Universität Ulm
Institut für Angewandte Physiologie
Prof. Dr. Dr. h. c. Frank Lehmann-Horn

Interaktion des Endophilins SH3GL3 mit dem Ca^{2+}-aktivierten Kaliumkanal *h*SK3

Dissertation
zur Erlangung
des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von
Anselm Cornelius Hoppner
aus Prien a. Chiemsee
2007

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Stephan Grissmer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Holger Lerche

Tag der Promotion: 19.6.2008

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

1 Einleitung 1

1.1 Funktion und Struktur von *h*SK3 1

1.2 Struktur und Funktion der Endophiline 4

1.3 Der Pull-Down-Assay 8

1.4 Aufgaben und Ziele dieser Arbeit 11

2 Material und Methoden 12

2.1 Plasmide und Klonierungen 12

2.1.1 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli* Bakterien 13

2.1.2 PCR und Klonierung von SH3GL3 und SH3GL3ΔSH3 14

2.1.3 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen 16

2.2 SDS-Gelelektrophorese und Westernblot 17

2.3 Expression und Expressionskontrolle 21

2.4 Proteinkonzentrationsbestimmung 22

2.5 Pull-Down-Assay 24

2.5.1 PolyHis-Pull-Down-Assay 24

2.5.1.1 Vorbereiten und Waschen der Säulen 24

2.5.1.2 Beladen der Säulen mit dem „Bait/Köder“ 24

2.5.1.3 Interaktion von „bait/Köder“ und „prey/Räuber“ 25

2.5.1.4 Elution 25

2.5.2 GST-Pull-Down-Assay 25

2.5.2.1 Vorbereiten und Waschen der Säulen 25

2.5.2.2 Beladen der Säulen mit dem „bait/Köder“ 25

2.5.2.3 Interaktion von „Bait/Köder“ und „Prey/Beute“ 26

2.5.2.4 Elution 26

3 Ergebnisse 27

3.1 Klonierung von SH3GL3 und SH3GL3ΔSH3 27

3.2 Expressionskontrolle 28

3.2.1 Expression und Bestimmung der Laufhöhen von SH3GL3 und SH3GL3ΔSH3 28

3.2.2 Expression und Bestimmung der Laufhöhen von GST und des GST-getaggten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 32

3.3 Pull-Down Assay 36
3.3.1 Kontrollexperimente 37
3.3.1.1 Bindung der Köderproteine SH3GL3 an Immobilized Cobalt Chelate Gel und Entfernung ungebundenen Köderproteins 38
3.3.1.2 Immobilized-bait-Kontrolle (IBC) 40
3.3.1.3 Non-Treated-Gel-Kontrolle (NTC) 41
3.3.2 Pull-Down-Experimente 43
3.3.2.1 Interaktion von SH3GL3 mit dem N-terminalen Abschnitt des *h*SK3 43
3.3.2.2 Interaktion von SH3GL3-ΔSH3 mit dem N-terminalen Abschnitt des *h*SK3 46
3.3.3 Zusammenfassung der Pull-Down-Ergebnisse 47
4 Diskussion 48
4.1 Expression und Bestimmung der apparenten Molekulargewichte 48
4.1.1 SH3GL3 48
4.1.2 SH3GL3ΔSH3 48
4.1.3 GST und der GST-getagte N-terminale Abschnitt des *h*SK3 48
4.2 Elution von SH3GL3 50
4.3 Kontrollexperimente 51
4.3.1 Immobilized-bait-Kontrolle 51
4.3.2 Non-treated-gel-Kontrolle 52
4.4 Pull-Down-Experimente 53
4.5 Der N-terminale Abschnitt des *h*SK3 55
4.6 Funktion der *h*SK3:SH3GL3-Interaktion 57
5 Zusammenfassung 60
6 Literaturverzeichnis 62
7 Danksagung 69

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
%C	Anteil AA-Monomer am PAA-Gel in Gewichtsanteilen
%T	Gesamtkonzentration Acrylamid-Monomer in g/ml
10x	Zehnfach konzentriert
Acyl-CoA	Acyl-Coenzym A
Anti-GST, Anti-SH3GL3, Anti-SK3	Antikörper gegen GST, SH3GL3, bzw. SK3
APS	Ammoniumpersulfat
BAR-Domäne	N-terminale Domäne der Endophiline
BCA	2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure
BL21, BL21 DE3	E.coli-Bakterien-stämme
$CaCl_2$	Kalziumchlorid
Ca^{2+}	Calciumion
C-terminal	Carboxyterminal
DNA	Desoxyribo-nukleinsäure
DdH_20	Doppelt destilliertes, steriles Wasser
DNTP	Desoxyribonukleosidtri-phosphate
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
F	Multiplikationsfaktor
GST	Glutathion-S-Trans-ferase
GST-tag	An ein Protein fusioniertes GST zur Expression, Aufreinigung und Identifizierung mittels geeigneter Antikörper
g	Gramm
g/l	Gramm pro Liter
h	Stunde(n)
His-tag	Polypeptid,dessen Amino-säuresequenz 6 Histidine enthält
hSK3	Humaner Ca^{2+}-aktivierter K^+-Kanal mit kleiner Leitfähigkeit 3
IBC	Immobilized-bait-Kontrolle
ICD 10	International Code of Diseases
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
KCNN3	Synonym für SK3
kDA	Kilodalton
KNO_3	Kaliumnitrat
Λ	Wellenlänge
LPA	Lysophosphatidsäure
LPAAT	Lysophosphatidic acid acyl transferase activity
LB	Bakterienmedium
LTP	Long term potentiation
M	Molar
mA	Milliampere
max.	Maximal
Min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar

ml/l	Milliliter pro Liter
mRNA	Messenger RNA
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NTC	Non-treated-Kontrolle
N-terminal	aminoterminal
OD	Optische Dichte
OD_{600}	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD	Pulldown
PET28(a), PET100/D-TOPO, PGEX-6P1	Vektoren für die pro-karyote Expression
PRD	Prolinreiche Domäne
PSD95	Post synaptic density protein 95
PXXP	Aminosäuresequenz, N- und C-terminal von einem Prolin begrenzt
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)

TBS	Tris-buffered saline
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SH3GL1-3	Src homology 3 containing Grb2-like protein 1-3
SH3GL3ΔSH3	Ein um die SH3 Domäne verkürztes SH3GL3
SKCa1-3, SK1-3, KCNN1-3	Ca^{2+}-gesteuerter K^{+}-Kanal mit kleiner Leitfähigkeit 1-3
SLMV	Synaptic like microvesicles
TEMED	Tetramethylethylendiamin
V	Spannung in Volt
Vf	Verdünnungsfaktor bei der Proteinkonzentrat-ionsbestimung
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
WA1, WA5	Waschschritte 1 und 5 vor Inkubation mit dem 2. Protein of interest
WB1, WB8	Waschschritte 1 und 5 nach Inkubation mit dem 2. Protein of interest

1 Einleitung

Viele Eigenschaften erregbarer und nicht erregbarer Zellen sind von Ionenkanälen in der Zellmembran abhängig. Die Eigenschaften dieser Ionenkanäle werden durch die Selektivität für bestimmte Ionen, Leitfähigkeit, Aktivierung, Inaktivierung, Aktivatoren und Blocker charakterisiert. Diese Eigenschaften der α-Untereinheiten werden bei vielen Ionenkanälen durch β-Untereinheiten modifiziert. So wird der Ca^{2+}-aktivierte Kaliumkanal *h*SK3 aktiviert, wenn Ca^{2+} an die β-Untereinheit Calmodulin bindet (Xia *et al*., 1998). Die Bindung einer weiteren potenziellen Untereinheit, SH3GL3, an *h*SK3 soll in dieser Arbeit beschrieben werden.

1.1 Funktion und Struktur von *h*SK3

Der *h*SK3 ist ein Ca^{2+}-aktivierter, kaliumselektiver Ionenkanal, der vor allem im Gehirn, bevorzugt in der Substantia Nigra, aber auch in der Amygdala, dem Nucleus caudatus, dem Thalamus und dem Hippocampus, sowie im Tegmentum, dem Kleinhirn, der Hypophyse und dem Rückenmark exprimiert wird. Außerdem kommt der Kanal auch im Immunsystem, der Muskulatur (Skelettmuskel unter pathologischen Bedingungen bei der Myotonen Dystrophie, im Myometrium), dem Urogenitalsystem (Prostata, Nieren, Keimzellen), und dem Gastrointestinaltrakt (Leber, Pankreas, Kolon) vor (Köhler *et al.* 1996, Dror *et al.* 1999, Stocker und Pedarzani 2000).

Der *h*SK3 wird durch Ca^{2+} im micromolaren Bereich mittels des am C-Terminus gebundenen Calmodulin geöffnet und ist an der Entstehung der langsamen Nachhyperpolarisation (sAHP, slow after-hyperpolarisation) erregbarer Zellen beteiligt (Hosseini *et al.* 2001, Wolfart *et al.*, 2001). Der Kanal ist ein Tetramer aus vier α-Untereinheiten mit 733 Aminosäuren und sechs Transmembrandomänen. Abbildung 1 soll den Aufbau einer α-Untereinheit veranschaulichen.

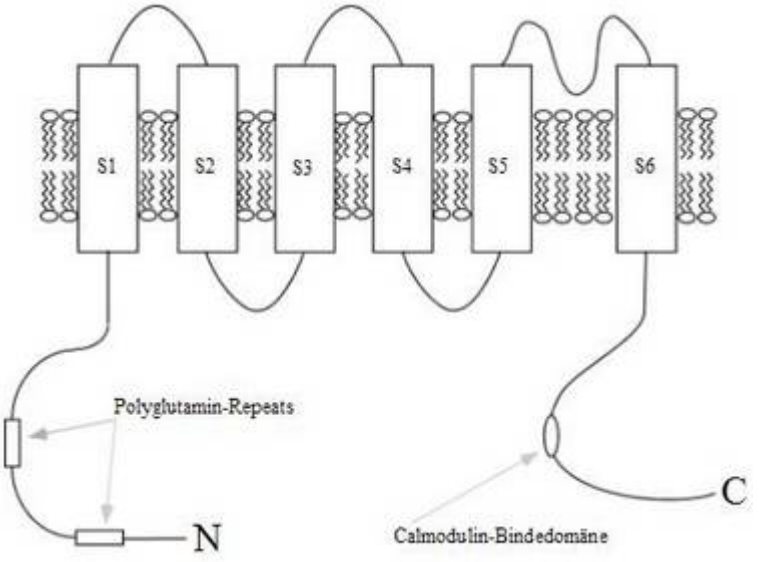

Abb. 1: Schematische Darstellung einer *h*SK3-α-Untereinheit

Der cytoplasmatische C-Terminus des *h*SK3 verfügt über eine Calmodulin-Bindedomäne, worüber die Ca^{2+}-abhängige Aktivierung des Kanals durch Calmodulin vermittelt wird (Xia *et al.*, 1998). Der N-Terminus des *h*SK3 verfügt über zwei glutaminreiche Domänen, die auch als Polyglutamin-Repeats bezeichnet werden, die durch eine prolinreiche Region, die mehrere putative PXXP-Motive enthält, getrennt werden. In den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten wurde eine N-terminale Sequenz des *h*SK3 verwendet, die über 12 Glutamine in einer ersten und 19 Glutamine in einer zweiten glutaminreichen Region verfügt (siehe Abbildung 2), die durch die prolinreiche Region getrennt werden. Dieser Bereich des *h*SK3 zeigt Ähnlichkeit mit einer prolinreichen Region des Proteins Huntingtin, das über diese prolinreiche Region mit dem Endophilin SH3GL3 interagiert (Sittler *et al.*, 1998).

Um die Lesbarkeit zu verbessern, ist mit *h*SK3-N-Terminus in dieser Arbeit die N-terminale Sequenz des *h*SK3 mit 19 Glutaminen in der zweiten glutaminreichen Region gemeint, wenn dies nicht anders vermerkt ist.

Abbildung 2 stellt die Sequenz der Aminosäuren 24-110 des *h*SK3 mit 19 Glutaminen im zweiten Polyglutaminrepeat dar.

...$_{24}$SSGDEQQQQQQQQQQQPPPPAPPAAPQQPLGPSLQ

PQPPQLQQQQQQQQQQQQQQQQQQQPPHPLSQLAQ$_{110}$...

Abb. 2: **Sequenz der Aminosäuren 24 – 110 des N-Terminus von *h*SK3**

Rot markiert die prolinreiche Region, blau die glutaminreichen Regionen.

Es ist mittels konfokaler Mikroskopie an Neuronen aus Maus-Hippocampus gezeigt worden, dass in exzitatorischen Synapsen der SK3-Kanal präsynaptisch vorkommt, und mit dem präsynaptischen Marker Synapsin kolokalisiert und relative Nähe von etwa 0,5 µm, aber keine Kolokalisation, zu dem postsynaptischen Marker PSD95 und NMDA-Rezeptoren aufweist (Obermair, 2003).

In Hefe-Zwei-Hybrid-Versuchen konnte eine Interaktion zwischen verschiedener N-terminaler Abschnittes des *h*SK3 miteinander, dem N-Terminus und dem C-Terminus des *h*SK3 sowie dem N-Terminus des *h*SK3 mit dem Endophilin SH3GL3 gezeigt werden (Spindler, 2003). Auf die Interaktion des *h*SK3 mit dem Endophilin SH3GL3 soll in dieser Arbeit weiter eingegangen werden.

Die Frage, bei welchen physiologischen Vorgängen der SK3-Kanal eine Bedeutung hat, ist noch nicht geklärt. Eine physiologische Bedeutung für das altersabhängige Lernverhalten von Mäusen wurde mit der Veränderung von LTPs durch SK3-Kanäle in Verbindung gebracht (Blank *et al.*, 2003). Weiterhin ist beschrieben worden, dass der SK3 in GnRH-sezernierenden Hypothalamusneuronen exprimiert wird, in diesen Zellen eine langsames Nachhyperpolarisation nachweisbar ist und 17β-Östradiol die Expression der SK3-mRNA erhöht (Bosch *et al.*, 2003) und daher der SK3-Kanal möglicherweise bei der Hemmung der GnRH-Sekretion durch 17β-Östradiol im Menstruationszyklus eine wichtige physiologische Rolle übernimmt. Die Bedeutung des SK3-Kanals für die Pathophysiologie verschiedener Krankheiten ist weiterhin ungeklärt. Bei der häufigsten dystrophischen Myopathie des Erwachsenen, der Myotonen Dystrophie vom Typ I (ICD 10: G71.1), hat der *h*SK3-Kanal möglicherweise eine Funktion in der Pathogenese der Myotonie. Die Applikation des SK3-Blockers Apamin in betroffene Muskeln verhindert die Auslösung myotoner Entladungen bei Beklopfen der Muskeln (Behrens *et al.*, 1994). Die Bedeutung

der CAG-Repeat –Verlängerung für die erbliche Schizophrenie und bipolare Störungen im KCNN3-Gen (Chandy *et al.*, 1998; Cardno *et al.*, 1999) ist weiterhin unklar.

