikörper zunächst mit dreimal 300 µl PBS-T je Well abgewaschen. Offene Proteinbindungen wurden mit dreimal 300 µl 5% FBS in PBS geblockt. Die transfizierten Zellen wurden dem Protokoll der Biotinylierung entsprechend (s. 3.3.2) biotinyliert, lysiert und die Zelltrümmer abzentrifugiert.

Die ELISA-Platte wurde nach dem Blocken noch dreimal mit PBS-T gewaschen, um dann mit 70 µl RIPA und 30 µl Lysatüberstand pro Well befüllt zu werden. Bei 12 Wells war also eine Dreifachbestimmung der oben beschriebenen Versuchsansätze möglich.

Eine Inkubation von 2 h bei 4°C diente der Bindung von Antikörper und Antigen. Nach fünfmaligem Waschen mit PBS-T wurde nun HRP-Streptavidin in einer Verdünnung von 2,5 µg/ml in 10% FBS in PBS in die Wells gegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit erfolgte die Bindung des Streptavidins an das Biotin in der Funktion des zweiten Antikörpers. Überschüssige Reagenzien wurden beim achtmaligen Waschen mit PBS-T entfernt und 100 µl des chromogenen TMB konnten pro Well als Substrat des Streptavidins hinzugegeben werden. Nach einem ausreichenden Farbumschlag wurde die Reaktion mit 100 µl 1 M Phosphorsäure gestoppt. Die gesamte Platte wurde am ELISA-Reader bei 450 nm ausgelesen und so die jeweilige Menge an Oberflächen-CFTR bestimmt.

## 4 Ergebnisse

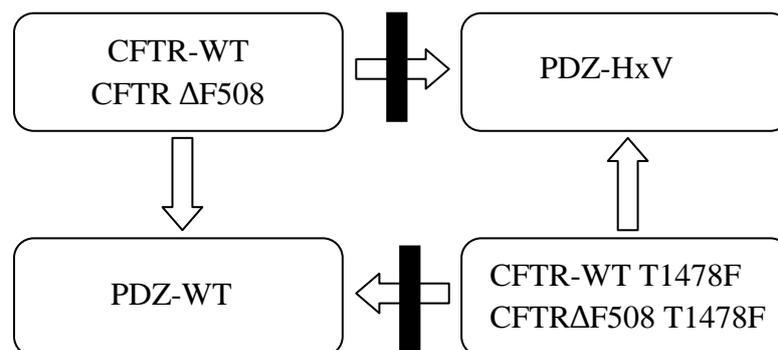
---

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Interaktionen zwischen dem PDZ-Liganden des CFTR und verschiedenen PDZ-Domänen-Proteinen genauer betrachtet.

### 4.1 Interaktionen des CFTR mit PDZ-Domänen-Proteinen

#### 4.1.1 Herstellung kompensatorischer Mutanten des CFTR und der PDZ-Domänen-Proteine

Die Auswirkungen der jeweiligen Interaktionen zwischen PDZ-Ligand und PDZ-Domänen-Protein auf die Expression des CFTR sind schwer zu bestimmen, da verschiedene PDZ-Domänen-Proteine mit unterschiedlichen Membranproteinen, welche einen PDZ-Liganden aufweisen, assoziieren (He et al., 2006). Umgekehrt kann der CFTR mit unterschiedlichen PDZ-Domänen-Proteinen interagieren, die gleichzeitig in der selben Zelle exprimiert sein können. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit kompensatorische Mutationen in den CFTR und die PDZ-Domänen-Proteine eingefügt (Kaech et al., 1998, Schnell et al., 2002). Diese können nur aneinander binden, ein Zusammenspiel verschiedener Proteine wurde somit ausgeschlossen.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung des experimentellen Ansatzes für die Betrachtung einzelner PDZ-Ligand/PDZ-Domänen Interaktionen des CFTR-WT und CFTR T1478F**

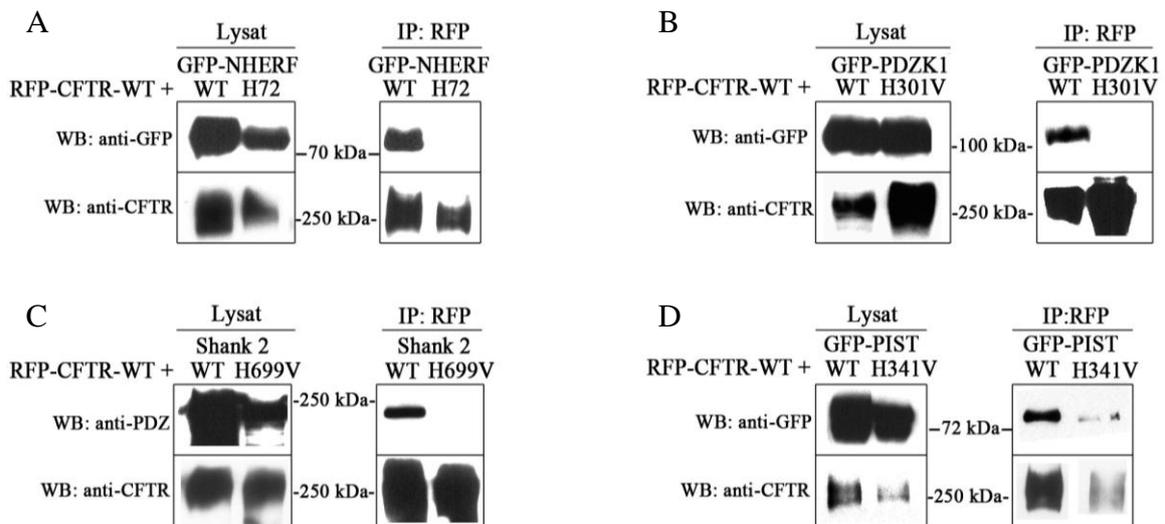
Durch Einfügen einer Punktmutation an Position 1478 des CFTR wird der PDZ-Ligand verändert, sodass die Wildtypen der PDZ-Domänen-Proteine nicht mehr binden können. Für diese Arbeit hergestellte Mutanten der PDZ-Domänen-Proteine enthielten wiederum eine Punktmutation in ihrer PDZ-Domäne (HxV: Histidin an Position x zu Valin mutiert), die diejenige des PDZ-Liganden kompensierte und so eine Bindung ermöglichte.

Aus Kristallstrukturanalysen von PDZ-Domänen-Proteinen in der Interaktion mit PDZ-Liganden weiß man, dass bestimmte PDZ-Domänen durch ein Histidin mit einem Serin oder Threonin des jeweiligen Liganden interagieren (T1478 im Falle des CFTR; sogenannte Typ I-Interaktion). Diese Aminosäure an der -2 Position des PDZ-Liganden ist wichtig für die Spezifität der Bindung (Morais Cabral et al. 1996 und Doyle et al. 1996). Hingegen findet die Interaktion anderer PDZ-Domänen über ein Valin in der PDZ-Domäne mit einem Tyrosin oder Phenylalanin des Liganden statt (Typ II-Interaktion). In dieser Arbeit wurde für die Proteine PIST, NHERF1, PDZK1 und Shank2 jeweils ein Histidin der PDZ-Domäne durch ein Valin ersetzt, sowie das Threonin des PDZ-Liganden gegen ein Phenylalanin (T1478F) getauscht. Damit wurde die Art der PDZ-Interaktion von Typ I zu Typ II geändert. Die Herstellung der entsprechenden Expressionskonstrukte erfolgte durch PCR-vermittelte Mutagenese aus den Konstrukten für die Wildtyp-Proteine.

#### **4.1.2 Nachweis der verschiedenen Interaktionen**

Um die Interaktionen zwischen Wildtyp-Proteinen und kompensatorischen Mutanten zu testen, wurden die jeweiligen Proteine in HEK293-Zellen koexprimiert. Der Nachweis der Interaktion erfolgte durch Koimmunpräzipitationen. Die Präzipitation erfolgte mit der *RFP-Trap*-Matrix, um den exprimierten RFP-CFTR mit den gebundenen Proteinen zu isolieren.

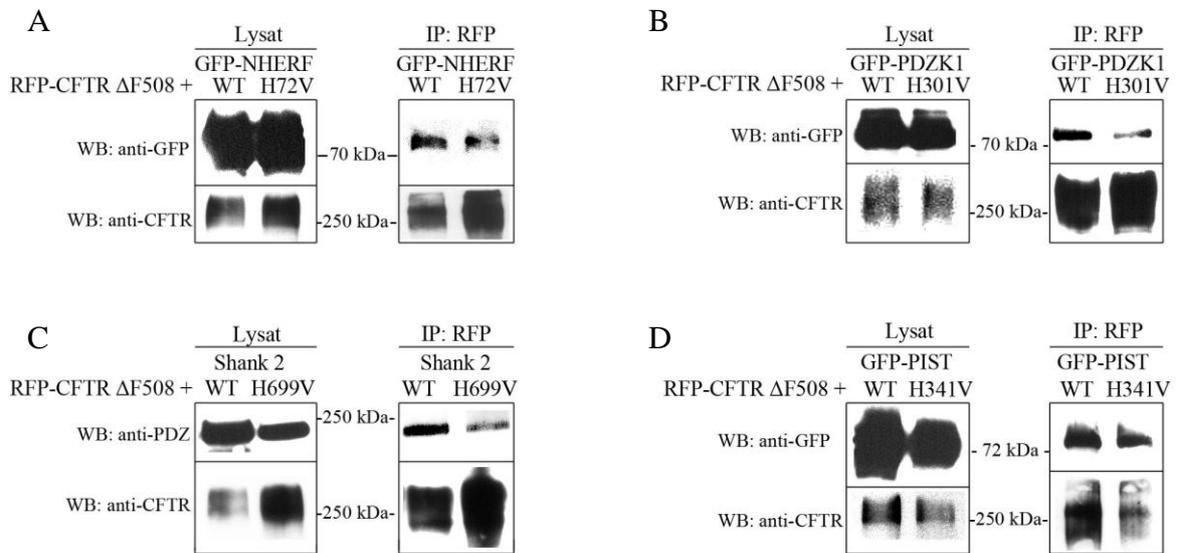
Es wurde jeweils das Bindungsverhalten eines der RFP-CFTR-Konstrukte an den Wildtyp und die zugehörige PDZ-Mutante folgender Proteine untersucht: GFP-NHERF1, GFP-PDZK1, GFP-PIST und Shank2. Als Negativkontrolle diente die Koexpression von RFP-CFTR mit GFP (s. Abb. 2). Die transient transfizierten Zellen wurden nach 48h Inkubation lysiert und Proben aus Lysat und Präzipitat im Western Blot analysiert.