1.2 Struktur und Funktion der Endophiline

Endophiline sind Proteine, denen gemein ist, dass sie über eine SH3-Domäne, eine „coiled-coil-Region“ und eine BAR-Domäne verfügen. Während SH3-Domänen mit prolinreichen Regionen interagieren, homo- und heterodimerisieren Endophiline über die coiled-coil-Region. Die BAR-Domäne bindet Fettsäuren und soll bei einigen Endophilinen über eine Lysophophatidsäure-Acyl-Transferase-Aktivität verfügen. Abbildung 3 stellt schematisch den Aufbau eines SH3GL3-Monomers dar.

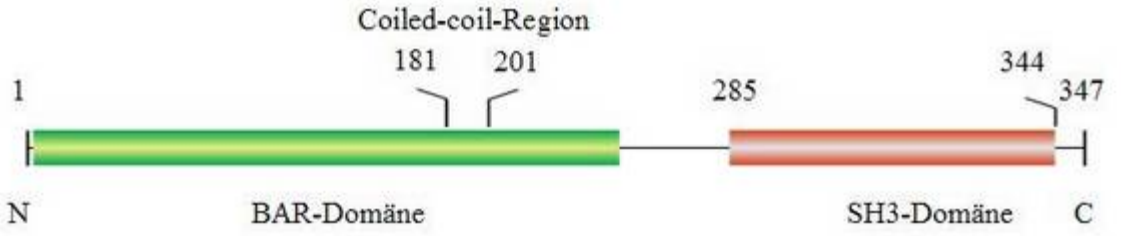

Abb. 3: Schematische Darstellung eines SH3GL3-Monomers

Zu den BAR-Domänen-Proteinen gehören 6 Familien, wobei die Endophiline A1 (SH3GL2), A2 (SH3GL1), A3 (SH3GL3) und B zusammen mit Nadrin und SH-BP1 eine Unterfamilie bilden (Habermann, 2005). Die Endophiline werden unterschiedlich exprimiert, wobei SH3GL1 ubiquitär, SH3GL2 vor allem im zentralen Nervensystem und SH3GL3 im zentralen Nervensystem und im Testes exprimiert wird (Giachino *et al.*, 1997). Die Übersicht über die Endophiline wird durch mehrere verschiedene Bezeichnungen erschwert, weshalb diese kurz in Tabelle 1 erwähnt sind.

Tab. 1: Bezeichnungen der Endophiline und Accessionnummern

Name	*Accessionnummer*	*Alternativnamen*
Endophilin A1	NM_003026	SH3GL2, Endophilin I, SH3p4
Endophilin A2	NM_003025	SH3GL1, Endophilin II, SH3p8, EEN
Endophilin A3	X99664	SH3GL3, Endophilin III, SH3p13
Endophilin B	AF263293	
Nadrin	NM_018054	
SH3-BP1	NM_018957	

Vergleicht man die Sequenzen der Mitglieder dieser Familie (Abb. 4), so kann man zu dem Schluss kommen, dass SH3GL3 und SH3GL2 die größte Ähnlichkeit miteinander aufweisen.

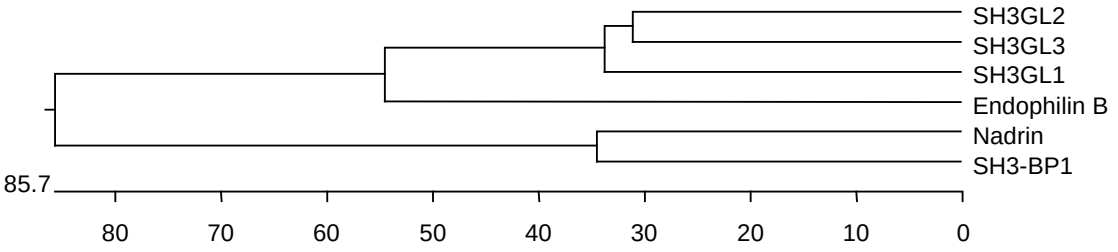

Abb. 4: Phylogenetischer Baum der Endophilin-Familie

Verglichen wurden die Sequenzen mit den in Tab. 1 genannten Accessionnummern. Angelehnt an Habermann (Habermann, 2004).

Die Endophiline binden Dynamin und Synaptojanin über ihre SH3-Domäne (Ringstad *et al.*,1997), dies hat eine funktionelle Bedeutung bei der Endozytose, SH3GL2 ist notwendig beim Übergang der frühen zu den späten Stadien der Clathrin-vermittelten Endozytose synaptischer Vesikel (Ringstad *et al.*,1999). SH3GL2 hat eine Funktion bei der Bildung von synaptic-like microvesicles (SLMV), indem es Acyl-CoA und LPA bindet und über eine LPAAT verfügen soll, welche die Bildung von SLMVs begünstigt (Schmidt *et al.*, 1999). In Drosophila konnte bei Endophilin A negativen Mutanten eine Verringerung in den frühen Stadien der Endozytose im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden (Guichet *et al*., 2002). Die LPAAT ist keine essentielle Funktion der

Endophiline, nicht alle Isoformen verfügen über sie (Modregger *et al*., 2003). So konnte bei SH3GL3 eine Lysophosphatidsäure-Acyl-Transferase-Aktivität nicht nachgewiesen werden. Dies scheint funktionell bedeutsam zu sein, da damit konsistent eine verringerte Rezeptor-vermittelte Endozytose von D_2-Rezeptoren (Sugiura *et al.*, 2004) gezeigt werden konnte. Dies wurde durch eine β-Faltblattanordnung der Aminosäuren 261-265 in SH3GL3 erklärt, während SH3GL2 und SH3GL1 über eine kurze α-helikale Sekundärstruktur im Bereich der Aminosäuren 261-264 verfügen. Das Fehlen dieser α-Helix und damit eine veränderte Konformation wurde als Erklärung für die fehlende Enzymaktivität herangezogen. Dabei muss die Fähigkeit von SH3GL3 zur Bindung von Fettsäuren nicht zwangsläufig eingeschränkt sein, da für die Kosedimentation mit Liposomen mit SH3GL2 ein N-terminaler Abschnitt der BAR-Domäne notwendig ist (Farsad, *et al.* 2001).

Aufgrund des relativen Größenverhältnisses zwischen polarer Kopfgruppe sowie Zahl und Größe der Fettsäure-Reste können Membranlipide verschiedene Formen annehmen und in der „cone shape"- oder „inverted cone shape"-Form in der Membran vorliegen. Die Lysophosphatidsäure-Acyltransferase, englisch „lysophospatidic acid acyl transferase" (LPAAT), überträgt Fettsäuren von Acyl-CoA auf das C_2-Atom des Glycerols in Lysophosphatidsäure. Das Reaktionsprodukt Phosphatidsäure nimmt in der Membran die Form eines „cone shaped"-Lipids ein, während bei Lysophosphatidsäure durch das Fehlen des Fettsäure-Restes am C_2-Atom als „inverted cone shape"-Lipid vorkommt. Abbildung 5 soll dies veranschaulichen.

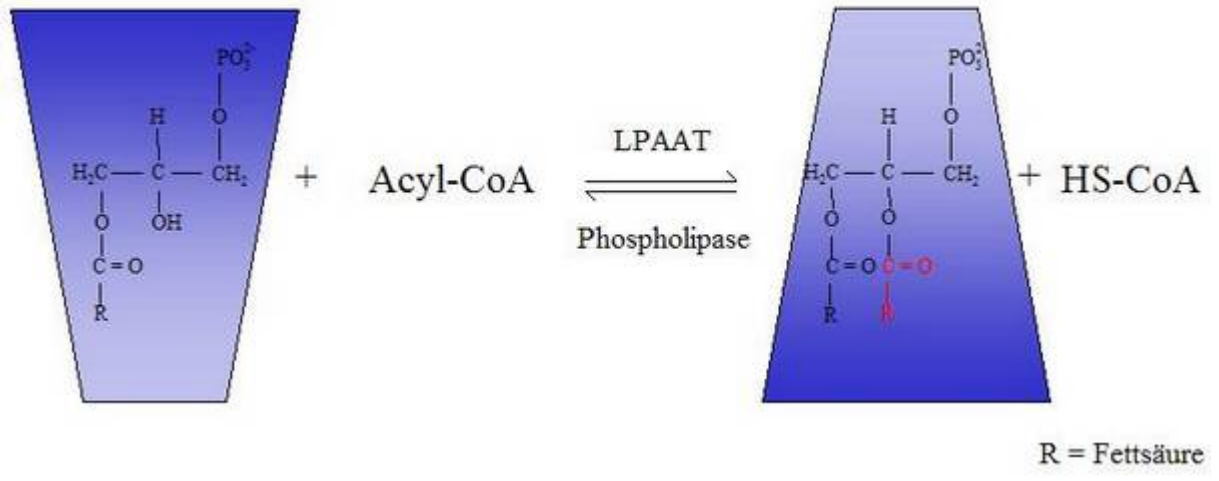

Abb. 5: **Phosphatidsäure und Lysophosphatidsäure und deren Überführung ineinander mittels LPAAT und Phospholipase A_2 (modifiziert nach Scales und Scheller, 1999)**

Während der Endozytose ist bei der Abschnürung der endozytotischen Vesikel eine Veränderung der Membrankurvatur notwendig, bei der in diesem Modell das Verhältnis von Lysophosphatidsäure zu Phosphatidsäure zugunsten der Phosphatidsäure verschoben wird. Dies soll im Bereich des „Halses" der endozytotischen Vesikel durch eine Umstülpung der konkaven in eine konvexe Kurvatur der Zellmembran ermöglicht werden (Schmidt *et al.*, 1999, Scales und Scheller, 1999, Übersicht bei Huttner *et al.,* 2000).

Diese Hypothese ist allerdings nicht unumstritten. Von einigen Autoren werden die Ergebnisse von Schmidt als Artefakt gesehen. Eine LPAAT von in *E.coli* BL21 exprimiertem und mittels GST-tag aufgereinigtem SH3GL1 war messbar, diese Enzymaktivität konnte jedoch in für die Strukturaufklärung mittels Kristallographie aufgereinigtem SH3GL1 nicht nachgewiesen werden (Gallop *et al.*, 2005).

Als weitere Möglichkeit der Funktion der Endophiline bei der Endozytose wird vermutet, dass Dimere der BAR-Domänen an die Lipiddoppelschicht binden, sich mit je einem N-terminalen amphipathischen Fortsatz beider Monomere und mit einer amphipathischen „Kante" in die Membran integrieren und den Beugungswiderstand der Membran durch die elektrostatischen Kräfte zwischen den Phosphatresten der Lipide und positiv geladenen Aminosäureseitenketten des starren BAR-Domänengerüsts überwinden und so der Membran konkav (nach innen gestülpt) verformen (McMahon *et al.*, 2005; Masuda *et al.*, 2006, Gallop *et al.*, 2006).

Dabei wird jedoch die Bedeutung von Dynamin nicht berücksichtigt, für das neben seiner Funktion beim „Abschnüren" des Vesikelhalses weiterhin eine Funktion in der Spätphase der Invagination der coated pits postuliert wurde (Hill *et al.*, 2006).

1.3 Der Pull-Down-Assay

Der Pull-Down-Assay ist eine Methode, um zwei oder mehr Proteine auf Interaktion zu testen. Dabei wird ein „protein of interest“ an ein Trägermaterial auf einer Säule gebunden (Schritt 1), das nicht gebundene Protein mittels mehrerer Waschschritte entfernt und das gebundene Protein mit dem zweiten „protein of interest“ inkubiert (Schritt 2). Nach Inkubation wird das nicht gebundene Protein mittels mehrerer Waschschritte entfernt und anschließend das erste „protein of interest“ eluiert (Schritt 3).

Lassen sich anschließend beide „proteins of interest“ im Eluat nachweisen (zum Beispiel mittels Westernblot), liegt eine Interaktion vor.

Abb. 6 soll dies veranschaulichen. Dabei wurde, der Einfachheit halber, das in Schritt 1 gebundene Protein mit SH3GL3, das in Schritt 2 inkubierte Protein mit SK3 bezeichnet, da dies der in dieser Arbeit vorgestellten Methodik entspricht.

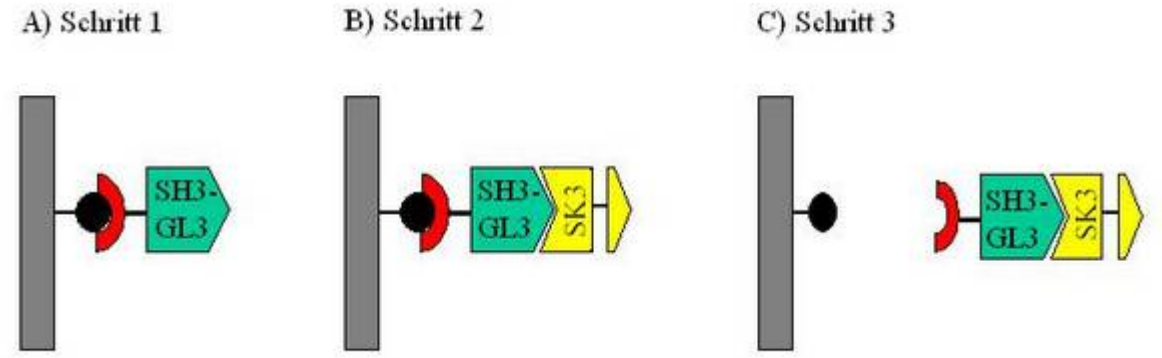

Abb. 6: Prinzip des Pull-Down-Experiments

A) In Schritt 1 wird das erste „protein of interest“ (hier SH3GL3) an Immobilized Cobalt Chelate Gel gebunden. B) In Schritt 2 findet die Bindung des zweiten „protein of interest“ (hier der GST-getagte N-terminale Abschnitt des *h*SK3) an das Erste statt. C) In Schritt 3 werden die aneinander gebundenen „proteins of interest“ eluiert.

Um ein falsch positives Ergebnis des Tests als solches zu erkennen, muss man testen, ob das zweite „protein of interest“, wenn es sich um ein Fusionsprotein mit einem Tag, z. B. einem GST-tag, handelt, mittels des Tags an das erste „protein of interest“ oder an das Trägermaterial bindet.

Abb. 7 soll dies veranschaulichen.

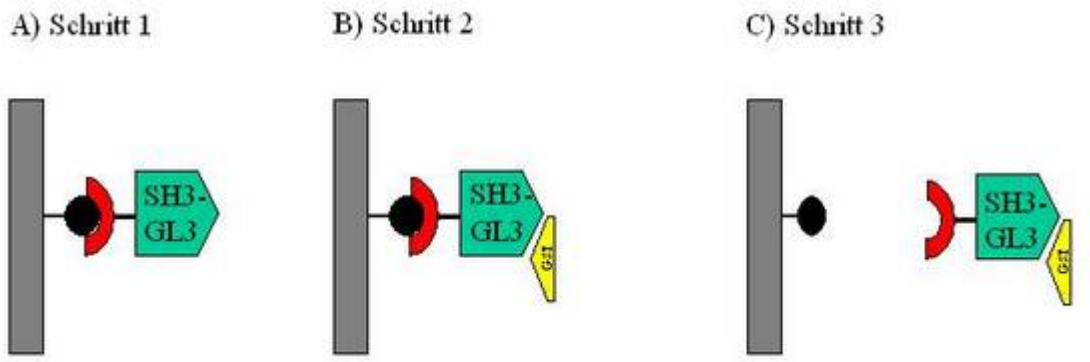

Abb. 7: Prinzip der IBC-Kontrolle

A) In Schritt 1 wird das erste „protein of interest“ (hier SH3GL3) an Immobilized Cobalt Chelate Gel gebundenen. B) In Schritt 2 wird SH3GL3 mit GST inkubiert. C) In Schritt 3 wird untersucht, ob in Schritt 2 eine Bindung des GSTs an SH3GL3 stattfindet.

Eine weitere Fehlermöglichkeit bei Pull-Down-Assays besteht darin, dass das zweite „protein of interest“ u. U. an das Trägermaterial bindet, an welches das erste „protein of interest“ bereits gebunden ist. So wurde Syntaxin 1A in Koimmunpräzipitationen mit Antikörpern gegen 6 verschiedene Kaliumkanäle als Interaktionspartner gefunden (Fletcher *et al*., 2003). Allerdings wurde in der gleichen Arbeit gezeigt, dass Syntaxin 1A sowohl an Agarose in Pull-Down-Assays, als auch an Sepharose A in Koimmunpräzipitationen bindet.

Um ein falsch positives Ergebnis des Pull-Down-Assays zu erkennen, wurde die NTC-Kontrolle durchgeführt, deren Prinzip Abb. 8 veranschaulichenn soll.

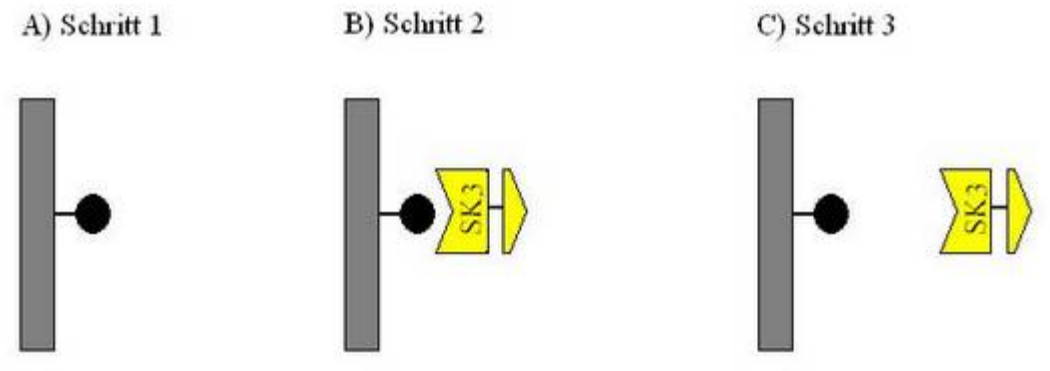

Abb. 8: Prinzip der NTC-Kontrolle

A) In Schritt 1 wird das Lysat von nicht transfizierten *E.coli* BL21 DE3 mit dem Immobilized Cobalt Chelate Gel inkubiert B) In Schritt 2 wird das Immobilized Cobalt Chelate Gel mit Lysat des GST-getagten N-terminalen Abschnitt des *h*SK3 inkubiert. C) In Schritt 3 wird untersucht, ob in Schritt 2 eine Bindung des GST-getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 an das Immobilized Cobalt Chelate Gel stattfindet.

1.4 Aufgaben und Ziele dieser Arbeit

Proteine kommen häufig nicht als Monomere, sondern als Multimere gleicher oder verschiedener Proteine vor. Die Bindung eines Proteins wird durch Domänen der interagierenden Proteine vermittelt. So verfügen viele Proteine mit Funktionen in der intrazellulären Signalübertragung über SH2, SH3 oder PH-Domänen oder deren Bindungspartner wie PXXP-Motive (Pawson, 1995). Diese Bindungen müssen, wenn durch sie zum Beispiel das Trafficking eines der Partnerproteine in ein bestimmtes Zellkompartiment oder eine bestimmte Funktion im Zellzyklus reguliert wird, hochspezifisch sein. SH3-Domänen sind schon seit einiger Zeit als Interaktionspartnern von prolinreichen Regionen bekannt, zum Beispiel bei der Interaktion von Endophilin mit Huntingtin (Sittler *et al.*, 1998), Dynamin oder Synaptojanin (Ringstadt *et al.*, 1997). In Hefe-Zwei-Hybrid-Versuchen lies sich zeigen, dass SH3GL3 mit den N-terminalen 299 Aminosäuren des Ca^{2+}-aktivierten Kaliumkanals *h*SK3 interagiert. Außerdem gibt es in diesen Hefe-Zwei-Hybrid Versuchen keine Interaktion der N-terminalen Aminosäuren des *h*SK3 mit anderen Proteinen mit SH3-Domänen (Spindler, 2003, Spindler *et al*., 2003b).

Im Rahmen dieser Arbeit sollten

a) SH3GL3 und ein um die SH3-Domäne verkürztes SH3GL3 (im weiteren als SH3GL3ΔSH3 bezeichnet) in einen geeigneten prokaryoten Expressionsvektor kloniert werden;
b) nach Expression die apparente Laufhöhe von SH3GL3 und SH3GL3ΔSH3 sowie dem putativen an GST fusionierten Interaktionspartner, den 299 N-terminalen Aminosäuren des *h*SK3 bestimmt werden;
c) ein geeigneter Pull-Down-Assay ausgewählt werden;
d) mittels dieses Pull-Down-Assay biochemisch untersucht werden, ob eine Interaktion zwischen SH3GL3 und den N-terminalen 299 Aminosäuren von *h*SK3 *in vitro* stattfindet;
e) mittels Deletion der SH3-Domäne des SH3GL3 untersucht werden, ob die SH3-Domäne des SH3GL3 als Bindedomäne bei der Interaktion mit den N-terminalen 299 Aminosäuren von *h*SK3 fungiert.

2 Material und Methoden

2.1 Plasmide und Klonierungen

Für die Kultur und Transfektion der *E.coli*-Zellen wurden einige in der Molekularbiologie übliche Lösungen verwendet, deren Zusammensetzung kurz in Tabelle 2 dargestellt wird. Die benutzten *E.coli*-Bakterienstämme werden kurz in Tabelle 3 skizziert. Tabelle 4 listet die verwendeten Plasmide mit Schnittstellen, Inserts und Genprodukten auf.

Tab. 2: Lösungen für die Molekularbiologie

Lösung	***Zusammensetzung***
TYGPN-Medium	20 g/l Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 10 g/l KNO_3, 10 ml/l 80 % Glycerin, 5 g/l Na_2HPO_4
LB-Medium	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl; pH 7,0
LB-Agar	LB Medium mit 1,5 % (w/v) Agar, pH 7,0; autoklaviert
$CaCl_2$-Lösung	100 mM $CaCl_2$, steril filtriert

Tab. 3: Für Klonierungen eingesetzte *E. coli*-Bakterienstämme

Bakterienstamm	***Genotyp***	***Zitat***
XL-1 Blue	*recA*1, *endA*1, *gyrA*96, *thi-1, hsdR*17, *supE*44, *relA*1, *lac* [F‘ *proAB*, lacI^{q}ZΔM15, Tn*10* (Tet^r)]	Bullock *et al.*, 1987
TOP 10 F	F- *mcr*A Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) Φ80*lac*ZΔM15 Δ*lac*X74 *rec*A1 *deo*R *ara*D139 Δ(*ara-leu*)7697 *gal*U *gal*K *rps*L (Str$_R$) *end*A1 *nup*G	Xu et al., 2003

Tab. 4: Plasmide für die Transformation von *E. coli* mit Bezeichnung des Genprodukts

Bezeichnung	***Leervektor***	***Insert***	***Insert-länge (bp)***	***Schnitt-stellen***	***Genprodukt***
PGEX	pGEX-6P1	-	-	-	GST
pGEX-SK3	PGEX-6P1	N-terminale 897 Nukleotide von *h*SK3	897	BamH1, XhoI	GST-SK3-N-Terminus
pET100/D-TOPO-SH3GL3	pET100/D-TOPO	SH3GL3	1065	-	SH3GL3
pET100/D-TOPO-SH3GL3ΔSH3	pET100/D-TOPO	SH3GL3 mit deletierter SH3-Domäne	853	-	SH3GL3ΔSH3
PET28(a)-SH3GL3	pET 28(a)	SH3GL3	1065	BamH1, XhoI	SH3GL3
pET28(a)-SH3GL3ΔSH3	pcDNA3.1/V5-His-TOPO TA	SH3GL3 mit deletierter SH3-Domäne	853	BamH1, XhoI	SH3GL3ΔSH3

2.1.1 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli* Bakterien

Die *E. coli*-Zellen aus Tabelle 2 und 3 wurden mit den verwendeten Plasmiden für Klonierungen und zur Proteinexpression mittels der $CaCl_2$-Methode transformiert (Mandel & Higa, 1970; Cohen *et al.*, 1972).

Eine Übernachtkultur von *E. coli* in LB-Medium wurde auf eine OD_{600} von etwa 0,1 verdünnt. Bei 37 °C und 180 rpm wurde eine Bakterienkultur bis zu einer OD_{600} von etwa 0,3-0,4 kultiviert. Die Kultur wurde 10 min bei 1000-fscher Erdbeschleunigung und 4° C zentrifugiert und das Pellet in $CaCl_2$-Lösung aufgenommen, wobei das Volumen in der $CaCl_2$-Lösung die Hälfte des Ausgangsvolumens war. Nach 15 Minuten Inkubation auf Eis wurde erneut zentrifugiert und das Pellet in 1/10 des Ausgangsvolumens mit $CaCl_2$-Lösung aufgenommen. Die Zellen wurden danach für die Dauer von 1 - 24 h bei 4 °C inkubiert (Sambrook *et al.*, 1989). Im Anschluss daran wurden die á 100 µl aliquotierten Zellen mit 15 % Glycerin bei –80 °C eingefroren oder direkt transformiert. Zur Transformation wurden 100 µl kompetente Zellen pro Ansatz eingesetzt. Maximal 5 µl Plasmid-DNA wurde zu den kompetenten Zellen pipettiert, umgerührt und 10 – 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 45 s Dauer bei 42 °C im Wasserbad wurden die Zellen erneut

10 - 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 0,5 ml TYGPN-Medium zugegeben und die Zellen 1 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die transformierten Bakterien wurden mit dem entsprechenden Antibiotikum auf LB-Agarplatten ausgestrichen (250 µl pro Ansatz und Platte) und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.1.2 PCR und Klonierung von SH3GL3 und SH3GL3ΔSH3

Die Primer für die PCR der in den pET100/D-TOPO-Vektor klonierten Inserts werden in Tabelle 5 mit Bezeichnung und Primersequenz aufgeführt.

Tab. 5: Primer für PCR und Sequenzierungen

Primername	***Primersequenz***
CaccSH3GL3 5er Ende	CACCATGTCGGTGGCCGGGCTGAAGAAG
CaccSH3GL3 3er Ende	TTACTGAGGTAAAGGC
SH3domanf reverse primer	TTAGTCTAATGCTGCCTCTATGAACACA
T7 Sequencing Primer	TAATACGACTCACTATAGGG
T7 Reverse Sequencing Primer	TAGTTATTGCTCAGCGGTGG

Für die PCR von SH3GL3 und SH3GL3ΔSH3 wurden je 5 Ansätze nach dem Schema in Tabelle 6 pipettiert.

Tab. 6: Ansätze für PCR

Inhalt	***Volumen[µl]***
Forward-primer	1
Reverse-primer	1
DNTP's	0,5
Pfu-Puffer	5
DdH_20	40,5
Templat	1
Pfu-Polymerase	1

Die PCR wurde nach dem in Tabelle 7 aufgeführten PCR-Programm durchgeführt. Bei einer Deckeltemperatur von 105 °C wurden die Schritte 2 - 5 fünfundzwanzigmal wiederholt.

Tab. 7: PCR-Programm

Schritt	***Temperatur***	***Dauer***
1	96 °C	2 min
2	96 °C	10 s
3	55 °C	10 s
4	72 °C	10 min
5	72 °C	15 min
6	4 °C	Pause

Zur Aufreinigung der PCR-Produkte wurden die Ansätze 1/10 verdünnt in 10x DNA-Probenaufgabepuffer (nach Sambrook *et al.*, 1989) mit in einem 0,7% (w/v) Agarosegel mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid in TBE-Laufpuffer bei 100 - 130 V Spannung aufgetrennt. Unter UV-Licht wurden die PCR-Produkte anhand ihrer Laufhöhe im Vergleich zu einem bekannten Längenstandard identifiziert und deren Banden im Agarosegel ausgeschnitten. Die DNA wurde mit dem Quiaquick Gel-Extraction-Kit (Quiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben aus dem Gel isoliert.

Um die DNA-Sequenz für die N-terminalen 299 Aminosäuren des *h*SK3 und für SH3GL3 in *E. coli* exprimieren zu können, wurden diese in entsprechende Expressionsvektoren kloniert.

Die DNA-Sequenz für die N-terminalen 299 Aminosäuren von *h*SK3 wurde in den Vektor pGEX-6P-1 (Amersham Pharmacia Biotech UK Limited, Little Chalfont, Vereinigtes Königreich) mit den Schnittstellen XhoI und BamHI kloniert und damit C-terminal an Glutathion-S-Transferase (GST) aus *S. japonicum* fusioniert.

Bei der Klonierung von SH3GL3 und SH3GL3ΔSH3 in den Vektor pET100/D-TOPO mittels TOPO-Klonierung wurden deren PCR-Produkte an ein 36 Aminosäuren langes Polypeptid mit einem Xpress-Epitop (Sequenz Asp-Leu-Tyr-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys), einem His-tag mit 6 Histidinen und einer Enterokinase-Erkennungssequenz N-terminal fusioniert. Bei diesem Verfahren wird zur Ligation der DNA-Enden anstelle von Ligase das Enzym Topoisomerase I aus dem *Vaccinia*-Virus verwendet. Die Topoisomerase I bildet mit der Hydroxylgruppe von Tyrosin 274 eine kovalente Bindung mit dem 3'-

Phosphat des DNA-Strangs nach der Sequenz 5'-CCCTT (Shumann *et al.,* 1991). Anschließend kann die Phosphotyrosylbindung zwischen Enzym und DNA von einer Hydroxygruppe eines 5'-Phosphatrestes eines DNA-Stranges angegriffen werden. Der Vektor pET100/D-TOPO (Invitrogen) enthält in seiner „Polylinker"-Region die Sequenz 5'-CCCTT am Matrizenstrang und im Nicht-Matrizenstrang die Sequenz 3'-GGGAAGTGG. An den 3'-Phosphatrest des letzten Thymidins des Matrizenstrangs ist die Topoisomerase I gebunden und kann aus seiner kovalenten Bindung durch ein PCR-Produkt mit der Sequenz 5'-CACC verdrängt werden (Shumann, 1994).