**Abbildung 4: Interaktionen des CFTR mit verschiedenen PDZ-Domänen-Proteinen in HEK293T-Zellen**

Es wurden die Interaktionen des RFP-CFTR-WT getestet mit **A** GFP-NHERF1-WT und GFP-NHERF1 H72V **B** GFP-PDZK1-WT und GFP-PDZK1 H301V **C** Shank2-WT und Shank2 H699V **D** GFP-PIST-WT und GFP-PIST H341V. Die jeweiligen Konstrukte wurden in HEK293T-Zellen transfiziert und die Zellen nach 48 h lysiert. Nach Immunpräzipitation des CFTR über die *RFP-Trap*-Matrix wurden das Lysat sowie das Immunpräzipitat per Western Blot analysiert. Der CFTR-WT präzipitierte alle PDZ-Wildtypen, nicht jedoch die kompensatorischen Mutanten. Ausschließlich GFP-PIST H341V interagiert mit dem CFTR, jedoch schwächer als PIST-WT. Für den GFP-Leervektor war in den gezeigten Versuchen keine Interaktion nachweisbar.

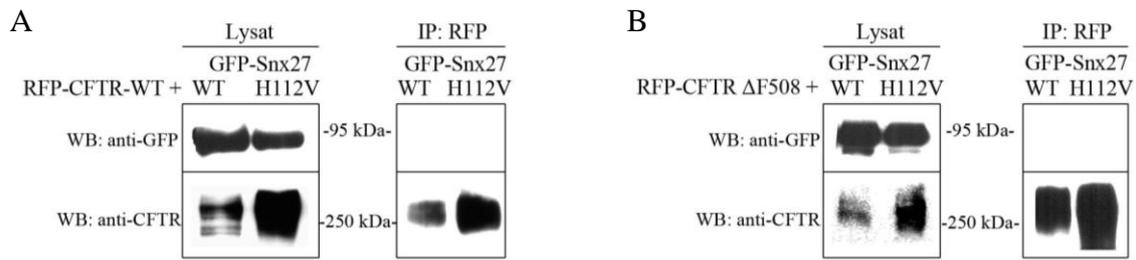
Bei der Immundetektion im Western Blot zeigte sich, dass der CFTR-WT an die Wildtypen der PDZ-Domänen-Proteine bindet. Nach Mutation der PDZ-Domänen zum Typ II erfolgte jedoch keine Interaktion mit dem CFTR-WT mehr. Diese Daten bestätigen, dass die jeweilige Bindung durch die PDZ-Domänen vermittelt wird. Ausschließlich für PIST muss dieses einschränkend betrachtet werden, da die PIST-Mutante ebenfalls mit dem CFTR-WT präzipitiert wurde.



**Abbildung 5: Interaktionen des CFTR  $\Delta$ F508 mit verschiedenen PDZ-Domänen-Proteinen in HEK293T-Zellen**

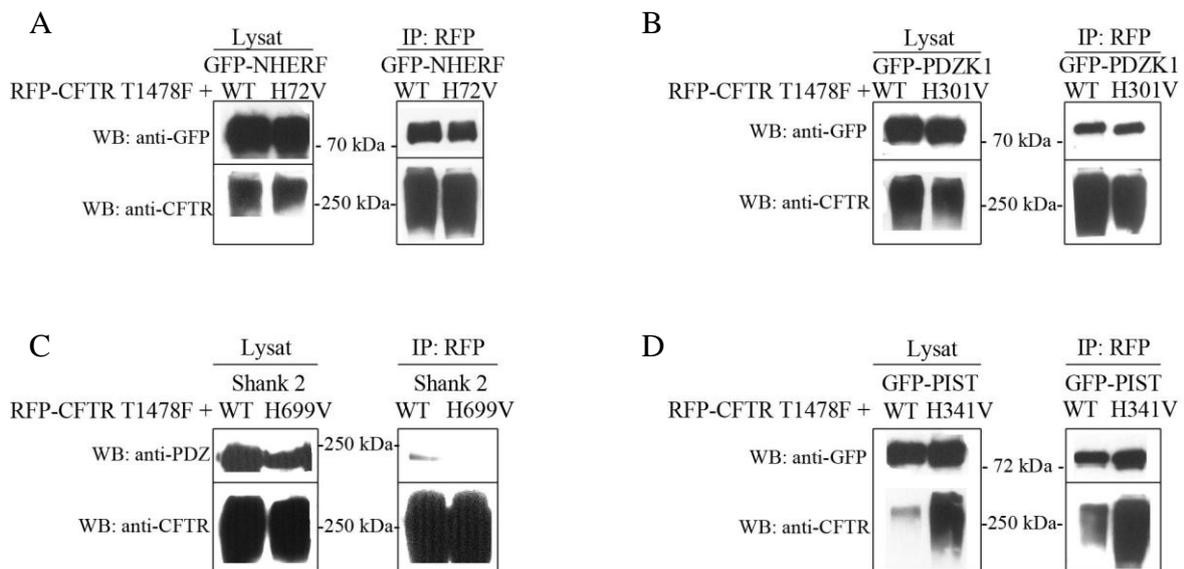
Es wurden die Interaktionen des RFP-CFTR  $\Delta$ F508 getestet mit **A** GFP-NHERF1-WT und GFP-NHERF1 H72V **B** GFP-PDZK1-WT und GFP-PDZK1 H301V **C** Shank2-WT und Shank2 H699V **D** GFP-PIST-WT und GFP-PIST H341V. Die jeweiligen Konstrukte wurden in HEK293T-Zellen transfiziert und die Zellen nach 48 h lysiert. Die Präzipitation erfolgte über *RFP-Trap*, woraufhin Lysat und Immunpräzipitat mittels Western Blot analysiert wurden. Der CFTR  $\Delta$ F508 präzipitierte sowohl alle PDZ-Wildtypen als auch die kompensatorischen Mutanten. Der GFP-Leervektor zeigte keine Interaktionen mit dem CFTR  $\Delta$ F508.

Der CFTR  $\Delta$ F508 interagiert mit allen PDZ-WT. Es zeigte sich hier allerdings auch eine Bindung an die mutierten PDZ-Domänen-Proteine, die im Vergleich zur Bindung an die PDZ-WT aber schwächer ausfiel (s. Abb. 5). Bei Koexpression von *Snx27* konnte weder für den Wildtyp noch für die kompensatorische Mutante eine Interaktion mit dem CFTR-Kanal nachgewiesen werden (s. Abb. 6).



**Abbildung 6: Untersuchung einer möglichen Interaktion des CFTR mit Snx27 in HEK293T-Zellen**

HEK293T-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für CFTR-WT (A) und CFTR  $\Delta$ F508 (B) sowie für GFP-Snx27 und GFP-Snx27 H112V transfiziert und nach 48 h lysiert. Die Immunpräzipitation mittels *RFP-Trap*-Matrix sowie die Analyse von Lysat und Präzipitat im Western Blot zeigte keinerlei Interaktionen. Das als Negativkontrolle exprimierte GFP interagiert ebenfalls nicht mit dem CFTR.



**Abbildung 7: Interaktionen des CFTR T1478F mit verschiedenen PDZ-Domänen-Proteinen in HEK293T-Zellen**

Es wurden die Interaktionen des RFP-CFTR T1478F getestet mit **A** GFP-NHERF1-WT und GFP-NHERF H72V **B** GFP-PDZK1-WT und GFP-PDZK1 H301V **C** Shank2-WT und Shank2 H699V **D** GFP-PIST-WT und GFP-PIST H341V. Die jeweiligen Konstrukte wurden in HEK293T-Zellen transfiziert und die Zellen nach 48 h lysiert. Die Präzipitation der Proteine erfolgte über *RFP-Trap*, woraufhin die Lysate und Immunpräzipitate per Western Blot analysiert wurden. Mit dem CFTR T1478F präzipitierten sowohl alle PDZ-Wildtypen als auch die kompensatorischen Mutanten. Das als Negativkontrolle exprimierte GFP ging in den gezeigten Versuchen keine Interaktionen mit dem CFTR ein.

Im Experiment mit dem am PDZ-Liganden mutierten CFTR T1478F erfolgte eine Kopräzipitation aller getesteten PDZ-Proteine, wiederum mit Ausnahme von Snx27. Da somit für keines der CFTR-Konstrukte eine Bindung mit Sorting Nexin 27 nachweisbar war, wurde dieses PDZ-Protein in dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

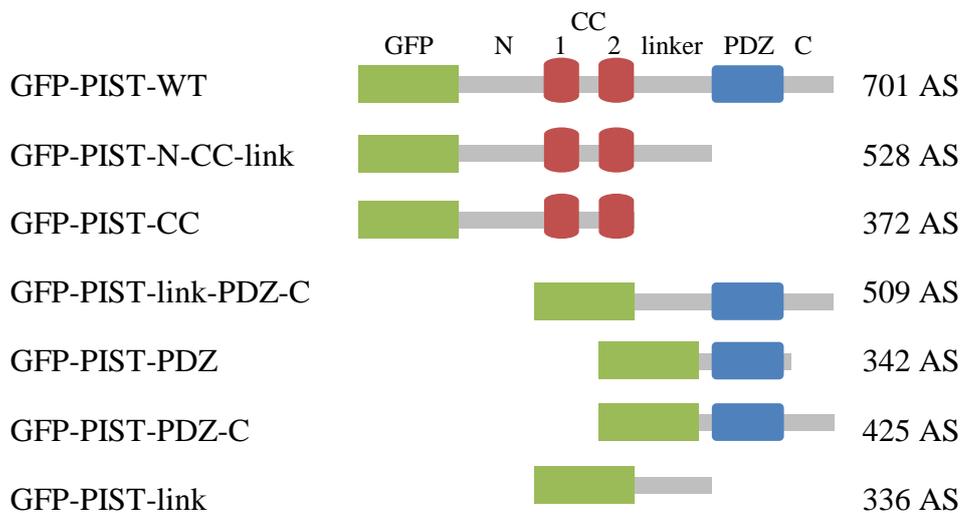
Die Bindung aller PDZ-Proteine an den CFTR  $\Delta$ F508 sowie an den CFTR T1478F führte zu der Frage, warum der Wildtyp eines PDZ-Proteins an einen CFTR-Kanal binden kann, dessen PDZ-Ligand durch eine Mutation verändert ist.