Für die Synthese des PCR-Produkts wurde ein 5'-Primer benutzt, der upstream zum Templat die Sequenz CACC trägt (Primer „CaccSH3GL3 5er Ende"). Das PCR-Produkt enthält folglich vor der Kopie der Ausgangssequenz die Sequenz CAGG. Die Hydroxygruppe des Cytidins greift dann die Phosphotyrosinbindung von Vektor und Topoisomerase I an und bildet eine kovalente Bindung mit dem Vektor aus. Als 3'-Primer wurden die Primer so gewählt, dass die entstehenden PCR-Produkte die Sequenz für SH3GL3 enthielten (Primer „CaccSH3GL3 3er Ende"), beziehungsweise eine Sequenz von SH3GL3 enthielten, deren SH3-Domäne deletiert war (Primer „SH3domanf reverse primer") und die nur für die ersten 285 Aminosäuren kodierte.

Bei der Klonierung von SH3GL3 und SH3GL3ΔSH3 in den Vektor pET100/D-TOPO wurden deren PCR-Produkte an ein 36 Aminosäuren langes Polypeptid mit einem Xpress-Epitop (Sequenz Asp-Leu-Tyr-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys), einem His-tag mit 6 Histidinen und einer Enterokinase-Erkennungssequenz N-terminal fusioniert.

Zur Klonierung wurden 1 µl des isolierten PCR-Produkts mit 1 µl Salt Solution (invitrogen, Carlsbad, USA), 3 µl sterilisiertem H_2O und 1 µl TOPO Vector gemischt, 5 min inkubiert und dann in *E. coli* Stamm TOP 10 F transformiert. Am nächsten Tag wurden 5 Kolonien der transformierten Zellen mit je einer Impföse in 5 ml LB-Medium mit 1 µg/ml Ampicillin inokuliert und die Plasmid-DNA isoliert (Feliciello und Chinali, 1993). Die Sequenz der PCR-Produkte wurde mittels der in Tabelle 4 genannten Primer von der Firma GATC (Konstanz, Deutschland) sequenziert.

2.1.3 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

Sofern nicht anders beschrieben wurde die Konzentration von DNA-Lösungen wie folgt photometrisch bestimmt:

1 µl der zu bestimmenden Lösung wurde mit 99 µl Wasser verdünnt und die Extinktion der verdünnten DNA-Lösung in einem Photometer gegen Wasser bei 260 und 280 nm

Wellenlänge bestimmt. Die Konzentration der Lösung wurde nach folgender Formel errechnet:

$$c[\mu g / ml] = OD * Vf * F$$

Hierbei hat der Verdünnungsfaktor V den Wert V = 100 und der Multiplikationsfaktor F für doppelsträngige DNA den Wert F = 50. Die Reinheit der Proben wurde als ausreichend erachtet, wenn für das Verhältnis der optischen Dichten bei 260 und 280 nm Wellenlänge der Quotient von 1,8 nicht unterschritten wurde.

2.2 SDS-Gelelektrophorese und Westernblot

Die für die SDS-Gelelektrophorese und den Westernblot eingesetzten Lösungen werden in Tabelle 8 kurz aufgeführt.

Tab. 8: Lösungen für SDS-Gelelektrophorese und Westernblot

Lösung	***Zusammensetzung***
Protein-Ladepuffer	50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2 % SDS, 0,1 % Bromphenolblau, 10 % (v/v) Glycerin, 100 mM DTT
Kathodenlaufpuffer	0,1 M Tris, 0,1 M Tricin, 1 % SDS
Anodenlaufpuffer	0,2 M Tris-HCl, pH 8,9, 1,4 % Glycin, 0,1 % SDS; pH 8,3
Gelpuffer	3 M Tris, 1 M HCl, 0,3 % SDS, pH 8,45
Tris/Glycin-Blotpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, 0,1 % SDS, pH 8,3
Ponceau S-Färbelösung 5x	0,2 % (w/v) Ponceau S, 2 % (v/v) Essigsäure, pH ~ 8,3 (nicht einstellen)
TBS-Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,4; 9 g/l NaCl
TBS-Tween20	0,1 % (v/v) Tween20 in TBS-Puffer
Blockpuffer	5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-Puffer
Antikörper-Entfernungspuffer	0,2 M Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, 1 % (v/v) Tween20, pH 2,2

Tabelle 9 zeigt Zusammensetzung der Lösungen für Sammel- und Trenngel. Dies wird durch Tabelle 10 ergänzt, welche die Ansätze für jeweils 100 ml Gelvolumen beschreibt.

Tab. 9: Lösungen für Sammel- und Trenngel

	Sammelgel	***Trenngel***
% T	4	10
% C	3	3
Endgültige [Tris]	0,74 M	1 M
Endgültige [SDS]	0,075 %	0,1 %
Gelpuffer-Volumen	3,1 ml	10 ml
Gelpuffer-Verdünnung	1 / 4,03	1 / 3,0
Endgültiges Volumen	12,5 ml	30 ml
Endgültige [Harnstoff]	-	6 M

Tab. 10: Lösungen für Sammel- und Trenngel für 100 ml Gel-Volumen

	Sammelgel	***Trenngel***
Solution A	12,93 ml	32,3 ml
Solution B	6 ml	15 ml
Tris	8,96 g	12,114 g
SDS 10 %	750 µl	1 ml
Harnstoff	-	36,06 g
pH mit 32 % HCl einstellen auf	8,45	8,45

Die Verdünnung und Zusammenstzung der Lösungen mit den Primär- und Sekundärantikörpern, inklusive der Blockersubstanzen wird kurz in den Tabellen 11 und 12 zusammengefasst.

Tab. 11: Primärantikörper für Westernblot

Epitop	*Verdünnung*	*In*	*%*	*Organismus*	*Hersteller*
Xpress-Epitop	1:5000	BSA	3	Mouse	Fa. Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
GST	1:15000	Magermilchpulver	3	Rabbit	Fa. Sigma, Taufkirchen
SH3GL3	1:1000	Magermilchpulver	3	Rabbit	S. Wälter, MDC Berlin
SK3-N-Terminus	1:200	Magermilchpulver	3	Rabbit	Fa. alomone labs, Jerusalem, Israel

Tab. 12: Sekundärantikörper für Westernblot

Epitop	*Verdünnung*	*in*	*%*	*Organismus*	*Hersteller*
Mouse	1:20 000	Magermilch-pulver	3	Goat	Fa. Sigma-Aldrich, München
Rabbit	1:20 000	Magermilch-pulver	3	Goat	Fa. Sigma-Aldrich, München

Die Verfahren zur Kontrolle der Expression und zur Beurteilung der Pull-Down-Experimente waren SDS-Gelelektrophorese und Westernblot.

Hierzu wurden 4 Polyacrylamid-Gele für die Mini Protean II Gelelektrophoresekammer (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) in 2 Giesstationen gegossen, wobei 100 ml Sammelgel mit 20 µl TEMED und 100 µl APS zur Polymerisation unter Rühren versetzt wurden, diese Lösung dann in die Glaskammern gegossen wurde, wobei die oberen 2/3 der Kammer freigelassen und mit Wasser aufgefüllt wurden, um ein Austrocknen des Gels bei der Polymerisation zu verhindern. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Wasser abgegossen und Wasserreste vorsichtig mit Filterpapier entfernt. 30 ml Sammelgel-Lösung wurden mit 20 µl TEMED und 100 µl APS zur Polymerisation unter Rühren versetzt, die Kammer damit aufgefüllt und ein Kamm eingesetzt. Bis zur Polymerisation wurden die Giesstationen mit feuchten Tüchern abgedeckt und in einer Plastiktüte verpackt. Auf diese Weise waren die PAA-Gele bis zu einer Woche haltbar. Die PAA-Gele wurden in den Glaskammern in die Elektrophorese-Kammer eingehängt, die Ränder abgedichtet (Wasser mit 5 % Agarose nach Erhitzen in der Mikrowelle), die Elektrophorese-Kammer innen mit Kathodenlaufpuffer aufgefüllt und außen mit

Anodenlaufpuffer gefüllt, bis der Unterrand der Glaskammer ca. 5 mm mit Kathodenpuffer bedeckt war. Die Proteinproben wurden im Verhältnis 5:1 mit Protein-Ladepuffer und 1 % β-Mercaptoethanol versetzt, 5 Minuten bei 96° im Wasserbad erhitzt und damit das Gel beladen. Auf einem Ladeplan wurde vermerkt, welche Geltaschen mit welchen Proben beladen wurden. Eine Tasche wurde mit 5 µl Low Range Prestained SDS-PAGE Standard (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) beladen, bei mehreren PAA-Gelen wurden unterschiedliche Taschen damit beladen, um Verwechslungen zu vermeiden. Die Geltaschen wurden mit bis zu 20 µl Lösung der Proteinproben beladen, wobei darauf geachtet wurde, gleiche Proteinmengen zu verwenden.
Nach dem Beladen wurde bei 400 mA Strom für 1 Stunde eine Spannung von 30 V, dann für 2 weitere Stunden eine Spannung von 100 V angelegt.
Nach Ende der SDS-Gelektrophorese wurden die PAA-Gele aus den Glaskammern genommen, kurz in Tris/Glycin-Blotpuffer equilibriert, dann in die Blotkammer luftblasenfrei eingespannt. Dabei wurden auf die schwarze Seite der Klammer in folgender Reihenfolge ein Schwamm, ein Membranfilter, das Polyacrylamid-Gel, eine Nitrocellulosemembran (0,45 µm, Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland), ein weiterer Membranfilter und ein zweiter Schwamm gelegt und anschließend das Blotsandwich zwischen schwarzer und durchsichtiger Seite eingeklemmt.

Als nächstes wurde das Blotsandwich unter Berücksichtigung der Polung in die Halterung geschoben, die Halterung mit einem Rührfisch und einem Kühlaggregat in der Elektrophorese-Kammer eine Stunde bei 100 V Anfangsspannung und 400 mA Strom geblottet. Nach dem Blotten wurde die Nitrocellulosemembran mit Leitungswasser gespült, ca. eine Minute mit Ponceau S-Färbelösung gefärbt und die Ponceau S-Färbelösung mit Leitungswasser entfernt, bis einzelne Proteinspuren sichtbar wurden und deren Startpunkt mit Bleistift markiert, um später auf dem Röntgenfilm erscheinende Banden den Spuren zuordnen zu können.

Im Anschluss wurden die Nitrocellulosemembranen eine Stunde mit TBS-Puffer mit 3 % Magermilch geblockt, mit dem ersten Antikörper in Verdünnung nach Tabelle 11 über Nacht unter Wippen inkubiert, drei mal 20 Minuten mit TBS-Puffer gewaschen, mit dem entsprechenden Sekundärantikörper, nach Tabelle 12 verdünnt, inkubiert, erneut drei mal über 20 Minuten mit TBS-Puffer gewaschen. Die Nitrocellulosemembranen wurden mit einer 1:1 Lösung aus SuperSignal West Stable Peroxide Solution und SuperSignal West Pico Luminol/Enhancer Solution (beides Perbio Science, Bonn, Deutschland) benetzt, dann diese Lösung vorsichtig wieder abgenommen, die Nitrocellulosemembran in eine

Röntgenfilmkassette gelegt und mit Frischhaltefolie bedeckt. Unter Rotlicht wurde ein Röntgenfilm (Hyperfilm, Amersham Pharmacia Biotech UK Limited, Little Chalfont, England) auf die Nitrocellulosemembran gelegt, die Ränder markiert und 15 s bis eine Minute belichtet und anschließend in einer Entwicklermaschine entwickelt.

2.3 Expression und Expressionskontrolle

Für die Expression wurden zwei verschiedene *E. coli*-Stämme benutzt. Der Stamm BL21 wurde für die Expression von GST und des GST-getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 eingesetzt. Für die Expression von SH3GL3 und SH3GL3ΔSH3 wurde der Stamm BL21 DE3 verwendet, da sich SH3GL3 nicht in BL21 exprimieren lies. Der Stamm BL21 DE3 (siehe Tabelle 13) enthält im Gen *rne131*, das für die Rnase E kodiert, eine Mutation, welche die Degradation von mRNA verhindert. Dies und die Eigenschaft des Vektors pET100/D-TOPO, dass die durch die T7-Polymerase induzierten Expression in Abwesenheit eines Induktors weiter verringert ist, ermöglichten die Expression von SH3GL3 und SH3GL3ΔSH3. Trotz der Zuhilfenahme eines pET100/D-TOPO Vektors und eines anderen Bakterienstammes war die Zelldichte der induzierten Kulturen nach 3 Stunden Induktion deutlich geringer als von parallel eingesetzten Kulturen von BL21 mit GST und der GST-getaggten 299 N-terminalen Aminosäuren des *h*SK3.

Tab. 13: Bakterienstämme für die Proteinexpression

Bezeichnung	***Genotyp***	***Zitat***
BL21	B F- *ompT hsdS*(r_{B-} m_B) *dcm*+ Tet_r *gal endA* Hte	Weiner *et al.*, 1994
BL21 DE3	F- ompT hsdS$_B$ (r_B-m_B-) gal dcm rne131 (DE3)	Kido *et al.*, 1996

Zur Lyse von Bakterienkulturen wurden diese mit 5000 g 5 Minuten lang zentrifugiert, der Überstand dekantiert, die Pellets mit 1 ml TBS-Puffer je 5 ml Bakterienkultur unter Zuhilfenahme eines Vortex resuspendiert und erneut, wie oben zentrifugiert. Das Pellet wurde nach Dekantieren des Überstands mit 200 µl eiskaltem TBS je 5 ml Bakterienkultur unter zu Hilfenahme eines Vortex resuspendiert, mit Protease-Inhibitor versetzt und mit genauso viel ProFound Lyse-Puffer wie TBS gemischt. Die Proben wurden mehrmals invertiert, 30 Minuten auf Eis gelagert und alle 10 Minuten erneut mehrmals invertiert. Dann wurden die lysierten Proben 5 Minuten mit 12000 g zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde in neue Eppendorf-Röhrchen pipettiert, und die Proteinkonzentration

bestimmt. Alle Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Als Protease-Inhibitor wurde der Protease Inhibitor Cocktail Produktnummer P 8849 (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) den Herstellerangaben entsprechend verdünnt verwendet.

Um die induzierten Bakterienkulturen auf die Expression zu testen, wurde wie folgt vorgegangen:

SH3GL3 und SH3GL3ΔSH3 wurden im *E.coli*-Stamm BL21 DE3, der N-terminale Abschnitt des *h*SK3 im *E.coli*-Stamm BL21 mittels *lac*-Operon exprimiert. SH3GL3 und SH3GL3ΔSH3 waren dazu C-terminal an ein 36 Aminosäuren langes Polypeptid mit einer aus sechs Histidinen bestehenden Polyhistidinregion und einem Xpress-Epitop fusioniert. Der *h*SK3-N-Terminus war C-terminal an GST fusioniert.