Nach Durchführung dieser Vorversuche wurde in der Sequenzierung des RFP-CFTR  $\Delta$ F508 eine Mutation kurz vor dem PDZ-Liganden festgestellt, welche einen Aminosäureaustausch im Protein bewirkte (V1475M). Auf Nachfrage bei der holländischen Arbeitsgruppe, die diesen Klon zur Verfügung gestellt hatte, stellte sich heraus, dass diese leider den falschen Klon zugesandt hatten. Da ein Einfluss dieser Mutation auf das Bindungsverhalten des Kanals nicht auszuschließen war, wurden die folgenden Experimente mit Fokus auf den CFTR-WT sowie den CFTR T1478F durchgeführt und der CFTR  $\Delta$ F508 nicht weiter untersucht.

## **4.2 Koimmunpräzipitation mit PIST-Fusionsproteinen**

Eine Möglichkeit, warum der CFTR T1478F auch mit den Wildtypen der PDZ-Proteine interagiert, könnte sein, dass die Proteine auch außerhalb des mutierten Liganden binden können.

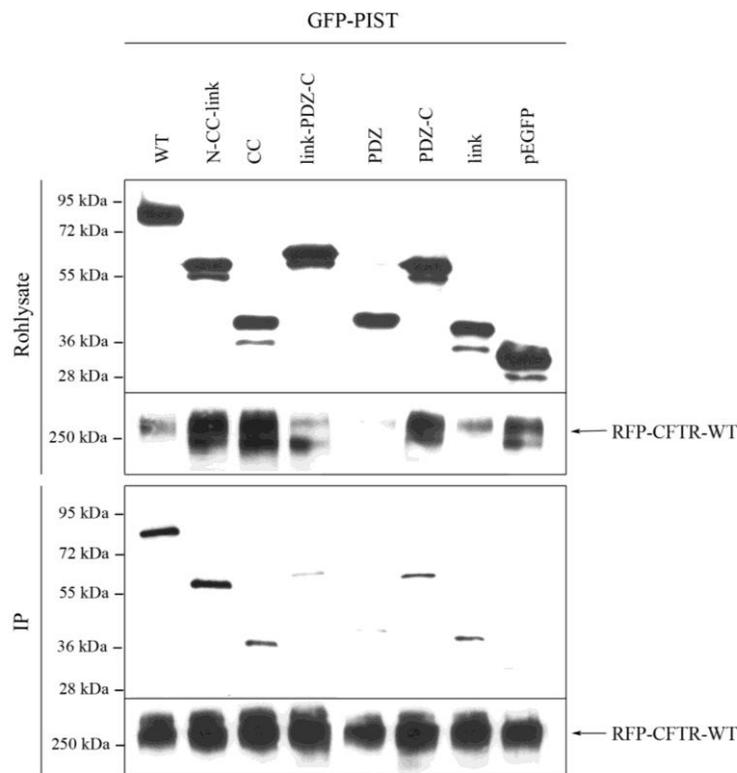
Diese Hypothese wurde exemplarisch an PIST getestet. Gemeinsam mit dem RFP-CFTR-WT sowie mit dem RFP-CFTR T1478F wurden verschiedene Deletionskonstrukte von PIST transfiziert, die zur Expression von Fusionsproteinen aus GFP und unterschiedlichen Domänen von PIST führten (s. Abb. 8). Bei einigen der Proteine war unter anderem die PDZ-Domäne nicht mehr vorhanden, sodass die direkte Bindung an den PDZ-Liganden des CFTR nicht mehr möglich war. Es wurde wiederum eine Koimmunpräzipitation mit *RFP-Trap* durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mittels Western Blot und anti-CFTR bzw. anti-GFP-Antikörpern analysiert.



**Abbildung 8: Schematische Darstellung der verwendeten PIST-Fusionsproteine in Aminosäuren (AS)**

Die verwendeten Konstrukte kodierten für unterschiedliche Domänen von PIST in Fusion mit GFP. Die Anzahl der Aminosäuren (AS) ist in der rechten Hälfte der Abbildung angegeben.

Die Ergebnisse der Immunpräzipitation von CFTR-WT mittels *RFP-Trap* sowie die Analyse im Western Blot sind in Abb. 9 dargestellt. Es ist erkennbar, dass auch PIST-Fusionsproteine ohne PDZ-Domäne im Experiment mit dem CFTR interagierten und so präzipitiert wurden. Die Bindung steht in diesen Fällen hauptsächlich im Zusammenhang mit der *Linker*-Region sowie der *Coiled-Coil*-Domäne (CC). Das Fusionsprotein, welches nur die PDZ-Domäne enthält, ist nicht in der Lage, allein mit dem CFTR zu assoziieren (s. Abb. 9).



**Abbildung 9: Koimmunpräzipitation von PIST-Fusionsproteinen mit CFTR-WT in HEK293T-Zellen**

HEK293T-Zellen wurden transient mit RFP-CFTR und den angegebenen Deletionskonstrukten von PIST transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und eine Immunpräzipitation mit *RFP-Trap* durchgeführt. Die Analyse von Lysaten und Präzipitaten im Western Blot zeigte, dass sowohl PIST-WT als auch Fusionsproteine ohne PDZ-Domäne mit dem CFTR-WT interagierten.

### 4.3 Knockdown-Versuche von endogenem PIST

Die Tatsache, dass im vorausgegangenen Präzipitationsversuch mit PIST-Fusionsproteinen auch solche ohne PDZ-Domäne mit dem CFTR interagierten, führte zur näheren Untersuchung der Theorie, dass die Proteine Dimere mit endogenem PIST bilden. Dessen PDZ-Domäne ist intakt und würde daher eine Bindung an CFTR-WT erlauben, sodass die Fusionsproteine indirekt über das endogene Protein an den PDZ-Liganden gebunden werden könnten und mit präzipitiert würden. Um das Bindungsverhalten in Abwesenheit von endogenem PIST untersuchen zu können, wurden Versuche durchgeführt, bei denen das in den Zellen vorhandene PIST mit

siRNA (*short interfering RNA*) ausgeknockt wurde. Dieses Verfahren beinhaltet das Einbringen von Doppelstrang-RNA in die Zellen, welche komplementär bzw. identisch mit der mRNA des Zielproteins ist. Schon 1998 konnte gezeigt werden, dass dadurch die mRNA blockiert und so die Proteinbiosynthese des Zielproteins post-transkriptionell unterdrückt wird (Fire et al. 1998). Als Kontrollversuch dient die Transfektion von Negativ-siRNA, die keine Auswirkung auf die Proteinsynthese und somit keinen Einfluss auf die mögliche Dimerbildung hat.

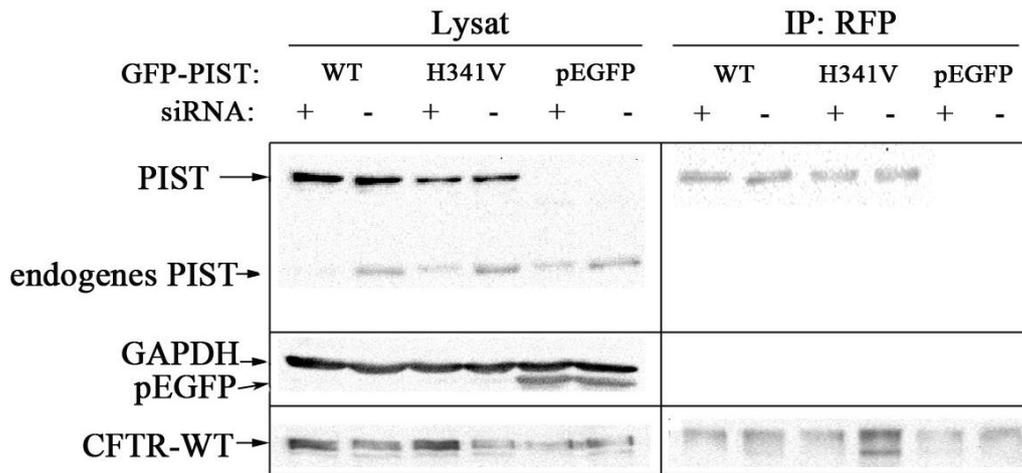
#### **4.3.1 Herstellung von CFTR stabil exprimierenden Zellen**

Für die Experimente mit siRNA wurden im Rahmen dieser Arbeit Zelllinien hergestellt, die den CFTR gleichmäßig an der Zelloberfläche exprimieren. Dazu wurden Zellen einer HEK293-Linie transient mit dem CFTR-WT oder dem CFTR T1478F transfiziert und anschließend diejenigen Zellen selektiert, die das Plasmid aufgenommen haben und somit die Resistenz gegen ein Antibiotikum besaßen (Geneticin 900 mg/ml). Die selektierten Zellen wurden dauerhaft unter der genannten Geneticin-Dosis im Medium kultiviert.

#### **4.3.2 PIST-Knockdown mit siRNA**

Die beim Testen der CFTR-Interaktionen verwendeten HEK293T-Zellen enthalten endogenes PIST, welches eventuell mit dem transfizierten PIST Dimere bilden kann und somit zu dessen Präzipitation mit dem mutierten CFTR-Kanal führen könnte. Um dieses auszuschließen wurden in HEK293-Zellen Versuche mit siRNA durchgeführt, welche die Synthese des endogenen PIST blockieren und somit die Dimerbildung verhindern soll.

Der Versuch wurde in den stabil RFP-CFTR-WT bzw. RFP-CFTR T1478F exprimierenden Zellen durchgeführt. Es wurden jeweils GFP-PIST-WT, GFP-PIST H341V und der GFP-Leervektor mit PIST-siRNA und mit Negativ-siRNA in 6-Well-Schalen transfiziert und anschließend mit *RFP-Trap* präzipitiert. Das Lysat und das Präzipitat wurden im Western Blot analysiert (s. Abb. 10)



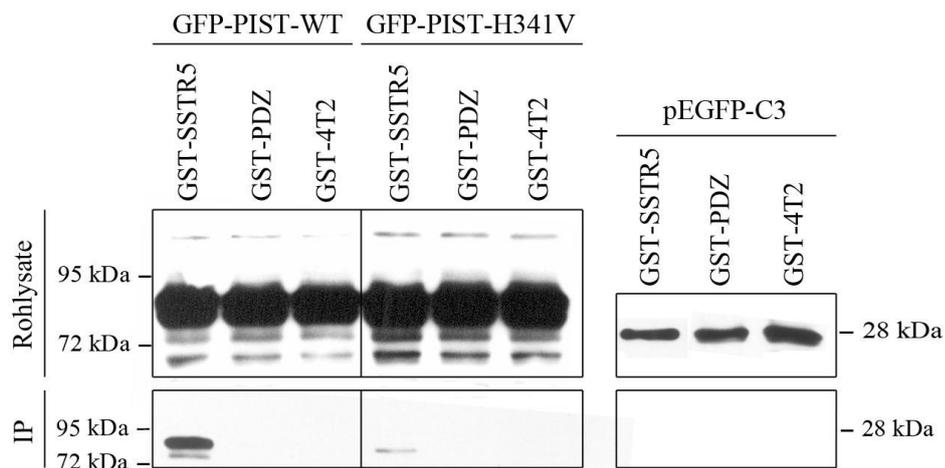
**Abbildung 10: Interaktionen von CFTR-WT und PIST-WT sowie H341V nach Knockdown von endogenem PIST**

Der Knockdown von endogenem PIST erfolgte mit siRNA in den stabil RFP-CFTR-WT exprimierenden HEK293-Zellen in 6-Well-Schalen. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion lysiert und der CFTR mit *RFP-Trap* präzipitiert. Die verwendeten Antikörper richteten sich gegen PIST, GAPDH und GFP bzw. gegen den CFTR. Der Knockdown bewirkte eine Reduktion des endogenen PISTs auf 30-50% (in n=2 von 4). Die exprimierten PIST-Proteine wurden alle mit dem CFTR präzipitiert, während das als Kontrolle exprimierte GFP keinerlei Interaktionen einging. Das gleiche Ergebnis konnte bei Wiederholung des Versuchs in stabil RFP-CFTR-T1478F exprimierenden Zellen reproduziert werden.

In den durchgeführten Versuchen konnte kein Unterschied in der Menge der PIST-Präzipitate zwischen den mit PIST-siRNA und den mit Negativ-siRNA transfizierten Zellen beobachtet werden. Das Ergebnis war bei der Präzipitation mit RFP-CFTR-WT das gleiche wie für den RFP-CFTR T1478F. Die Knockdown-Effizienz war in den durchgeführten Versuchen stark schwankend; ein PIST-Knockdown auf bis zu 30-50% verglichen mit den Kontrollen konnte jedoch erreicht werden. Das Ergebnis der Präzipitation blieb jedoch unabhängig von der Knockdown-Effizienz reproduzierbar.

## 4.4 GST-Fusionsproteine

Da nicht wie ursprünglich angenommen nur die Wildtypen von PDZ-Ligand und PDZ-Domäne sowie nur die jeweiligen Mutanten untereinander Bindungen eingingen, stellte sich die Frage nach der ausreichenden Spezifität der eingefügten Mutationen. Damit gezeigt werden kann, ob das Prinzip der mutierten Domänen effektiv ist oder zum Beispiel noch andere Faktoren außerhalb der Domänen eine Rolle spielen, wurde der mutierte PDZ-Ligand des CFTR in einen Vektor der pGEX-Gruppe kloniert (GST-PDZ). Mit den so entstandenen Fusionsproteinen konnten dann Immunpräzipitationen mit PIST-WT, PIST H341V sowie GFP durchgeführt werden und die Frage nach der Spezifität der Bindungen nach Einfügen der kompensatorischen Mutationen untersucht werden. Als Positivkontrolle diente ein GST-Fusionsprotein, welches den PDZ-Liganden des Somatostatin-Rezeptors 5 (SSTR5) enthielt. Für diesen Rezeptor konnte in einer anderen Arbeit durch Koimmunpräzipitation bereits nachgewiesen werden, dass eine Interaktion mit PIST-WT, jedoch keine mit der verwendeten PIST-Mutante eingegangen wird (Bauch, 2012). Die Expression eines GST-Proteins ohne weitere Domänen diene als Negativkontrolle.



**Abbildung 11: Immunpräzipitation von PIST mit GST-Fusionsproteinen**

HEK293T-Zellen wurden transient mit GFP-PIST-Konstrukten sowie GFP-Leervektor als Negativkontrolle in 6-Well-Schalen transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und jeweils mit GST-SSTR5, GST-PDZ und GST-Protein präzipitiert. Nur GST-SSTR5 präzipitierte GFP-PIST-WT.

Das Versuchsprotokoll orientierte sich an der beschriebenen Immunpräzipitation, nur dass bei diesem Experiment mit GST-Sepharose das GFP-PIST aus dem Zelllysate präzipitiert wurde. Wie in der Abbildung 11 erkennbar, interagiert das GST-SSTR5-Fusionsprotein bei der Koimmunpräzipitation mit GFP-PIST-WT, nicht jedoch mit GFP-PIST H341V oder GFP. Über den mutierten PDZ-Liganden des CFTR fand mit keinem der PIST-Konstrukte eine Interaktion statt, ebensowenig wie mit dem reinen GST-Protein.

## **4.5 Quantifizierung des CFTR bei Koexpression mit PDZ-Domänen-Proteinen**

### **4.5.1 Oberflächenbiotinylierung des CFTR**

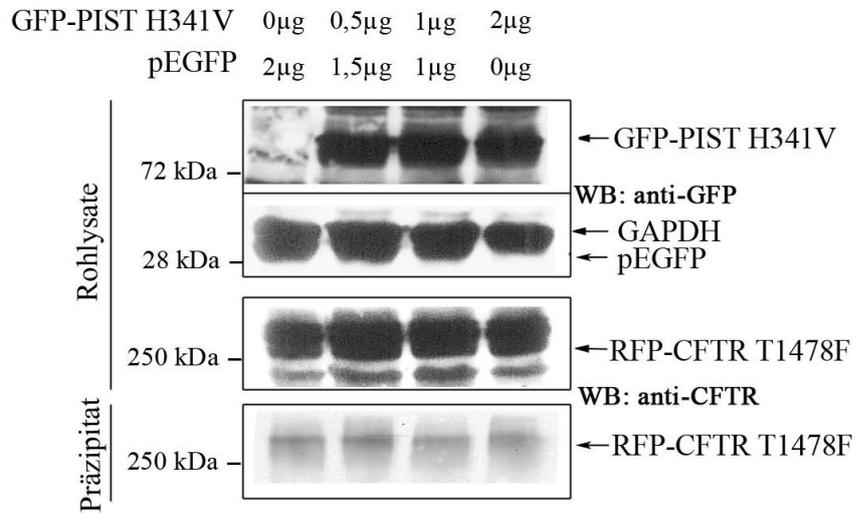
Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, die Auswirkungen einzelner PDZ-Domänen-Proteine auf die Expression des CFTR mit Biotinylierungssays näher zu charakterisieren. Dieses beinhaltete die Koexpression von Proteinen und Rezeptor in HEK293T-Zellen und die anschließende Biotinylierung der Zelloberflächenproteine. Hierbei ergab sich das Problem, dass der CFTR von den Zellen zu schwach exprimiert wurde, um quantitative Unterschiede im Input sicher messen zu können. Aus diesem Grund wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt und auf die im Folgenden beschriebenen Methoden zurückgegriffen.

### **4.5.2 Quantifizierung des CFTR nach Transfektion aufsteigender PIST-Mengen**

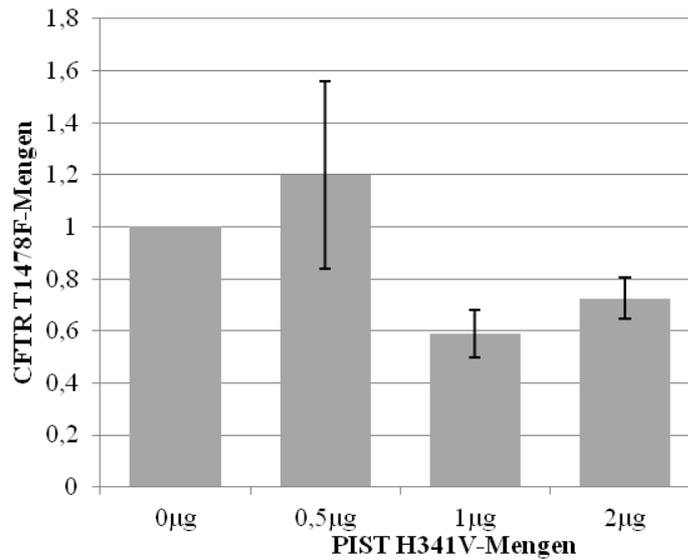
Um eine gleichmäßigere Expression des CFTR gewährleisten zu können, wurden diese Experimente in den stabil CFTR T1478F exprimierenden HEK293-Zellen durchgeführt. Zur Untersuchung der Auswirkung von PIST auf die CFTR-Expression wurden im Experiment zwischen 0 µg und 2 µg GFP-PIST H341V in 6-Well-Schalen transfiziert und die Zellen nach 24 h lysiert. Der RFP-CFTR T1478F wurde mit *RFP-Trap* präzipitiert. Die Lysate und Präzipitate wurden mittels Western Blot analysiert und mit der Software *ImageLab* quantifiziert. Die CFTR-Input-Banden waren wiederum zu schwach, um verlässlich ausgewertet werden zu können. Aus diesem Grund wurden behelfsweise die Präzipitate auf das GAPDH im Input normiert.

Nach Quantifizierung der CFTR-Präzipitate zeigte sich keine kontinuierliche Mengenänderung im Zusammenhang mit den aufsteigenden PIST-Mengen (s. Abb. 12). Eine Abnahme des CFTR erscheint hiernach möglich, kann durch die behelfsweise Quantifizierung der CFTR-Präzipitate und die geringe Versuchszahl jedoch nicht sicher nachgewiesen werden. Eine Interaktion des CFTR mit dem GFP-Leervektor trat in keinem der Experimente auf.