Zur Expression wurde je eine Kolonie *E. coli* mit den Plasmiden für SH3GL3, SH3GL3ΔSH3, GST und den GST-getaggten N-terminalen *h*SK3-Abschnitt mit je einer Impföse gepickt und in 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin inokuliert, über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Zur Kontrolle diente eine Kolonie eines Leerstammes, die in 5 ml LB-Medium ohne Antibiotikum inokuliert wurde. Die optische Dichte aller Bakterienlösungen wurde am nächsten Morgen mittels eines Photometers bei einer Wellenlänge von λ = 600 nm bestimmt. LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin (ohne Antibiotikum für die Kontrolle) wurde zu einem Endvolumen von 25 ml mit der über Nacht inkubierten Bakteriensuspension so versetzt, dass es eine optische Dichte von 0,1 hatte. Davon wurde 0,5 ml in ein Eppendorf-Röhrchen überführt und auf Eis gelagert. Die Suspensionen wurden bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer optischen Dichte von 0,5 bis 0,8 gezogen und, nach Lagerung von 0,5 ml der Suspension auf Eis und anschließender Lyse, wurden 0,1 mM IPTG zu der verbleibenden Suspension pipettiert und diese bei 37 °C weiter unter Schütteln inkubiert. Nach 30 Minuten, einer, zwei und drei Stunden, sowie über Nacht wurden jeweils 0,5 ml der Suspension abgenommen, sofort auf Eis gelagert und lysiert.

Im Anschluss daran wurden eine SDS-Gelelektrophorese und ein Westernblot mit den Proben durchgeführt.

2.4 Proteinkonzentrationsbestimmung

Um gleiche Proteinmengen in der SDS-Gelelektrophorese oder in den Pull-Down-Assays einzusetzen, wurde die Proteinkonzentration der Proteinproben vor den jeweiligen Versuchen bestimmt. Für die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde das BCA Protein Assay Kit von Pierce (Rockford, Illinois, USA) benutzt.

Das Prinzip der Proteinkonzentrationsbestimmung besteht darin, dass Proteine mit Cu^{2+} in alkalischer Lösung einen Komplex bilden (Biuret-Reaktion). Cu^{2+} in diesem Komplex werden wird zu Cu^{+} reduziert, das mit zwei Molekülen Bicinchinon-Säure (BCA) einen violetten Farbkomplex bilden.

Die Konzentrationen der Proteinproben wurden in mehreren Verdünnungen anhand einer Eichgeraden bestimmt, die mithilfe einer Verdünnungsreihe einer BSA-Lösung mit bekannter Konzentration erstellt wurde.

200 µl einer Arbeitslösung aus BCA Reagent A und Reagent B in einer Verdünnung von 1:50 wurde zu je 25 µl Proteinlösung in den Öffnungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, die Platte mit Parafilm verschlossen und bei 37 °C 30 Minuten im Brutschrank inkubiert, 8 Minuten bei Raumtemperatur gekühlt und anschließend die Absorption dreifach in einem ELISA-Reader („SLT Spectra“, SLT Labinstruments Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland) bei 592 nm gegen Wasser gemessen.

2.5 Pull-Down-Assay

Um die Interaktion des N-terminalen *h*SK3-Abschnittes mit SH3GL3 nachzuweisen, wurden Bestandteile des ProFound GST Protein:Protein Pull-Down Interaction Kit und des ProFound Pull-Down PolyHisProtein:Protein Interaction Kit (beide Fa. Pierce, Rockford, Illinois, USA) benutzt.

Für Pull-Down-Assays mit beiden Kits wurde der GST-getaggte N-terminale *h*SK3-Abschnitt, SH3GL3 und SH3GL3ΔSH3, sowie als Kontrollen GST, nichttransformierte BL21- und BL21 (DE3)- Zellen mit IPTG induziert und 3 h nach Induktion die Zellen lysiert. Die Lagerung der Lysate sowie alle weiteren Schritte wurden bei 4°C oder auf Eis vorgenommen. Die Proteinkonzentration der Lysate wurde mittels BCA Protein Assay Kit der Fa. Pierce (Rockford, Illinois, USA) bestimmt.

2.5.1 PolyHis-Pull-Down-Assay

2.5.1.1 Vorbereiten und Waschen der Säulen

Für jeden Pull-Down-Assay wurden 3 Handee Spin Cup Säulen mit 50 µl mit dem Vortex geschüttelten Immobilized Cobalt Chelate Gel beladen. 24 ml eines Waschpuffers, bestehend aus einer 1:1 TBS:ProFound Lysis Buffer-Lösung mit 240 µl einer 4 M Imidazollösung, also mit einer Endkonzentration von 40 mM, wurde vorbereitet. Für jede Säule wurden also 8 ml Waschlösung bereitgestellt. Zum Waschen der Säulen wurden 400 µl des Waschpuffers auf die Säule pipettiert, diese mit dem Vortex geschüttelt, und 1 Minute mit 1250 x g zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen. Dieser Waschschritt wurde viermal wiederholt.

2.5.1.2 Beladen der Säulen mit dem „Bait/Köder“

Nach dem Beschriften der Säulen mit „PD“ für den, Pull-Down Assay, „IBC“ für die Kontrolle Immobilized-bait-Kontrolle und „NTC“ für die Non-treated-gel-Kontrolle, wurden die Säulen „PD“ und „IBC“ mit dem gleichen Volumen, aber mindestens 300 µl, des SH3GL3-Lysats beladen, und 30 Minuten inkubiert. Dazu wurden die Säulen so auf einer langsam rotierenden Scheibe fixiert, dass eine gute Durchmischung gewährleistet war. Anschließend wurden die Säulen erneut 8 mal wie im Abschnitt „Vorbereiten und Waschen der Säulen“ gewaschen. Die Waschfraktionen 1 und 8 wurden gesammelt und als „WA1“ bzw. „WA8“ und der entsprechenden Säule bezeichnet und gesammelt.

2.5.1.3 Interaktion von „bait/Köder“ und „prey/Räuber“

Bis zu 800 µl des Lysats von den, den N-terminalen *h*SK3-Abschnitt exprimierenden, *E.coli*-Zellen wurden auf die Säulen „PD“ und „NTC“ pipettiert. Ein Volumen des GST-Lysates, dessen Proteinmenge der auf einer der Säulen „PD“ oder „NTC“ eingesetzten Menge an Lysat des, den N-terminalen *h*SK3-Abschnitt exprimierenden, *E.coli*-Lysats entsprach, wurde auf die Säule „IBC“ pipettiert. Als nächstes wurden die Säulen 60 Minuten wie oben inkubiert und im Anschluss daran die Säulen 5 mal wie oben gewaschen, wobei die erste und letzte Waschfraktion gesammelt und mit „WB1“ bzw. „WB5“ und der entsprechenden Säule bezeichnet wurden.

2.5.1.4 Elution

Für die Elution wurden 937 µl Waschpuffer 63 µl der 4 M Imidazol-Stocklösung gemischt, um 1 ml Elutionspuffer zu erhalten. Auf jede Säule wurden 250 µl Elutionspuffer pipettiert, diese dann 5 Minuten wie oben inkubiert, um anschließend 1 Minute mit 1250 x g zentrifugiert zu werden. Das Eluat wurde gesammelt.

2.5.2 GST-Pull-Down-Assay

2.5.2.1 Vorbereiten und Waschen der Säulen

Für jeden Pull-Down Assay wurden 3 Handee Spin Cup Säulen mit 50 µl mit dem Vortex geschüttelten Immobilized Glutathione Gel beladen. 24 ml eines Waschpuffers, bestehend aus einer 1:1 TBS:ProFound Lysis Buffer-Lösung wurde vorbereitet. Für jede Säule wurden also 8 ml Waschlösung bereitgestellt. Zum Waschen der Säulen wurden 400 µl des Waschpuffers auf die Säule pipettiert, diese mit dem Vortex geschüttelt, und 1 Minute mit 1250 x g zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen. Dieser Waschschritt wurde viermal wiederholt.

2.5.2.2 Beladen der Säulen mit dem „bait/Köder“

Nach dem Beschriften der Säulen mit „PD“ für den, Pull-Down Assay, „IBC“ für die Kontrolle Immobilized-bait-Kontrolle und „NTC“ für Non-treated-gel-Kontrolle, wurden die Säule „PD“ mit 300 µl des Lysats der, den N-terminalen *h*SK3-Abschnitt exprimierenden *E.coli*-Zellen, beladen. Die Säule „IBC“ wurde mit einem Volumen BL21-Lysat, dessen Proteinkonzentration dem des aufgetragenen des Lysats der, den N-terminalen *h*SK3-Abschnitt exprimierenden *E.coli*-Zellen, entsprach beladen., Die Säule „NTC“ wurde mit einem äquivalenten Volumen GST-Lysat beladen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die aufgetragenen Proteinmengen gleich groß waren.

2.5.2.3 Interaktion von „Bait/Köder“ und „Prey/Beute“

Bis zu 800 µl des Lysats der, den N-terminalen *h*SK3-Abschnitt exprimierenden *e.coli*-Zellen, wurde auf die Säulen „PD“ und „NTC“ gegeben. Das Volumen des GST-Lysates, mit einer gleich großen Proteinmenge wurde auf die Säule „IBC“ pipettiert. Da GST stärker exprimiert wird als Fusionsproteine von GST, muss, um gleiche Proteinmengen im Experiment einzusetzen zu können, die Proteinkonzentrationen der Lysate bestimmt werden, um im Experiment vergleichbare Bedingungen zu untersuchen.
Als nächstes wurden die Säulen 60 Minuten wie oben inkubiert und im Anschluss daran die Säulen 5 mal wie oben gewaschen, wobei die erste und letzte Waschfraktion gesammelt und mit „WB1“ bzw. „WB5“ und der entsprechenden Säule bezeichnet wurden.

2.5.2.4 Elution

Für die Elution wurde 1 ml Elutionspuffer frisch angesetzt. Dazu wurden 31 mg Glutathion in 1 ml Waschpuffer gelöst, um 1 ml 100 mM Lösung zu erhalten. Auf jede Säule wurden 250 µl Elutionspuffer pipettiert, diese dann 5 Minuten wie oben inkubiert, um anschließend 1 Minute mit 1250 x g zentrifugiert zu werden. Das Eluat wurde gesammelt.

Im Anschluss an den Pull-Down Assay wurden die Proteinproben in der SDS-Gelelektrophorese und im Westernblot analysiert.

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung von SH3GL3 und SH3GL3ΔSH3

Das Endophilin SH3GL3 wurde von Frau Dr. Heike Jäger (Institut für Angewandte Physiologie, Universität Ulm) in den Vektor pET28(a) der Firma invitrogen (Carlsbad, Kalifornien, USA) kloniert. Um über die Konstrukte SH3GL3 und SH3GL3ΔSH3, die sich lediglich in der Deletion der SH3-Domäne, aber nicht in Eigenschaften wie Transfektionsrate, Expressionsstärke, Tags etc. unterscheiden sollten zu verfügen, wurden beide Inserts in den Vektor pET100/D-TOPO (Fa. invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) umkloniert. Die Klonierung in diesen Vektor wurde mittels der TOPO-Methode vorgenommen, wobei eine PCR auf eine Ausgangs-DNA gemacht wird, und das PCR-Produkt am 5'OH-Ende von der Topoisomerase I aus dem *Vaccinia*-Virus mit dem DNA-Strang kovalent mit dem 3'-Phosphatidylrest des Vektors konjugiert wird. Dabei können durch die Wahl geeigneter Primer verschiedene PCR-Produkte bei ein und demselben Templat erstellt werden. Da das Plasmid am einen Ende über einen Überhang mit der Sequenz GGTG verfügt, kann das PCR-Produkt, bei Auswahl eines Primers mit der Anfangssequenz CACC, leichter in der gewünschten Orientierung in den Vektor kloniert werden. Nach der Klonierung von SH3GL3 und SH3GL3ΔSH3 in den Vektor pET100/D-TOPO wurden je 5 Klone gepickt, deren Plasmid-DNA isoliert (Feliciello und Chinali, 1993) und mittels Restriktionsverdau die Orientierung festgestellt. Die Sequenz der Inserts von Plasmiden mit der richtigen Orientierung wurde von der Firma GATC (Konstanz, Deutschland) sequenziert. Für die weitere Arbeit wurden je ein Klon von SH3GL3 und SH3GL3ΔSH3 in PET100/D-TOPO ausgewählt. Die Sequenzanalyse ergab zwar in beiden Fällen die Punktmutation C423T im Vergleich zur Sequenz mit der Accessionnummer X99664. Der Austausch von Thymidin gegen Cytidin in dieser Position bleibt jedoch stumm, da er in der dritten Position stattfindet und sowohl das Triplet GAC wie auch das Triplet GAT (GAU) für die Aminosäure Aspartat kodieren.

Die Genprodukte der Fusionsprodukte waren C-terminal an ein 36 Aminosäuren langes Polypeptid mit einem Xpress-Epitop, einem aus sechs Histidinen bestehenden His-tag und einer Schnittstelle für das Enzym Enterokinase fusioniert. Das Xpress-Epitop dient als Bindungsstelle für den Xpress-Antikörper und das His-tag zur Aufreinigung von SH3GL3 und SH3GL3ΔSH3 mittels Affinitätschromatographie. Die Schnittstelle für die Enterokinase kann zur nachfolgenden Entfernung des His-tags benutzt werden.

C-terminal an das Polypeptid schließt sich im Falle des klonierten SH3GL3 eine 347 Aminosäuren lange Aminosäurensequenz, im Falle des klonierten SH3GL3ΔSH3 ein um die SH3-Domäne verkürztes Protein mit einer Länge von 285 Aminosäuren an.

3.2 Expressionskontrolle

3.2.1 Expression und Bestimmung der Laufhöhen von SH3GL3 und SH3GL3ΔSH3

Zunächst einmal wurde untersucht, ob sich SH3GL3 und SH3GL3ΔSH3 in *E.coli* exprimieren lassen. Damit sollte ebenfalls das apparente Molekulargewichtr, die Laufhöhe im Schägger & Jagow-Gel (Schägger und von Jagow, 1989) bestimmt werden.

Dazu wurden SH3GL3 und SH3GL3ΔSH3 im *E.coli*-Stamm BL21 DE3 mittels *lac*-Operon exprimiert. Zur Expression wurde je eine Kolonie *E. coli* BL21 DE3 mit den Plasmiden für SH3GL3 bzw. SH3GL3ΔSH3, und je eine Kolonie *E. coli* BL21 mit GST bzw. der, den N-terminalen *h*SK3-Abschnitt exprimierenden *E.coli*, mit einer Impföse gepickt, in 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin inokuliert und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Zur Kontrolle diente eine Kolonie eines Leerstammes von BL21 DE3, die in 5 ml LB-Medium ohne Antibiotikum inokuliert wurde. Die optische Dichte aller Bakterienlösungen wurde am nächsten Morgen mittels eines Photometers bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600$ nm bestimmt. LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin (ohne Antibiotikum für die Kontrolle) wurde zu einem Endvolumen von 25 ml mit der über Nacht inkubierten Bakteriensuspension so versetzt, dass das Medium eine optische Dichte von 0,1 aufwies. Davon wurde 0,5 ml in ein Eppendorf-Röhrchen überführt und auf Eis gelagert. Die Suspensionen wurden bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von 0,5 bis 0,8 gezogen, es wurde IPTG zu einer Endkonzentration von 0,1 mmol zugegeben, und 0,5 ml der Suspension in einem Eppendorfröhrchen auf Eis gelagert. Nach drei Stunden wurden je 0,5 ml der Suspension abgenommen. Alle 0,5-ml-Proben wurden sofort auf Eis gelagert und lysiert. Im Anschluss daran wurde, wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben, eine SDS-Gelelektrophorese und ein Westernblot mit den Proben durchgeführt.