A



B



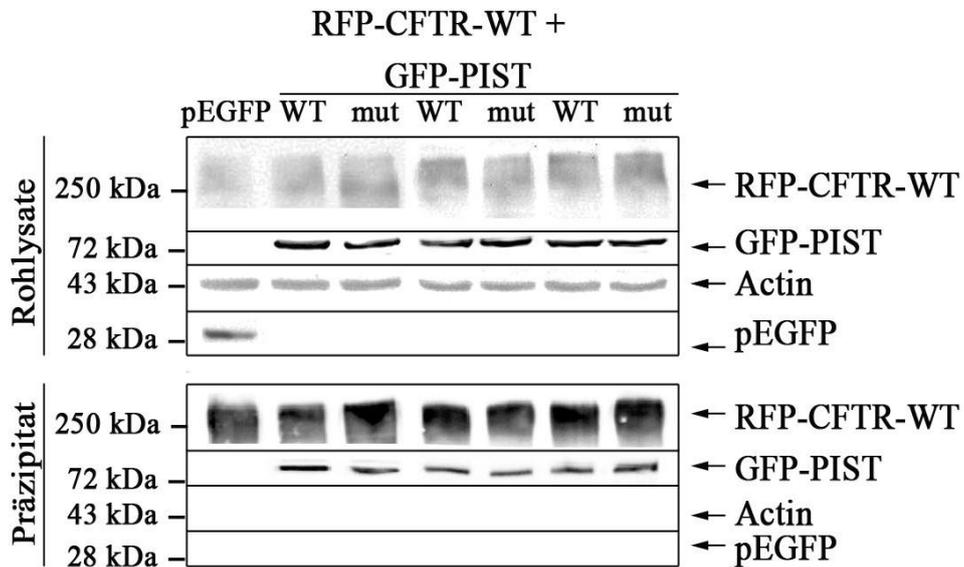
**Abbildung 12: Quantifizierung von CFTR-T1478F nach Transfektion verschiedener PIST-H341V-Mengen in stabil den Kanal exprimierende HEK293-Zellen**

**A** Es erfolgte die Transfektion mit Turbofekt von 0-2 µg GFP-PIST-H341V in HEK293-Zellen, die den RFP-CFTR-T1478F stabil exprimieren, in 6-Well-Schalen. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und eine Präzipitation des CFTR mit *RFP-Trap* durchgeführt. Die Proben wurden im Western Blot analysiert.

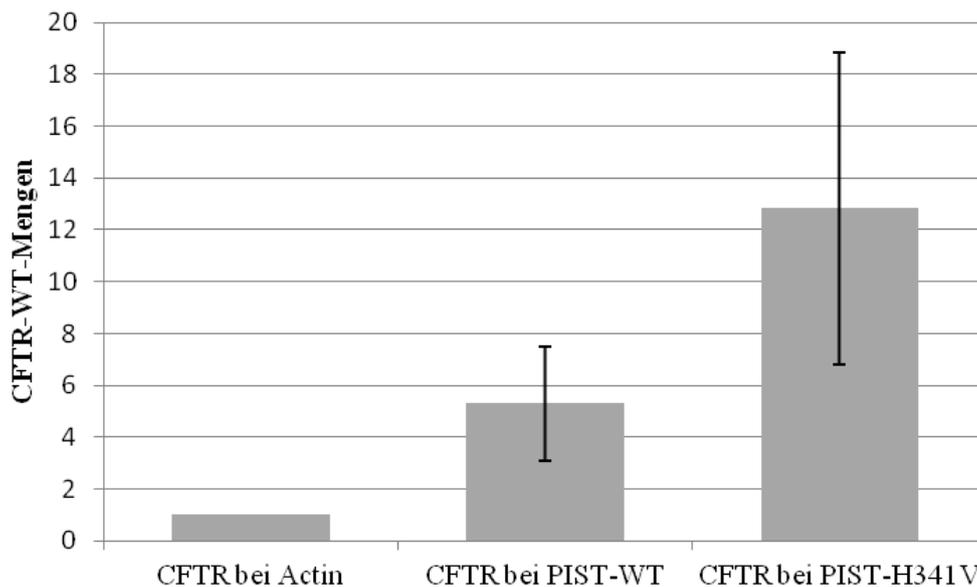
**B** Die Präzipitate wurden aus dem Western Blot quantifiziert und auf das im Lysat enthaltene GAPDH normiert. (n=2)

### 4.5.3 Quantifizierung von CFTR-WT nach Co-Transfektion mit PIST

A



B



**Abbildung 13: Quantifizierung von CFTR-WT nach Transfektion von PIST-WT und PIST- H341V in HEK293T-Zellen.**

**A** Es erfolgte die Transfektion mit TurboFekt von je 8 µg RFP-CFTR-WT und 3 µg pEGFP-C3, GFP-PIST-WT oder GFP-PIST-H341V in 10-Well-Schalen. Nach 24h wurde das Medium gewechselt und nach 48h die Zellen lysiert und eine Präzipitation des CFTR mit *RFP-Trap* durchgeführt. Die Proben wurden im Western Blot analysiert. **B** Die CFTR-Menge im Lysat wurde im Western-Blot quantifiziert und auf Actin normiert. (n=3)

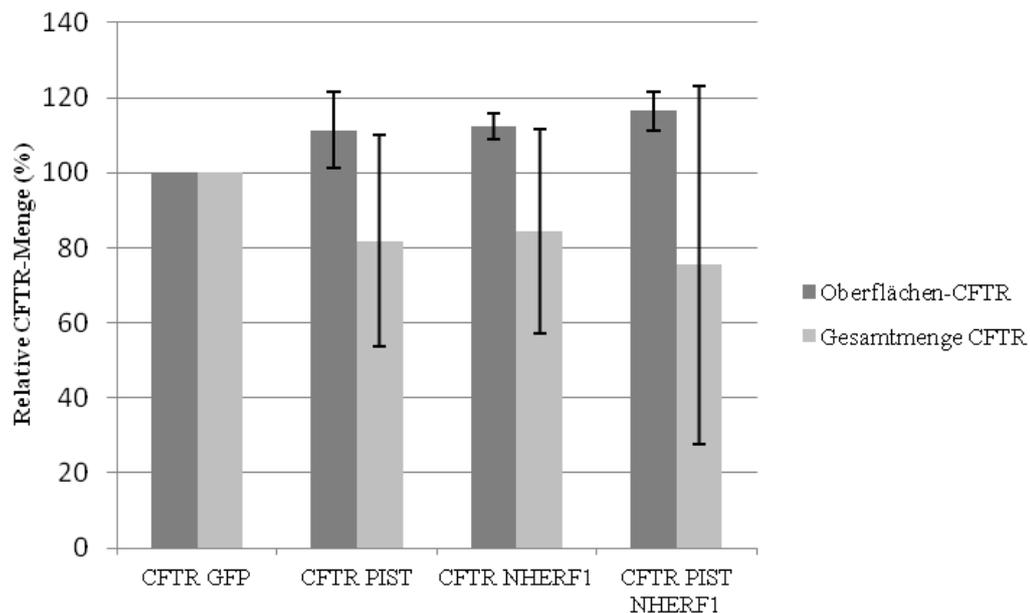
Aufbauend auf den Erkenntnissen der vorhergegangenen Versuche wurde nun ein Experiment zur Quantifizierung der CFTR-WT-Menge bei Koexpression mit pEGFP-C3, PIST-WT und PIST-H341V durchgeführt. Es wurden jeweils 8 µg RFP-CFTR-WT und 3 µg pEGFP, GFP-PIST-WT oder GFP-PIST H341V in 10-Well-Schalen transfiziert und nach 24 Stunden das Medium gewechselt. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen dann lysiert und der RFP-CFTR mit *RFP-Trap* präzipitiert. Die Lysate und Präzipitate wurden mittels Western Blot analysiert und mit der Software *ImageLab* quantifiziert.

Die bei der Koexpression mit PIST gemessenen CFTR-Mengen im Lysat wurden zunächst auf Actin und im Anschluss jeweils auf die CFTR-Menge im Versuch mit pEGFP normiert. Hierbei zeigte sich eine Steigerung der CFTR-Menge in Anwesenheit von PIST, wobei diese im Versuch mit PIST-H341V stärker ausgeprägt war als bei PIST-WT.

#### **4.6 CFTR-ELISA mit PIST und NHERF1**

Der ELISA diene in dieser Arbeit der genaueren Quantifizierung von CFTR-Mengen im Vergleich zur Quantifizierung der Banden aus dem Western Blot. In diesen Experimenten sollte überprüft werden, ob PIST die CFTR-Expression an der Zelloberfläche verändert. Zusätzlich wurde eine Koexpression von PIST und NHERF1 in den stabilen CFTR-Linien durchgeführt, welches Aufschlüsse über den Einfluss von NHERF1 auf die CFTR-Expression bzw. über eine mögliche Konkurrenz dieser beiden PDZ-Domänen-Proteine geben sollte.

Die bei der Koexpression mit PDZ-Domänen-Proteinen gemessenen CFTR-Mengen wurden zunächst auf GAPDH und im Anschluss jeweils auf die CFTR-Menge im Versuch mit alleiniger Expression des GFP-Leervektors normiert. Bei der Quantifizierung der Menge an Oberflächen-CFTR, welche durch Biotinylierungs-ELISA und anschließende photometrische Messungen ermittelt wurde, zeigte sich bei den unterschiedlichen Versuchsansätzen jeweils eine leichte Zunahme der CFTR-Menge.



**Abbildung 14: Quantifizierung des RFP-CFTR nach Koexpression mit PIST und NHERF1 durch ELISA**

Die Menge an Oberflächen-CFTR wurde mit einem Biotinylierungs-ELISA, die Gesamtmenge im RFP-ELISA bestimmt. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus drei Experimenten sowie die Standardabweichung der Mittelwerte. Es zeigte sich keine Reduktion der Gesamtmenge des CFTR bei Koexpression mit PIST im Vergleich zu NHERF, während die Menge an Oberflächen-CFTR in allen Ansätzen zunahm. Eine Zunahme der CFTR-Menge durch gleichzeitige Koexpression mit NHERF1 und PIST konnte nicht sicher nachgewiesen werden. (n=3)

Für die Koexpression mit GFP-PIST ergab sich eine Reduktion der Gesamtmenge des CFTR auf etwa 80% des Ausgangswertes. Der Versuch mit GFP-NHERF1 sowie der Ansatz mit gleichzeitiger Transfektion von PIST und NHERF1 zeigten eine CFTR-Reduktion auf 78- 85%, ebenfalls normiert auf die CFTR-Menge bei Koexpression mit dem GFP-Leervektor.

## 5 Diskussion

---

### 5.1 Diskussion des Bindungsverhaltens des PDZ-Liganden

Zu Beginn dieser Arbeit wurden Klone des CFTR und der PDZ-Domänen-Proteine hergestellt, die an ihrer PDZ-Bindungsstelle Punktmutationen tragen. Die in Kapitel 4.1 dargestellte Theorie zum Bindungsverhalten von Wildtypen und Mutanten konnte nach Testen der einzelnen Interaktionen nicht bestätigt werden. Da der CFTR T1478F nicht nur mit den mutierten PDZ-Domänen-Proteinen interagiert, sondern weiterhin auch mit den Wildtypen, stellt sich die Frage, ob durch die Mutationen wirklich die für die Bindung entscheidenden Aminosäuren innerhalb der Domänen verändert wurden oder ob die Veränderung nicht einschneidend genug war.

Eine Interaktion zwischen dem Protein Snx27 und dem CFTR-WT oder dem CFTR  $\Delta$ F508 konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Diese Tatsache zeigt jedoch, dass die übrigen Versuche zum Bindungsverhalten des CFTR durchaus spezifisch waren und insbesondere der CFTR  $\Delta$ F508 nicht unselektiv an beispielsweise GFP bindet.

Zur Bedeutung der einzelnen an der PDZ-Interaktion beteiligten Aminosäuren auf Seiten des CFTR gibt es in der Literatur einen Konsens, dass das Leucin an Position 0 des PDZ-Liganden sowie das in dieser Arbeit zu Phenylalanin mutierte Threonin an Position -2 hauptsächlich für die Spezifität der PDZ-Bindung verantwortlich sind (Doyle et al., 1996, Fanning & Anderson, 1999, Piserchio et al., 2005). Dennoch ist anzunehmen, dass viele der Bindungen zusätzlich über Interaktionen mit den Seitenketten der Aminosäuren der PDZ-Domänen-Proteine an den Positionen -1, -4 und -5 des Liganden vermittelt werden (Songyang et al., 1997).

Fraglich bleibt, warum die Wildtypen der PDZ-Domänen-Proteine nicht nur mit dem CFTR-WT, sondern auch mit dem CFTR T1478F interagierten, obwohl dessen PDZ-Ligand an einer entscheidenden Aminosäure mutiert ist. Ist das Histidin der PDZ-Domäne, welches über Wasserstoffbrückenbindung an das Threonin des PDZ-Liganden

bindet, zu einem Valin mutiert, so reicht diese Veränderung aus, um eine Interaktion mit dem CFTR-WT zu verhindern (s. Abb. 4). Die Bindung wird erst möglich, wenn auch der PDZ-Ligand an der entsprechenden -2 -Position mutiert ist und somit die Änderung innerhalb der PDZ-Domäne kompensieren kann. Da der Wildtyp des PDZ-Proteins jedoch auch an den mutierten CFTR bindet, müssen noch andere Faktoren außerhalb der PDZ-Domäne eine Rolle spielen.

Zum einen liegt die Erklärung in der Dynamik der Bindungstasche, die von den PDZ-Domänen-Proteinen gebildet wird (Piserchio et al., 2005). Eine solche Dynamik ist nicht ungewöhnlich für Bindedomänen und sogar oft notwendig, um den Liganden zu erkennen. Dieser Dynamik wurden durch die eingefügte PDZ-Mutation (Histidin zu Valin) eventuell Grenzen gesetzt, die im Wildtyp nicht vorliegen, sodass dieser sich an den mutierten PDZ-Liganden anpassen konnte. Zum anderen ist eine Auswirkung von an der Bindung beteiligten Strukturen direkt N- oder C-Terminal der PDZ-Domäne, sogenannten Extensionen (Wang et al., 2010), nicht auszuschließen. Diese Extensionen können neben einer Affinitätserhöhung zum Liganden auch eine Expansion der Bindungstasche für das Zielprotein bewirken, welches eine weitere mögliche Erklärung für die in dieser Arbeit beschriebene Bindung des PDZ-WT an einen mutierten Liganden sein kann.

Des Weiteren ist für PDZ-Domänen-Proteine die Ausbildung von Dimeren beschrieben (Brenman et al., 1996), welche ebenfalls zur Klärung der Frage beitragen könnte. Im Falle von PIST kann eine Dimerbildung zusätzlich auch über die *coiled-coil*-Domänen vermittelt werden, wie bereits in BHK-Zellen beobachtet (Neudauer et al., 2001). An PIST wurde in dieser Arbeit exemplarisch untersucht, ob eine Dimerbildung des exprimierten Proteins mit endogen in HEK293T-Zellen vorhandenem PIST die Interaktion zum CFTR vermittelt. Das endogene PIST könnte demnach die Bindung über seine intakte PDZ-Domäne eingehen und durch die Dimerisierung mit PIST-Proteinen über weitere Domänen deren Präzipitation im Western Blot erklären (s. Abb. 9). Die Ausbildung von Homodimeren konnte in einer weiteren Arbeit bestätigt werden (Bauch, 2012). So wurden PIST-Proteine präzipitiert, die selbst keine PDZ-Domäne besaßen. Die Ausbildung der Dimere scheint dabei hauptsächlich über die *linker*- sowie die *coiled-coil*-Motive der Proteine zu erfolgen. Über die *coiled-coil*-Domäne weiß

man, dass diese außerdem für die Verankerung von PIST im trans-Golgi-Netzwerk verantwortlich ist (Yao et al., 2001, Cheng et al., 2002, Xu et al., 2010). Aus diesen Ergebnissen ergibt sich für PIST, dass dieses Protein vom TGN aus regulatorische Funktionen ausüben kann, indem es über seine PDZ-Domäne mit anderen Signal- oder Membranproteinen, wie beispielsweise dem CFTR, Komplexe bildet.

Um die Interaktion der PDZ-Proteine mit dem CFTR unter Ausschluss einer Dimerbildung betrachten zu können, wurde die Synthese des endogenen PIST in den verwendeten HEK-Zellen durch Transfektion von siRNA unterbunden und anschließend die Präzipitationsexperimente für PIST wiederholt (s. Abb. 10). Die Effizienz des Knockdowns schwankte bei diesen Versuchen stark. Die Menge des endogenen PIST betrug nach Knockdown noch zwischen 30 und 95% des Ausgangswertes, was eine sinnvolle Verwertung der Ergebnisse schwierig macht. Im Präzipitat zeigte sich kein nachweisbarer Unterschied in der Menge des nach Transfektion exprimierten PISTs zwischen den mit siRNA behandelten Zellen und den zum Vergleich dienenden Zellen ohne Knockdown. Dieses kann mit der unzureichenden Effizienz der siRNA begründet werden, die nicht ausreichend war, um einen Unterschied sichtbar zu machen. Außerdem war die Expression des CFTR in den Zellen, die den Kanal stabil exprimierten, vergleichsweise schwach, sodass im Zusammenhang mit der sowieso niedrigen Affinität des CFTR zu den PDZ-Domänen-Proteinen hier kein eindrucklicher Effekt eintrat. Die schwache Präzipitation von PIST H341V zusammen mit dem CFTR-WT in diesen Experimenten steht im Konsens mit vorherigen Ergebnissen (s. Abb. 4).

Ein abschließender Versuch zur Frage, ob die Interaktion zwischen CFTR und PIST allein PDZ-vermittelt ist, war die Immunpräzipitation von GST-Fusionsproteinen mit PIST-WT und PIST H341V. Die GST-Proteine enthielten das C-terminale Ende des Somatostatin-Rezeptor Subtyp 5 (SSTR5), die zehn C-terminalen Aminosäuren des CFTR T1478F oder kein Insert als Negativkontrolle. Für den SSTR5 konnte die Korrektheit der Theorie zum Bindungsverhalten mit den verwendeten kompensatorischen Mutanten in der Arbeitsgruppe bereits nachgewiesen werden (Bauch, 2012). Es konnte gezeigt werden, dass der mutierte C-Terminus des CFTR nicht mit PIST H341V interagiert, was im Konsens mit den Ergebnissen aus den

Abbildungen 7 und 9 die Hypothese verstärkt, dass die untersuchte Proteinbindung nicht allein über die PDZ-Domäne vermittelt wird. Einschränkend muss gesagt werden, dass das verwendete C-terminale Ende des CFTR vermutlich in einer anderen 3D-Struktur vorliegt, als es das in Gegenwart des vollständigen CFTR tun würde. Diese veränderte Konformation hat somit einen negativen Einfluss auf das Bindungsverhalten. Ferner spielt die niedrige Affinität des CFTR zu PIST ebenfalls eine untergeordnete Rolle (Cushing et al., 2008). Bei alleiniger Expression des PDZ-Liganden wird eventuell ein Schwellenwert unterschritten, der eine Bindung endgültig unmöglich macht. Dieses kann im durchgeführten Experiment nicht ausgeschlossen werden.

## 5.2 Diskussion der CFTR-Quantifizierungen

Das PDZ-Protein PIST wurde 2002 erstmals von Cheng et al. als Interaktionspartner für den CFTR identifiziert. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass durch Überexpression von PIST die Oberflächenexpression des CFTR gesenkt werden kann. Zusätzlich beobachteten sie eine Abnahme der CFTR-vermittelten Chloridströme über der Zellmembran. 2004 wurden diese Beobachtungen begründet in einer Retention des CFTR in der Zelle durch PIST sowie in einer Sortierung hin zu den Lysosomen und somit zur Degradierung (Cheng et al., 2004). Bei der Transfektion aufsteigender Mengen von PIST-cDNA in den stabil CFTR exprimierenden HEK293-Zellen war keine lineare Abnahme an Gesamt-CFTR zu beobachten (s. Abb. 12). Ein Störfaktor war hierbei die variable Transfektionseffizienz von PIST, die eine lineare CFTR-Abnahme eventuell verhinderte. Dennoch imponierten diese Schwankungen nicht stark genug, um eine stattgefundene Abnahme völlig zu verschleiern.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus den Versuchen zur Dimerbildung von PIST lässt sich Folgendes konstatieren: PIST ist über seine *coiled-coil*-Domäne am trans-Golgi-Netzwerk verankert und kann eine PDZ-vermittelte Bindung mit dem CFTR eingehen, sorgt aber über andere Domänen für eine Komplexbildung mit weiteren Signal- und/oder Adapterproteinen wie dem Q-SNARE Protein Syntaxin 6 oder den GTPasen Rab6 und TC10 (Charest et al., 2001, Neudauer et al., 2001 und

Bergbrede et al., 2009). Dieses sind Effektoren, für die PIST die Bindung an den CFTR vermitteln könnte. Ist nun kein oder nur wenig PIST in der Zelle vorhanden, so kann keine PIST-vermittelte Interaktion von CFTR mit weiteren Regulatoren des intrazellulären Vesikeltransports eingegangen werden, sodass eine Bindung an sowohl positive als auch negative Regulatoren ausbleibt. In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen mit aufsteigenden PIST-Mengen ließ sich die von der Gruppe um Cheng beobachtete Abnahme der CFTR-Menge nicht in dem Maße nachvollziehen (s. Abb. 12). Der Versuch wurde hier jedoch mit der CFTR-Mutante T1478F durchgeführt, dessen PDZ-Ligand keineswegs spezifisch für eine Bindung an z.B. PIST H341V verändert ist (s.o.). Demnach kann eine Mitwirkung verschiedener anderer endogener Proteine an der CFTR-Expression nicht ausgeschlossen werden. Hinzu kommt, dass Cheng et al. die Versuche in Zellen der Grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*, COS-7-Zellen) durchführten, während in dieser Arbeit mit HEK293-Zellen gearbeitet wurde. Es ist nicht bewiesen, dass in den COS-7-Zellen nicht weitere Proteine einen negativen Einfluss auf den CFTR nehmen bzw. dass es in HEK293-Zellen solche gibt, die einer Abnahme des CFTR entgegen wirken.