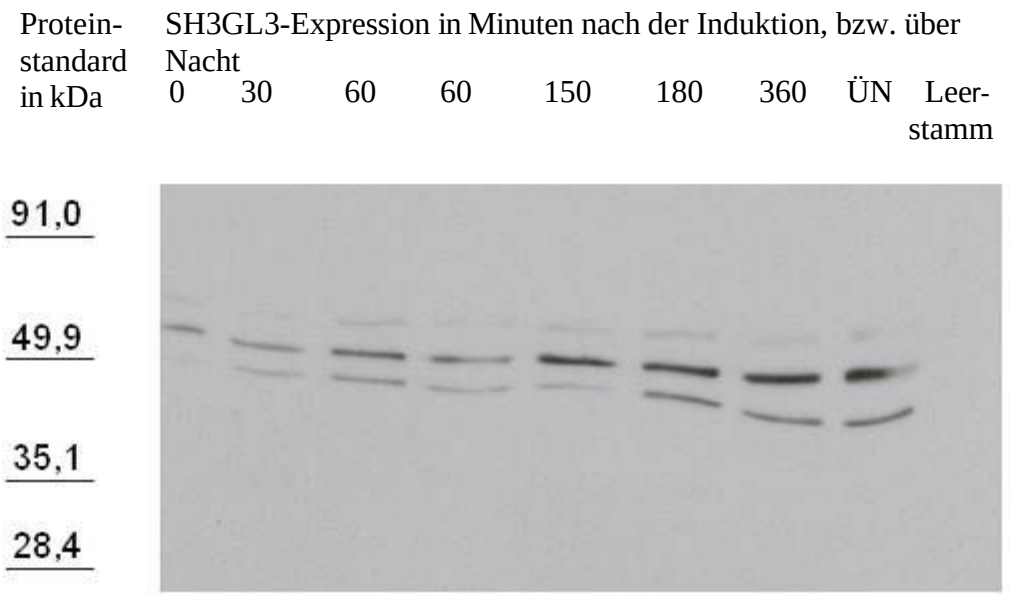

Abb. 9: Induktionsreihe von SH3GL3

Die Expression von SH3GL3 wurde mit 0,1 M IPTG induziert. 0,5 ml der Kultur wurden nach 0, 30, 60, 150, 180 und 360 Minuten bzw. nach Inkubation über Nacht, abgenommen, lysiert und im SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und ein Westernblot mit anti-SH3GL3 und anti-rabbit durchgeführt (siehe Kapitel Material und Methoden). Neben dem Lysat der Übernacht-Kultur wurde das Lysat einer nicht transfizierten E.coli BL21 DE3-Kultur eingesetzt. Die 60 Minutenprobe wurde zweimal aufgetragen.

In Abbildung 9 zeigt sich bereits zum Zeitpunkt null knapp über 49,9 kDa eine Bande im Westernblot mit anti-SH3GL3 als Primärantikörper. Des weiteren erkennt man, dass die Proben nicht gleichmäßig aufgetrennt wurden, da der Verlauf der äquivalenten Banden der zu einem späteren Zeitpunkt lysierten Proben nach unten neigt. Betrachtet man die Trennschärfe des Gels von links nach rechts, kann man daran, dass die Abstände zwischen den obersten und untersten Banden in den Laufspuren von links nach rechts zunehmen, erkennen, dass die Auftrennung der Proteine im Gel inhomogen ist. Hier kann man davon ausgehen, dass bei einer Inhomogenität des elektrischen Feldes oder des Gels, die Proben rechts im Gel schneller getrennt wurden als links. Eine Bestimmung der apparenten Laufhöhe ist daher am besten im Vergleich zweier direkt nebeneinandergelegenen Banden möglich, wenn das Molekulargewicht einer der Banden bekannt ist. Dies ist im Fall der Probe zum Zeitpunkt null möglich. Im weiteren sieht man eine Zunahme der Dicke der mittleren Bande, je später die Zellen nach Induktion lysiert wurden, wobei nach 180 Minuten kaum noch eine relevante Dickenzunahme zu sehen ist. Deshalb wurden alle

weiteren Experimente mit Lysaten durchgeführt, die 180 Minuten nach Induktion der Proteinexpression hergestellt wurden.

Somit lässt sich aus dem oben Gesagten und Abbildung 9 schließen, dass erstens die Expression des SH3GL3-Konstruktes ohne vorherige Induktion nicht ganz unterdrückt ist, zweitens eine dreistündige Induktion genügt, um eine ausreichende Expression zu erreichen und drittens die Laufhöhe von SH3GL3 im hier eingesetzten Gel knapp über 49,9 kDa liegt.
Zur Validierung der Ergebnisse wurde im Westernblots für die Abbildung 15 eine Geltasche mit Lysat einer Dreistundeninduktion aufgetragen, welche das bisherige Ergebnis bestätigt.
Dass im Westernblot des SH3GL3 mit anti-SH3GL3 drei Banden ersichtlich waren, bereitete zunächst Schwierigkeiten bei der Bestimmung der Laufhöhe des SH3GL3 und der Bestimmung, welche Bande SH3GL3 darstellt. Da nach Aufreinigung des SH3GL3-Lysats im Immobilized Cobalt Chelate Gel lediglich eine Bande, in oben bereits bezeichneter Höhe, knapp über 49 kDA, nachweisbar ist, bereitete dies in den weiteren Experimenten keine Schwierigkeiten mehr.
Die Bestimmung von Expression und apparentem Molekulargewicht des SH3GL3ΔSH3 wurde in verkürzter Form durchgeführt. Hier wurde auf die Induktionsreihe verzichtet und das Lysat einer Dreistundeninduktion des SH3GL3ΔSH3 mit Lysat nicht transfizierter *E.coli* BL21 DE3 im Westernblot verglichen.
So ist in Abbildung 10 in der linken Spur das Lysat von *E.coli* BL21 DE3 drei Stunden nach Induktion der Expression von SH3GL3ΔSH3 aufgetragen. Rechts davon wurde das Lysat nicht transfizierter *E.coli* BL21 DE3 drei Stunden nach Zugabe des Induktors IPTG aufgetragen. Für den Westernblot wurde anti-SH3GL3 als Primärantikörper verwendet.

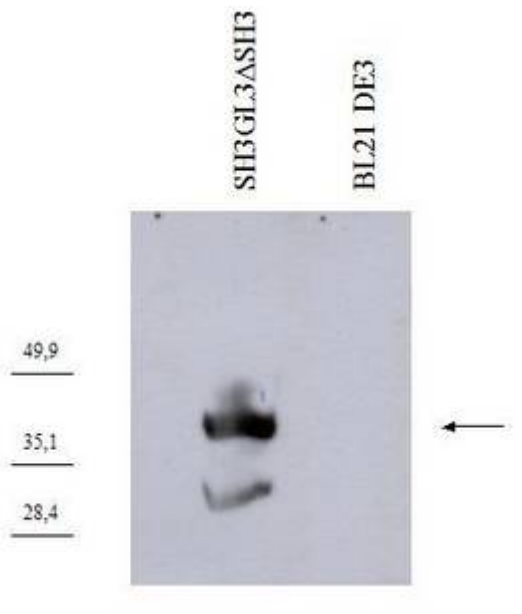

Abb. 10: Dreistunden-Induktion von SH3GL3ΔSH3 (anti-SH3GL3).

Die Expression von SH3GL3ΔSH3 wurde mit 0,1 M IPTG induziert. 0,5 ml der Kultur wurden nach 180 Minuten abgenommen, lysiert und im SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und ein Westernblot mit anti-SH3GL3 und anti-rabbit durchgeführt (siehe Kapitel Material und Methoden). Links wurde Lysat von SH3GL3ΔSH3 aufgetragen, rechts Lysat des nicht transfizierten BL21 DE3 Kultur.

In Abbildung 10 ist in der rechten Spur keine Bande zu sehen. Es findet also keine Reaktion zwischen Lysat nicht transfizierter BL21 DE3-Zellen und dem eingesetzten Antikörper gegen SH3GL3 statt. Links davon hingegen ist in der Spur des SH3GL3ΔSH3 eine deutliche Bande zwischen 35,1 und 49,9 kDa zu sehen. Aus Abbildung 9 und Abbildung 10 ist also zu entnehmen, dass der Antikörper anti-SH3GL3 nicht mit Lysat nicht transfizierter BL21 DE3 Zellen reagiert, aber Banden knapp über 49,9 kDa im Falle der Dreistunden-Induktion des SH3GL3 und zwischen 35,1 und 49,9 kDa im Falle der Dreistunden-Induktion des SH3GL3ΔSH3 sichtbar macht.

Das im Westernblot von SH3GL3 mit anti-SH3GL3 mehrere Banden sichtbar wurden, bereitete zunächst Schwierigkeiten bei der Bestimmung der Laufhöhen. Da nach Aufreinigung des SH3GL3-Lysats im Immobilized Cobalt Chelate Gel lediglich eine Bande, in oben bereits bezeichneter Höhe, knapp über 49 kDA, nachweisbar ist (siehe Abb. 16 und Abb. 19), bereitete dies in den weiteren Experimenten keine Schwierigkeiten mehr. Auch beim Nachweis von SH3GL3 in Gehirn-Extrakten von weiblichen Wistar-Ratten mittels Antikörpern gegen SH3GL3 traten mehrere Banden auf (Sugiura *et al.*, 2004), die nach Aufreinigung auf eine Bande reduziert waren.

3.2.2 Expression und Bestimmung der Laufhöhen von GST und des GST-getaggten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3

Der GST-getaggte N-terminale Abschnitt des *h*SK3 wurde im *E.coli*-Stamm BL21 mittels *lac*-Operon exprimiert. Um zu testen, wie groß das apparente Molekulargewicht, die Expression des N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 bzw. GST ist und ob der anti-GST-Antikörper geeignet ist, den N-terminalen Abschnitt des N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 und GST im Westernblot zu bestimmen, wurde eine SDS-Gelelektrophorese der Dreistunden-Induktionen des N-terminalen Abschnitts des *h*SK3, BL21 und GST, sowie anschließend ein Westernblot mit anti-GST als Primärantikörper durchgeführt. Abbildung 11 zeigt den Westernblot der Lysate des N-terminalen Abschnitts des *h*SK3, von nicht transformierten BL21-Zellen und von GST, jeweils 3 Stunden nach Induktion mit IPTG. In der Spur der nichttransfizierten BL21-Zellen findet sich keine Bande, wohingegen eine deutliche Bande in der rechten Spur mit GST-Lysat auf einer Höhe knapp unter 31 kDa zu sehen ist. In der linken Spur mit Lysat des N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 ist eine deutliche Reaktion des Antikörpers zu sehen, wobei keine einzelne Bande auszumachen ist.

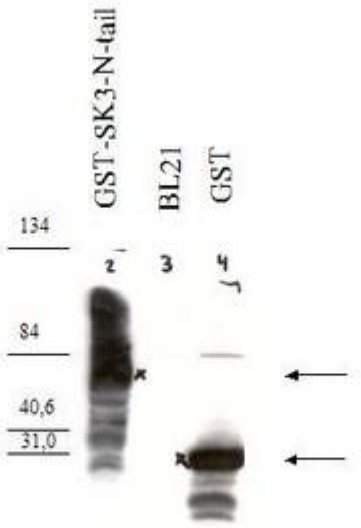

Abb. 11: Dreistunden-Induktion des GST-getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3, BL21, GST (anti-GST).

Die Expression des N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 und GST wurde mit 0,1 M IPTG induziert. Parallel wurden nicht transfizierte *E.coli* mit 0,1 M IPTG inkubiert. 0,5 ml der Kulturen wurden nach 180 Minuten abgenommen, lysiert und im SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde ein Westernblot mit anti-SH3GL3 und anti-rabbit durchgeführt (siehe Kapitel Material und Methoden).

Das apparente Molekulargewicht von GST wurde somit mit knapp unter 31 kDa bestimmt, während die Bestimmung des apparenten Molekulargewichts des GST-getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 unbefriedigend war. Deshalb wurde ein weiteres Experiment zur Bestimmung des apparenten Molekulargewichts durchgeführt.

Zur genauen Bestimmung der apparenten Laufhöhe des GST getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 wurde folgendes Experiment durchgeführt: Die Expression wurde in *E.coli* BL21 induziert, die Zellen nach 3 h lysiert und das Lysat nach Zugabe von Proteinaseinhibitoren auf Eis gelagert. 50 µl Immobilized Glutathione Gel wurden in ein 1,5-ml-Eppendorfröhrchen gegeben und wie im GST-Pull-Down-Assay fünfmal gewaschen. Anschließend wurde das Lysat des N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 in das Eppendorfröhrchen pipettiert und 30 Minuten bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Immobilized Glutathione Gel erneut, wie im Protokoll für den GST-Pull-Down-Assay beschrieben, fünfmal gewaschen. Nach Inkubation mit Elutionspuffer, mit 100 mM Glutathion wie im GST-Pull-Down-Assay, für 5 Minuten wurde die Probe mit 1250 g zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Dieses Eluat wurde zusammen mit dem Lysat des N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 und dem erneut mit Waschpuffer versetztem Immobilized Glutathione Gel für die darauffolgenden SDS-Gelelektrophoresen und Westernblots eingesetzt. Im Westernblot wurde anti-GST als Primärantikörper eingesetzt.

Abbildung 12 zeigt einen solchen Westernblot, dabei ist in der Spur der nichttransfizierten BL21-Zellen keine Bande zu sehen. In den links davon aufgetragenen Spuren sind Lysate des GST-getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3, des GST-getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 nach Elution und das eluierten Immobilized Glutathione Gel nach Aufnahme in Waschpuffer aufgetragen. Hier ist eine Reaktion erkennbar, wobei im Lysat des GSTgetagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 keine einzelne Bande abgrenzbar ist, im Lysat des Eluats mehrere prominente Banden auf einer Höhe von knapp ober- und unterhalb 91 kDA sowie zwischen 91 und 49,9 kDa zu sehen sind. Diese letzte Bande lässt sich in der Spur des aufgetragenen Säulenmaterials nur noch erahnen. Da auf diese Art und Weise also kein besser verwertbares Ergebnis erreicht worden war, wurde ein weiterer Westernblot mit anti-SK3 als Primärantikörper durchgeführt.