In einem im Anschluss durchgeführten Versuch zur weiteren Klärung des Einflusses von PIST auf den CFTR wurde bei Ko-Immünpräzipitation der beiden Wildtypen eine Zunahme des CFTR im Vergleich zum Ansatz ohne PIST festgestellt (s. Abb. 13). Bei Ko-Expression von PIST-H341V und CFTR-WT war die in der Präzipitation gemessene CFTR-Menge noch erheblich mehr auf etwa das 12-Fache der Ausgangsmenge erhöht. Wie bereits in vorhergegangenen Versuchen gezeigt wurde, findet eine Interaktion zwischen dem CFTR-WT und PIST H341V sicher statt, fraglich bleibt nur, über welche Domänen. Möglich wäre, dass durch Bindung von PIST H341V außerhalb des PDZ-Liganden die Interaktion mit anderen Negativ-Regulatoren des CFTR unterbunden wird oder umgekehrt die Bindung von positiven Regulatoren verstärkt dort stattfinden kann. Ungeachtet dieser Fragen lässt sich feststellen, dass in diesem Versuch keines der PIST-Konstrukte zu einer Abnahme der CFTR-Menge führt.

Um eine mögliche CFTR-Zunahme durch PIST noch mit einer anderen Methode zu überprüfen, wurden in dieser Arbeit ELISA-Assays verwendet.

Eine Abnahme der CFTR-Gesamtmenge nach Koexpression mit PIST konnte auch in einer Quantifizierung durch ELISA nicht sicher nachgewiesen werden (s. Abb. 14), während die Menge an Oberflächen-CFTR eindeutig nicht reduziert wurde, sondern sogar eine zunehmende Tendenz hatte. Eine negative Wirkung von PIST auf die Gesamtmenge an CFTR ist also nicht auszuschließen. Wolde et al., 2007, und J. Cheng et al., 2005, postulieren in ihren Arbeiten, dass eine PIST-Defizienz die Oberflächenexpression des CFTR steigert. Dieses konnte im durchgeführten ELISA-Assay nicht bestätigt werden. Eine Vernetzung zu Proteinen, die eine Degradierung des CFTR in die Wege leiten, kann eine mögliche Funktion von PIST sein. Es ist jedoch nach diesen Ergebnissen nicht anzunehmen, dass dieses die einzige Zielrichtung ist, da zum Beispiel auch der SSTR5 durch PIST nicht vermehrt abgebaut wird (Bauch, 2012). Der CFTR wird also eventuell anders reguliert als andere Rezeptoren. Somit wird ein zusätzlicher Einfluss von anderen, bisher unbekanntem Faktoren außerhalb der PDZ-Domäne immer wahrscheinlicher.

NHERF1 ist ein Protein, welches C-terminal eine *Ezrin*, *Radixin*, *Moesin* (ERM) - Domäne besitzt, über die es mit den drei im Namen genannten Proteinen interagieren und so seine Liganden, wie zum Beispiel den CFTR, an das apikale Aktingerüst anbinden kann (Short et al., 1998, Sun et al., 2000). Die einst postulierte These, dass NHERF1 eine Dimerbildung des CFTR vermittelt und somit einen Einfluss auf dessen Konformation und Aktivität hat, wurde mittlerweile eingeschränkt und diese Aufgabe der PKA zugeschrieben (Li et al., 2004). Ein Knockdown von endogenem NHERF1 führt ebenfalls nicht zu einer Änderung der CFTR-Gesamtmenge (Kwon et al., 2007).

Die genaue Wirkung von NHERF1 auf die CFTR-Expression bleibt weiterhin unklar. Eine in dieser Arbeit durchgeführte Überexpression von NHERF1 alleine erhöhte die Menge an Oberflächen-CFTR um etwa 10% des Ausgangswertes, während über den Einfluss auf die Gesamtmenge keine eindeutige Aussage getroffen werden kann (s. Abb. 14). Die Gesamtheit dieser Erkenntnisse weist darauf hin, dass NHERF1 keine direkte Rolle bei der CFTR-Synthese bzw. Prozessierung spielt, sondern allenfalls als Regulator in diesen Vorgang eingreifen kann. Für diese Annahme sprechen die Beobachtungen einiger Arbeitsgruppen, nach denen NHERF1 mit anderen PDZ-Proteinen wie Shank2 und PIST um die Bindungsstelle am PDZ-Liganden zu kompetieren scheint (Cheng et al., 2002 und Lee et al., 2007). In dieser Arbeit

durchgeführte Koexpressionen von PIST und NHERF1 und anschließende CFTR-Quantifizierungen mittels ELISA ergaben jedoch keinerlei Veränderungen der Oberflächenmenge des CFTR im Vergleich zu dem Versuchsansatz mit PIST, aber ohne NHERF1. Die Gesamtmenge CFTR war im Mittel bei gleichzeitiger Expression beider PDZ-Proteine ähnlich hoch wie bei Koexpression von PIST. Eine Art von CFTR-*Rescue* durch NHERF als Gegenspieler zu PIST ist nicht ausgeschlossen, allerdings war die Standardabweichung innerhalb der hierfür durchgeführten Versuche so groß, dass dieser Ansatz noch durch größere Versuchszahlen des ELISA-Experimentes oder andere Verfahren der Quantifizierung verfolgt werden müsste, um sichere Aussagen treffen zu können.

Eine weitere Herausforderung wird es in Zukunft sein, die Dynamik der Interaktion zwischen dem CFTR und seinen PDZ-Bindungspartnern zu erfassen. Die Affinität der Bindung von zum Beispiel NHERF1 zum CFTR sowie die Dauer der Interaktion sind vergleichsweise gering (Raghuram et al., 2001), sodass man hier vermutlich auf andere Methoden zur Charakterisierung der Interaktion zurückgreifen müssen. Die Zahl der über den PDZ-Liganden des CFTR potentiell möglichen Interaktionen ist groß und wird sicher durch die unterschiedliche Lokalisation der Bindungspartner innerhalb der Zelle eingeschränkt. So kann zum Beispiel der CFTR nur dann eine Bindung mit PIST eingehen, wenn sich beide im TGN befinden. Auch kommt nicht jedes PDZ-Protein in jedem Zelltyp vor, sodass sich auch hierüber die Zahl der möglichen an der Interaktion beteiligten Faktoren eingrenzen ließe.

## 6 Zusammenfassung

---

Der CFTR-Kanal ist ein Protein, dessen Expression an der Plasmamembran in vielerlei Hinsicht essentiell ist. Bei verschiedenen Erkrankungen ist diese Oberflächenexpression jedoch unvollständig und führt so in Organen zu den unterschiedlichsten Symptomatiken. Ziel dieser Arbeit war es, einen weiteren Baustein zum Verständnis der Interaktionen des CFTR innerhalb der Zelle zu liefern, um die Prozesse, die eine Expression beeinflussen, besser verstehen zu können. Diese könnten in Zukunft Ausgangspunkt für therapeutische Überlegungen sein.

In Interaktionsversuchen mit dem CFTR und verschiedenen PDZ-Domänen-Proteinen sowie deren kompensatorischen Mutanten konnte gezeigt werden, dass außer den mutierten Aminosäuren noch andere eine Rolle bei der PDZ-vermittelten Bindung spielen. Des Weiteren wurden bei einem Präzipitationsexperiment mit PIST-Fusionsproteinen sogar solche ohne PDZ-Domäne präzipitiert, sodass eventuell auch Faktoren außerhalb der PDZ-Domäne entscheidend sind. Diese Theorie bestätigte sich bei Versuchen mit GST-Fusionsproteinen, bei denen der PDZ-Ligand alleine PIST nicht präzipitierte.

In Bezug auf die Oberflächenexpression des CFTR wurden die Wirkungen der Proteine PIST und NHERF genauer betrachtet. Für NHERF alleine konnte kein Einfluss auf den CFTR nachgewiesen werden, erst im Zusammenspiel mit PIST zeigte sich eine positive Wirkung im Hinblick auf die Expression, sodass für NHERF eine Rolle als Modifikator wahrscheinlich ist.

Ein ausschließlich negativer Einfluss von PIST auf die CFTR-Expression konnte nicht bestätigt werden. Bei Koexpression und anschließender Quantifizierung mittels ELISA sowie bei der Transfektion aufsteigender Mengen von PIST-DNA in den stabil CFTR exprimierende HEK-Zellen und Auswertung mittels Western Blot war keine lineare Abnahme der CFTR-Menge in den Zellen nachweisbar, während die Menge an Oberflächen-CFTR sogar zunahm. Somit wird die Hypothese verstärkt, dass PIST vom trans-Golgi-Netzwerk aus seine Adapterproteine, wie beispielsweise den CFTR, an

weitere intrazelluläre Transportproteine koppelt. Dieser Prozess kann vermutlich auch zum CFTR-Abbau im Lysosom führen, es ist jedoch sicher nicht die einzige Möglichkeit. Somit übt PIST keinen ausschließlich negativen Einfluss aus, sondern übernimmt vielmehr eine sortierende Funktion innerhalb der Zelle. Deren Regulation ist im Einzelnen noch unbekannt, sie kann aber auch zu einer vermehrten Expression des CFTR führen.