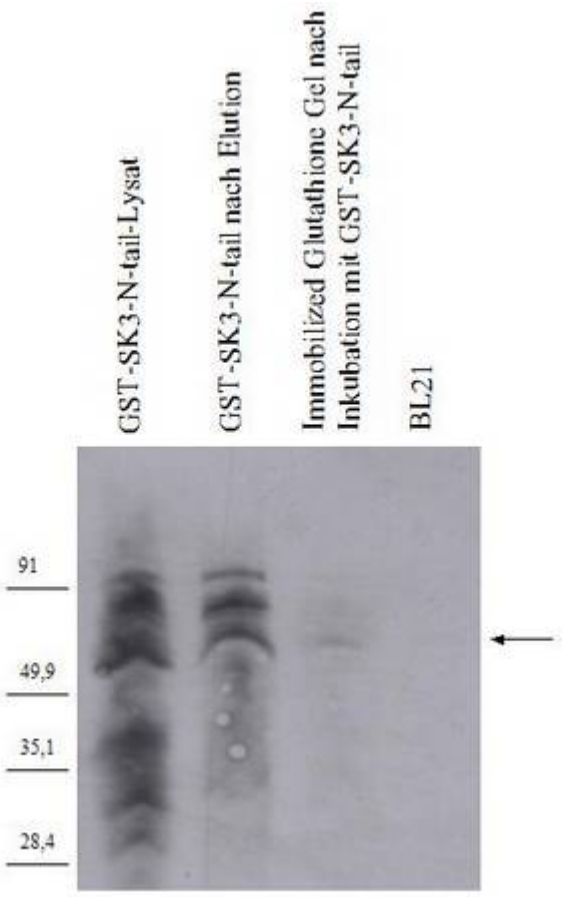

Abb. 12: Bestimmung der Laufhöhe des GST-getagten des N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 (anti-GST)

3 Stunden nach Induktion des GST-getagten des N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 in *E.coli* BL21 wurden die Zellen lysiert. Immobilized Glutathione Gel wurde 1 h mit dem Lysat inkubiert, anschließend gewaschen und, zur Lösung des GST getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 vom Immobilized Glutathione Gel mit Elutionspuffer inkubiert. Aufgetragen sind Lysat des GST-getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3, GST-getagter N-terminaler Abschnitts des *h*SK3 nach Elution, das eluierte Immobilized Glutathione Gel nach Aufnahme in Waschpuffer und das Lysat nicht transfizierter *E.coli* BL21. Westernblot mit anti-GST als Primär- und anti-rabbit als Sekundärantikörper.

In der SDS-Gelelektrophorese für den Westernblot in Abbildung 13 wurden die gleichen Proben wie in Abbildung 12 eingesetzt und das Polyacrylamidgel identisch beladen. Im darauffolgenden Westernblot wurde anti-SK3 als Primärantikörper eingesetzt. Dieser Antikörper zeigt ebenfalls keine Reaktion mit dem Lysat nichttransfizierter Zellen *E.coli* BL21. In den links davon aufgetragenen Spuren sind Lysate des GST-getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3, des GST-getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 nach Elution und des eingesetzten Immobilized Glutathione Gel nach Elution aufgetragen. Dabei ist eine Reaktion erkennbar, wobei im Lysat des GST-getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 mehrere einzelne Banden, im Lysat des Eluats zwei prominente

Bande, eine auf einer Höhe unterhalb 91 kDA sowie einer zwischen dieser ersten Bande und 49,9 kDa zu sehen ist.

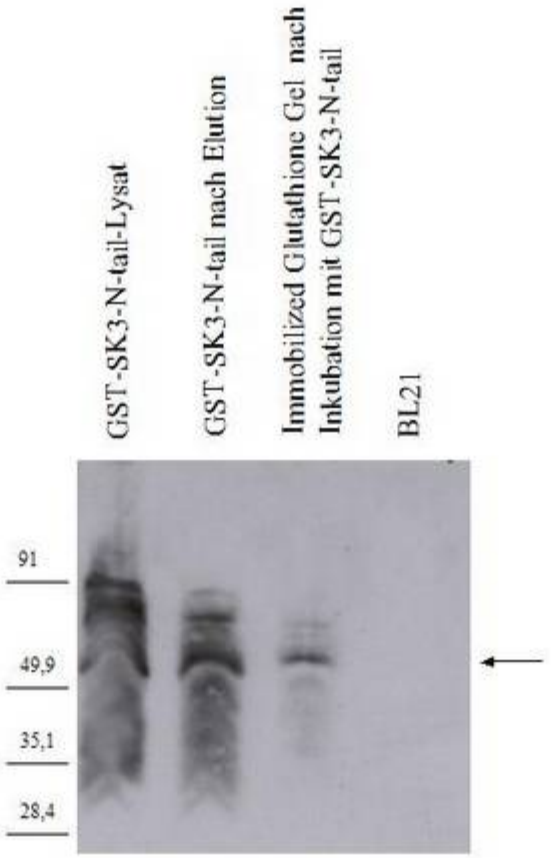

Abb. 13: Bestimmung der Laufhöhe von GST-getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 (anti-SK3)

3 Stunden nach Induktion des GST-getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 in *E.coli* BL21 wurden die Zellen lysiert. Immobilized Glutathione Gel wurde 1 h mit dem Lysat inkubiert, anschließend gewaschen und, zur Lösung des GST-getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 vom Immobilized Glutathione Gel mit Elutionspuffer inkubiert. Aufgetragen sind Lysat des GST-getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3, der GST-getagte N-terminale Abschnitt des *h*SK3 nach Elution, das eluierte Immobilized Glutathione Gel nach Aufnahme in Waschpuffer und das Lysat nicht transfizierter *E.coli* BL21. Westernblot mit anti-SK3 als Primär- und anti-rabbit als Sekundärantikörper.

Diese letzte Bande lässt sich in der Spur des aufgetragenen Säulenmaterials als einzige nachweisen. Die Laufhöhe dieser Bande entspricht der gerade noch sichtbaren Bande des Immobilized Glutathione Gel nach Elution in Abbildung 12. Somit wurde das apparente Molekulargewicht (die Laufhöhe) des GST-getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 mit etwas über 49,9 kDa bestimmt.

3.3 Pull-Down-Assay

In Hefe-Zwei-Hybrid-Experimenten konnte die Interaktion von SH3GL3 mit den N-terminalen 299 Aminosäuren des *h*SK3 indirekt nachgewiesen werden (Spindler, 2003, Spindler *et al.*, 2003, a). Um einen direkten Nachweis der Interaktion der Proteine zu führen, wurde ein PolyHis-Pull-Down wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben durchgeführt. In diesem PolyHis-Pull-Down wurde His-getaggtes SH3GL3 an Immobilized Cobalt Chelate Gel gebunden. Nach Bindung an Immobilized Cobalt Chelate Gel wurde dieses gewaschen und dabei nichtgebundenes Protein entfernt. Im Anschluss an den Waschvorgang wurde das an Immobilized Cobalt Chelate Gel gebundene SH3GL3 mit dem GST-getagten N-terminalen Abschnitt des *h*SK3 inkubiert und ungebundenes Protein durch erneutes Waschen entfernt, wobei in der fünften Waschfraktion der Nachweis des GST-getagten des N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 mittels Westernblot nicht gelang. Im Anschluss an das zweite Waschen wurde das an die Säule gebundene SH3GL3 eluiert und die Proben in SDS-Gelelektrophoresen und Westernblots eingesetzt.

Um die Bindung zwischen dem N-terminalen Abschnitt des *h*SK3und SH3GL3 bzw. SH3GL3ΔSH3 zu untersuchen, wurden als eigentliche Experimente Pull-Down-Assays mit SH3GL3 bzw. SH3GL3ΔSH3, als Köderproteinen und dem GST-getaggten N-terminalen Abschnitt des *h*SK3 als Räuberprotein unternommen. Um sicher zu gehen, dass ein eventueller positiver Nachweis von Räuberprotein spezifisch für die Bindung des Räuberproteins an das Köderprotein ist, wurden mehrere Kontrollexperimente durchgeführt. Bei der Non-treated-gel-Kontrolle (NTC) wurde Lysat von induzierten BL21-DE3-Zellen ohne SH3GL3-Plasmid mit dem Immobilized Cobalt Chelate Gel inkubiert und, wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben, ein Pull-Down-Assay mit GST-getagten N-terminalen Abschnitt des *h*SK3 durchgeführt, um falsch positive Ergebnisse durch unspezifische Bindung des Räuberproteins an das Immobilized Cobalt Chelate Gel zu erkennen. Bei der Immobilized-bait-Kontrolle (IBC) wurde, nach Beladung mit Köderprotein, das Immobilized Cobalt Chelate Gel mit GST als Räuberprotein inkubiert, der Pull-Down-Assay durchgeführt, um ein falsch positives Ergebnis durch Bindung des GST-tags an SH3GL3 zu erkennen. Ein Nachweis des GST-getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 im Eluat der Pull-Down-Assays wurde als Interaktion zwischen Köder- und Räuberprotein gewertet, die bei Vorkommen des GST-getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 im Eluat der NTC-Kontrolle oder Vorkommen von GST im Eluat der IBC-Kontrolle als falsch positiv bewertet werden sollte.

3.3.1 Kontrollexperimente

In den Kontrollexperimenten sollte geklärt werden, ob SH3GL3 an das Immobilized Cobalt Chealte Gel bindet, wie viele Waschschritte zur Entfernung des ungebundenen Proteins notwendig sind und ob eine Elution aus dem Immobilized Cobalt Chealte Gel möglich ist.

Weiterhin wurden zwei Kontrollexperimente durchgeführt, um ein falsch positives Ergebnis des Pulldown Experiments zu erkennen. In der Immobilized–bait-Kontrolle (IBC) wurde untersucht, ob GST an SH3GL3 oder Immobilized Cobalt Chealte Gel bindet. In der Non-treated-Gel-Kontrolle (NTC) wurde untersucht, ob der GST-getagte N-Terminus des *h*SK3 an das Immobilized Cobalt Chealte Gel bindet.

3.3.1.1 Bindung der Köderproteine SH3GL3 an Immobilized Cobalt Chelate Gel und Entfernung ungebundenen Köderproteins

Die Säulen wurden nach Waschen und Vorbereiten, wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben, mit SH3GL3, SH3GL3ΔSH3 oder Lysat nicht transfizierter BL21 DE3-Zellen als Köderproteinen inkubiert und anschließend fünfmal gewaschen. Die erste und fünfte Waschfraktion wurden gesammelt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und in einem Westernblot mit anti-SH3GL3 inkubiert

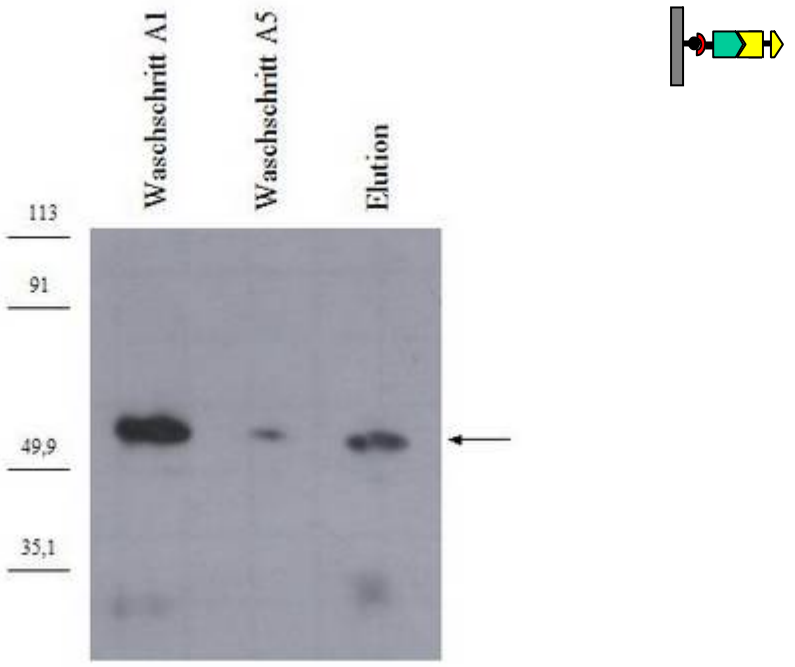

Abb. 14: Waschschritt A1 und A5 des Pull-Down mit SH3GL3 als Köderprotein (anti-SH3GL3)

Immobilized Cobalt Chelate Gel wurde 1 Stunde mit SH3GL3 inkubiert, 5 mal gewaschen und mit dem Lysat des GST getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 für eine Stunde inkubiert. Nach weiteren 5 Waschschritten wurde das SH3GL3 mit Imidazol eluiert. In der linken und der mittleren Spur sind der erste und fünfte Waschschritt, in der rechten Spur ist die Elutionsfraktion aufgetragen. Im ersten Waschschritt zeigt sich eine deutliche Bande, im fünften Waschschritt eine immer noch sichtbare Bande auf Höhe des SH3GL3. In der Elutionsfraktion zeigt sich ebenfalls eine Bande auf Höhe des SH3GL3. anti-SH3GL3 als Primär- und anti-rabbit als Sekundärantikörper.

In Abbildung 14 ist auf Höhe der Bande von SH3GL3 in der Bahn der Elutionsfraktion eine deutliche, in der ersten Waschfraktion eine sehr deutliche Bande und in der fünften Waschfraktion eine immer noch sichtbare Bande zu sehen. Die Bandenhöhe stimmt mit der aus Abbildung 6 entnommenen Laufhöhe des SH3GL3 überein. Daraus lässt sich schließen, dass erstens, His-getaggtes SH3GL3 und SH3GL3ΔSH3 an das Immobilized

Cobalt Chelate Gel binden, zweitens in der ersten Waschfraktion sehr viel Köderprotein vorkam und drittens fünf Waschschritte nicht suffizient waren, um freies Köderprotein vom Immobilized Cobalt Chelate Gel vollständig zu waschen. Deswegen wurde dieses Experiment mit acht Waschschritten vor der Inkubation mit dem GST-getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 wiederholt.

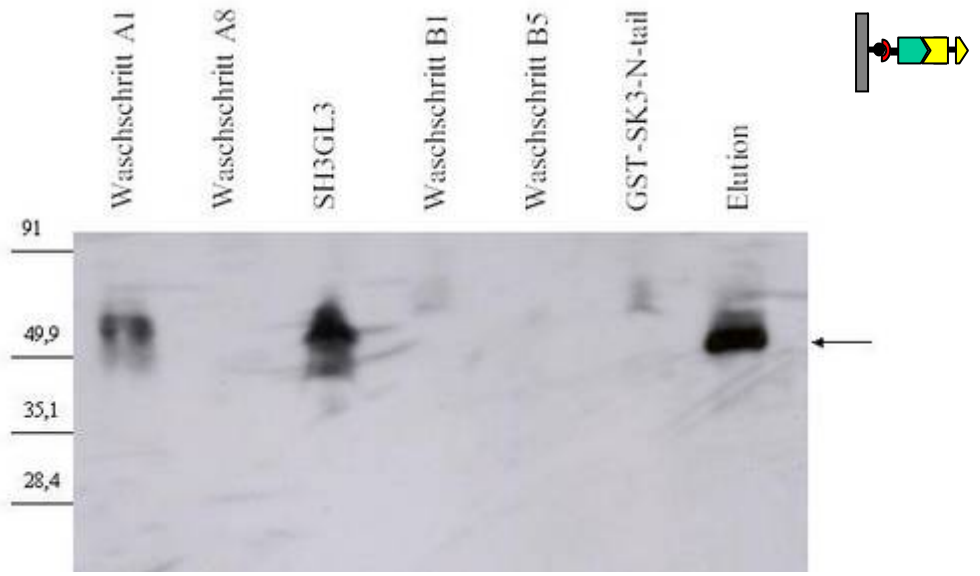

Abb. 15: Waschschritte A1 und A8 des Pull-Down mit SH3GL3 als Köderprotein (anti-SH3GL3)

Immobilized Cobalt Chelate Gel wurde 1 Stunde mit SH3GL3 inkubiert, 8 mal gewaschen und mit GST-getagten des N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 für eine Stunde inkubiert. Nach weiteren 5 Waschschritten wurde das SH3GL3 mit Imidazol eluiert. In der linken und der mittleren Spur sind der erste (WA1) und achte (WA8) Waschschritt, in der rechten Spur ist die Elutionsfraktion aufgetragen. Im ersten Waschschritt zeigt sich eine deutliche Bande auf Höhe des SH3GL3. In der Elutionsfraktion zeigt sich ebenfalls eine Bande auf Höhe des SH3GL3. Anti-SH3GL3 als Primär- und anti-rabbit als Sekundärantikörper.