## 7 Literaturverzeichnis

---

- Bauch, C. (2012). Kontrolle der subzellulären Sortierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors durch ein Netzwerk von PDZ-Domänen-Proteinen. Naturwissenschaftliche Dissertation. Universität Hamburg
- Ardura, J. a., & Friedman, P. a. (2011). Regulation of G Protein-Coupled Receptor Function by Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchange Regulatory Factors. *Pharmacological reviews*.
- Bergbrede, T., Chuky, N., Schoebel, S., Blankenfeldt, W., Geyer, M., Fuchs, E., Goody, R. S., et al. (2009). Biophysical Analysis of the Interaction of Rab6a GTPase with Its Effector Domains \* □. *Journal of Biological Chemistry*, 284(5), 2628–2635.
- Bezprozvanny, I., & Maximov, A. (2001). PDZ domains: More than just a glue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(3), 787–9.
- Bonifacino, J. S., & Glick, B. S. (2004). The Mechanisms of Vesicle Budding and Fusion. *Cell*, 116(1980), 153–166.
- Brenman, J. E., Chao, D. S., Gee, S. H., Mcgee, A. W., Craven, S. E., Santillano, D. R., Wu, Z., et al. (1996). Interaction of Nitric Oxide Synthase with the Postsynaptic Density Protein PSD-95 and  $\alpha$ 1-Syntrophin Mediated by PDZ Domains. *Cell*, 84, 757–767.
- Charest, A., Lane, K., McMahon, K., & Housman, D. E. (2001). Association of a novel PDZ domain-containing peripheral Golgi protein with the Q-SNARE (Q-soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF) attachment protein receptor) protein syntaxin 6. *The Journal of biological chemistry*, 276(31), 29456–65.
- Cheng, J., Moyer, B. D., Milewski, M., Loffing, J., Ikeda, M., Mickle, J. E., Cutting, G. R., et al. (2002). A Golgi-associated PDZ domain protein modulates cystic fibrosis transmembrane regulator plasma membrane expression. *The Journal of biological chemistry*, 277(5), 3520–9.
- Cheng, J., Wang, H., & Guggino, W. B. (2004). Modulation of mature cystic fibrosis transmembrane regulator protein by the PDZ domain protein CAL. *The Journal of biological chemistry*, 279(3), 1892–8.
- Cheng, J., Wang, H., & Guggino, W. B. (2005). Regulation of Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator Trafficking and Protein Expression by a Rho Family Small GTPase TC10 \*. *Biochemistry*, 280(5), 3731–3739.

- Cheng, S. H., Gregory, R. J., Marshall, J., Paul, S., Souza, D. W., White, G. A., O’Riordan, C. R., et al. (1990). Defective Intracellular Transport and Processing of CFTR Is the Molecular Basis of Most Cystic Fibrosis. *Cell*, 63, 827–834.
- Cushing, P. R., Fellows, A., Villone, D., Boisguérin, P., & Madden, D. R. (2008). The relative binding affinities of PDZ partners for CFTR: a biochemical basis for efficient endocytic recycling. *Biochemistry*, 47(38), 10084–98.
- Doyle, D. A., Lee, A., Lewis, J., Kim, E., Sheng, M., Mackinnon, R., & Hughes, H. (1996). Crystal Structures of a Complexed and Peptide-Free Membrane Protein – Binding Domain : Molecular Basis of Peptide Recognition by PDZ. *Cell*, 85, 1067–1076.
- Fanning, A. S., & Anderson, J. M. (1999). PDZ domains: fundamental building blocks in the organization of protein complexes at the plasma membrane. *The Journal of clinical investigation*, 103(6), 767–72.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391, 806–811.
- He, J., Bellini, M., Inuzuka, H., Xu, J., Xiong, Y., Yang, X., Castleberry, A. M., et al. (2006). Proteomic Analysis of  $\alpha_1$ -Adrenergic Receptor Interactions with PDZ Scaffold Proteins \* □. *Journal of Biological Chemistry*, 281(5), 2820–2827.
- Kaech, S. M., Whitfield, C. W., & Kim, S. K. (1998). The LIN-2/LIN-7/LIN-10 Complex Mediates Basolateral Membrane Localization of the *C. elegans* EGF Receptor LET-23 in Vulval Epithelial Cells. *Cell*, 94(6), 761–771.
- Kim, J. Y., Han, W., Namkung, W., Lee, J. H., Kim, K. H., Shin, H., Kim, E., et al. (2004). Inhibitory regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator anion-transporting activities by Shank2. *The Journal of biological chemistry*, 279(11), 10389–96.
- Kwon, S., Pollard, H., & Guggino, W. B. (2007). Knockdown of NHERF1 Enhances Degradation of Temperature Rescued  $\Delta F508$  CFTR from the Cell Surface of Human Airway Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 21(205), 763–772.
- Lauffer, B. E. L., Melero, C., Temkin, P., Lei, C., Hong, W., Kortemme, T., & Von Zastrow, M. (2010). SNX27 mediates PDZ-directed sorting from endosomes to the plasma membrane. *The Journal of cell biology*, 190(4), 565–74.
- Lee, J. H., Richter, W., Namkung, W., Kim, K. H., Kim, E., Conti, M., & Lee, M. G. (2007). Dynamic regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by competitive interactions of molecular adaptors. *The Journal of biological chemistry*, 282(14), 10414–22.

- Li, C., Roy, K., Dandridge, K., & Naren, A. P. (2004). Molecular Assembly of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in Plasma Membrane \*. *Biochemistry*, 279(23), 24673–24684.
- Lunn, M., Nassirpour, R., Arrabit, C., Tan, J., Mcleod, I., Arias, C. M., Sawchenko, P. E., et al. (2007). A unique sorting nexin regulates trafficking of potassium channels via a PDZ domain interaction. *Nature Neuroscience*, 10(10), 1249–1259.
- Morais Cabral, J. H., Petosa, C., Sutcliffe, M. J., Raza, S., Byron, O., Poy, F., Marfatia, S. M., et al. (1996). Crystal structure of a PDZ domain. *Nature*, 382, 649–652.
- Neudauer, C. L., Gérard, J., & Macara, I. G. (2001). PIST : A Novel PDZ / Coiled-Coil Domain Binding Partner for the Rho-Family GTPase TC10. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 547, 541–547.
- Piserchio, A., Fellows, A., Madden, D. R., & Mierke, D. F. (2005). Association of the cystic fibrosis transmembrane regulator with CAL: structural features and molecular dynamics. *Biochemistry*, 44(49), 16158–66.
- Raghuram, V., Mak, D. O., & Foskett, J. K. (2001). Regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator single-channel gating by bivalent PDZ-domain-mediated interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(3), 1300–5.
- Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B., Alon, N. O. A., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., et al. (1989). Identification the Cystic Fibrosis Gene : Cloning and Characterization of Complementary DNA. *Science*, 245, 1066–1073.
- Schnell, E., Sizemore, M., Karimzadegan, S., Chen, L., Bredt, D. S., & Nicoll, R. A. (2002). Direct interactions between PSD-95 and stargazin control synaptic AMPA receptor number. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(21), 13902–13907.
- Short, D. B., Trotter, K. W., Reczek, D., Kreda, S. M., Bretscher, A., Boucher, R. C., Stutts, M. J., et al. (1998). An Apical PDZ Protein Anchors the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator to the Cytoskeleton \*. *Biochemistry*, 273(31), 19797–19801.
- Songyang, Z., Sullivan, K. F., Rev, A., & Biol, C. (1997). Domains Recognition of Unique Carboxyl-Terminal Motifs by Distinct PDZ Domains. *Science*, 275(1997).
- Sun, F., Hug, M. J., Lewarchik, C. M., Yun, C. C., Bradbury, N. A., & Frizzell, R. A. (2000). E3KARP Mediates the Association of Ezrin and Protein Kinase A with the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in Airway Cells \*. *Biochemistry*, 275(38), 29539–29546.

- Temkin, P., Lauffer, B., Jager, S., Cimermancic, P., Krogan, N. J., von Zastrow, M. A. (2011). SNX27 mediates retromer tubule entry and endosome-to-plasma membrane trafficking of signaling receptors. *Nat Cell Biol*, 13(6), 717–723.
- Wang, C. K., Pan, L., Chen, J., & Zhang, M. (2010). Extensions of PDZ domains as important structural and functional elements. *Protein Cell*, 1(8), 737–751.
- Wang, S., Yue, H., Derin, R. B., Guggino, W. B., & Li, M. (2000). Accessory Protein Facilitated CFTR-CFTR Interaction , a Molecular Mechanism to Potentiate the Chloride Channel Activity. *Cell*, 103, 169–179.
- Wolde, M., Fellows, A., Cheng, J., Kivenson, A., Coutermarsh, B., Talebian, L., Karlson, K., et al. (2007). Targeting CAL as a negative regulator of DeltaF508-CFTR cell-surface expression: an RNA interference and structure-based mutagenetic approach. *The Journal of biological chemistry*, 282(11), 8099–109.
- Xu, Z., Oshima, K., & Heller, S. (2010). PIST regulates the intracellular trafficking and plasma membrane expression of Cadherin 23. *BMC Cell biology*, 11(1), 80.
- Yao, R., Maeda, T., Takada, S., & Noda, T. (2001). Identification of a PDZ Domain Containing Golgi Protein , GOPC , as an Interaction Partner of Frizzled. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 778, 771–778.

## 8 Danksagung

---

Besonderer Dank gilt an erster Stelle Herrn PD Dr. Hans-Jürgen Kreienkamp für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die zahlreichen fachlich anregenden Gesprächen während meiner Laborzeit. Auch für die daran anschließende Betreuung beim Verfassen dieser Arbeit sowie das Korrekturlesen möchte ich mich herzlich bedanken.

Die gesamte Arbeitsgruppe stand mir ebenfalls jederzeit für Rückfragen und Anregungen zur Verfügung. Insbesondere Frau Dr. Carola Bauch sowie Herrn Hans-Hinrich Hönck gebührt großer Dank für die Hilfestellung, die sie mir gerade zu Beginn meiner Laborarbeit zukommen ließen. Ich möchte mich bei allen ausdrücklich für die nette Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die kollegiale Unterstützung im Zuge meines Promotionsvorhabens bedanken. Die geduldige Beantwortung aller entstehenden Fragen hat mir sehr geholfen.

Bei Herrn Oliver Behrla sowie meinem Vater, Herrn Dr. Norbert Sieverding, möchte ich mich ebenfalls bedanken für das wiederholte Korrekturlesen der vorliegenden Dissertation.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern, ohne die ich nicht da wäre, wo ich heute bin, sowie meinem Freund Anton für die durchgängige Unterstützung und Soforthilfe bei entstehenden Problemen technischer Natur.

## 9 Eidesstattliche Erklärung

---

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....