In Abbildung 15 ist auf Höhe der Bande von SH3GL3 in der Elution in der Spur des Immobilized Cobalt Chelate Gels eine deutliche Bande zu sehen, ebenso in der ersten Waschfraktion (Waschschritt A1) vor Inkubation mit dem GST-getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3. In der achten Waschfraktion (Waschschritt A8) ist keine Bande mehr zu sehen. Daraus lässt sich schließen, dass erstens, His-getaggtes SH3GL3 und SH3GL3ΔSH3 an das Immobilized Cobalt Chelate Gel binden, zweitens, in der ersten Waschfraktion sehr viel Köderprotein vorkam und drittens, in diesem Fall acht Waschschritte suffizient waren, um freies Köderprotein vom Immobilized Cobalt Chelate Gel zu waschen.

Aus diesem Grund wurden alle weiteren Pull-Down-Experimente mit acht Waschschritten vor Inkubation mit dem „Räuberprotein“ durchgeführt. Weiterhin kann aus der Abbildung

geschlossen werden, dass SH3GL3 sich in ausreichenden Mengen mittels Elutionspuffer aus dem Cobalt Chelate Gel eluieren lässt.

3.3.1.2 Immobilized-bait-Kontrolle (IBC)

Im Pull-Down-Assay wurde der N-terminale Abschnitt des *h*SK3 als GST-getaggtes Räuberprotein eingesetzt. Um ein falsch positives Ergebnis, durch eine Interaktion des GST-tags mit SH3GL3 oder dem Immobilized Cobalt Chelate Gel, als solches zu erkennen, wurde ein Kontrollexperiment vorgenommen, bei dem das GST-tag ohne den N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 als Räuberprotein eingesetzt wurde. Nach Bindung SH3GL3 an das Cobalt Chelate Gel und Waschen wurde das Cobalt Chelate Gel eine Stunde mit Lysat von GST inkubiert, das SH3GL3 eluiert und die Proben mittels SDS-Gelelektrophorese und Westernblot mit anti-SH3GL3 und anti-GST als Primärantikörpern analysiert.

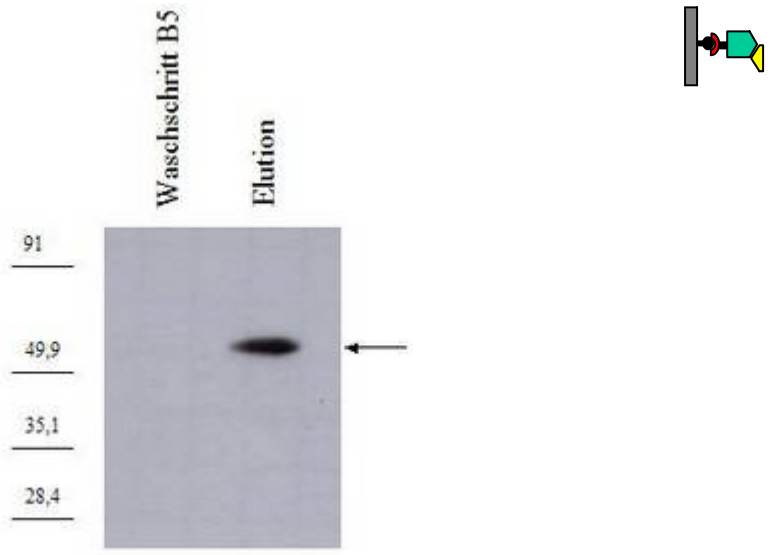

Abb. 16: Waschschritt B5 und Elution der Immobilized-bait-Kontrolle (IBC) mit SH3GL3 als Köderprotein (anti-SH3GL3).

SH3GL3 wurde nach Bindung an das Immobilized Cobalt Chelate Gel achtmal gewaschen, mit GST inkubiert, erneut fünfmal gewaschen und eluiert. Aufgetragen sind der fünfte Waschschritt nach Inkubation mit GST und die Elutionsfraktion. Westernblot mit anti-SH3GL3 als Primär- und anti-rabbit als Sekundärantikörper.

Abbildung 16 zeigt den fünften Waschschritt nach Inkubation von SH3GL3 mit GST und die Elutionsfraktion der Immobilized Bait Kontrolle. Nach Inkubation von SH3GL3 zeigt

der Antikörper in der Spur des fünften Waschschritts nach Inkubation mit anti-SH3GL3 erwartungsgemäß keine Reaktion mehr. In der Spur rechts davon ist in der Elutionsfraktion der Immobilized-bait-Kontrolle eine Bande auf Höhe des SH3GL3 sichtbar, SH3GL3 konnte also eluiert werden.

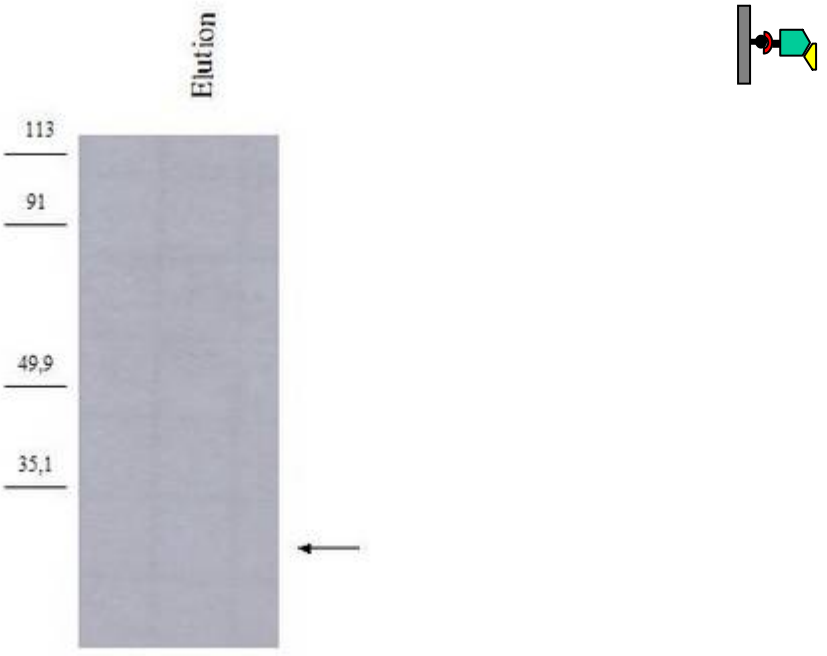

Abb. 17: Elution der Immobilized-bait-Kontrolle (IBC) mit SH3GL3 als Köderprotein (anti-GST)

SH3GL3 wurde nach Bindung an das Immobilized Cobalt Chelate Gel fünfmal gewaschen, mit GST inkubiert, fünfmal gewaschen und eluiert. Aufgetragen ist die Elutionsfraktion. Westernblot mit anti-GST als Primär- und anti-rabbit als Sekundärantikörper. Hieraus kann gefolgert werden, dass GST weder an SH3GL3 noch an das Immobilized Cobalt Chelate Gel bindet.

Einen weiteren Westernblot der Elutionsfraktion der Immobilized-bait-Kontrolle mit anti-GST als Primärantikörper zeigt Abbildung 17. Der eingesetzte Antikörper gegen GST zeigt keine Bande auf der erwarteten Laufhöhe zwischen 28,4 und 31 kDA. Die Laufhöhe der GST war in Abbildung 2 mit knapp unter 31 kDa bestimmt worden. Somit bindet GST weder an SH3GL3 noch an das Immobilized Cobalt Chelate Gel.

3.3.1.3 Non-Treated-Gel-Kontrolle (NTC)

Um ein falsch positives Ergebnis des Pull-Down-Experiments durch Interaktion des GST-getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 als Räuberprotein mit dem Immobilized Cobalt Chelate Gel nach Beladung mit dem Köderprotein zu erkennen, wurden BL21-DE3-Zellen, ohne vorher transformiert worden zu sein, mit IPTG inkubiert und drei

Stunden später lysiert, Protein aufgereinigt und wie Lysat des Köderproteins auf das Immobilized Cobalt Chelate Gel aufgetragen. Im Anschluss an die Inkubation wurde mit dem inkubierten Gel wie im Pull-Down-Assay fortgefahren. Das Eluat der Non-Treated-Gel-Kontrolle wurde in einem Westernblot mit anti-GST inkubiert.

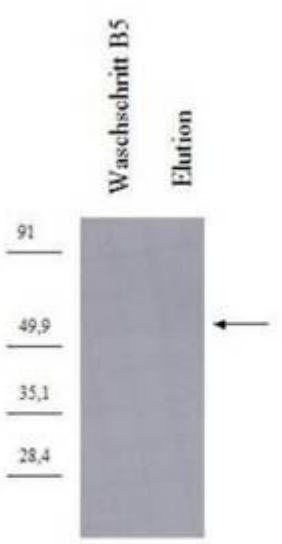

Abb. 18: Waschschritt B5 und Elution der Non-Treated-Gel-Kontrolle (NTC) (anti-GST)

Immobilized Cobalt Chelate Gel wurde mit dem Lysat von *E.coli* BL21 DE3 drei Stunden nach Zugabe von IPTG inkubiert. Nach Waschen wurde die Säule für 1 Stunde mit GST-SK3-N-tail inkubiert, erneut gewaschen und eluiert. Anti-GST als Primär- und anti-rabbit als Sekundärantikörper. Hieraus kann gefolgert werden, dass der GST-getagte N-terminale Abschnitts des *h*SK3 nicht an das Immobilized Cobalt Chelate Gel bindet.

In Abbildung 18 ist der Westernblot der Non-Treated-Gel-Kontrolle abgebildet. In der linken Spur ist der fünfte Waschschritt nach Inkubation mit GST-SK3-N-tail aufgetragen, in der rechten die Elutionsfraktion. Der als Primärantikörper eingesetzte Antikörper gegen GST zeigt keine Banden, weder im fünften Waschschritt nach Inkubation mit dem GST-getagten des N-terminalen Abschnitt des *h*SK3, noch in der Elutionsfraktion. Daraus kann gefolgert werden, dass der GST-getagte N-terminale Abschnitts des *h*SK3 nicht an das Immobilized Cobalt Chelate Gel bindet.

3.3.2 Pull-Down-Experimente

3.3.2.1 Interaktion von SH3GL3 mit dem N-terminalen Abschnitt des *h*SK3

Um SH3GL3 auf die Interaktion mit dem des N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 im Pull-Down-Experiment zu testen wurde SH3GL3 an Immobilized Cobalt Chelate Gel gebunden, nach mehreren Waschschritten mit dem N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 inkubiert, erneut gewaschen und eluiert.

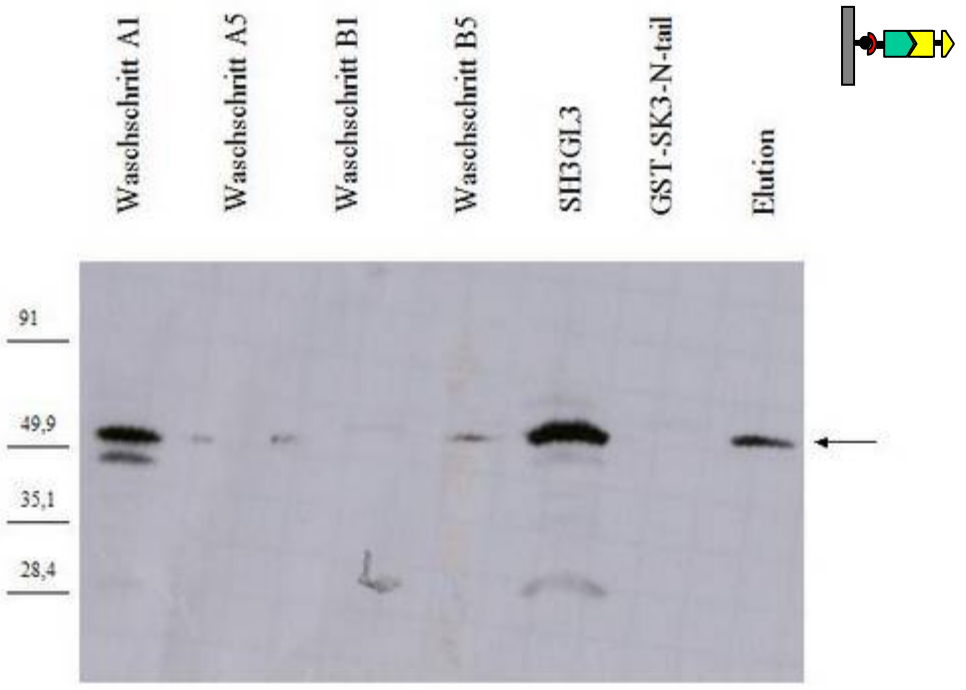

Abb. 19: Westernblot des Pull-Down-Experiments (anti-SH3GL3)

Nach Bindung von SH3GL3 an das Trägermaterial wurde dieses acht mal gewaschen, mit dem GST-getagten N-terminalen Abschnitt des *h*SK3 inkubiert, erneut 5 mal gewaschen und eluiert. Aufgetragen sind der erste und achte Waschschritt vor Inkubation (Waschschritt A1 und A8), der erste und fünfte Waschschritt nach Inkubation (Waschschritt B1 und B5), SH3GL3, der GST-getagte N-terminale Abschnitt des *h*SK3 und die Elutionsfraktion. Westernblot mit anti-SH3GL3 als Primär- und anti-rabbit als Sekundärantikörper.

In Abbildung 19 ist ein Westernblot eines Pull-Down-Experiments abgebildet, bei dem anti-SH3GL3 als Primärantikörper eingesetzt wurde. Auf dem Polyacrylamidgel wurden die ersten und letzten Waschschritte vor und nach Inkubation des an das Immobilized Cobalt Chelate Gel gebundenen SH3GL3 mit dem N-terminalen Abschnitt des *h*SK3, die Lysate von SH3GL3 und dem N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 sowie die Elutionsfraktion aufgetragen. Auf der erwarteten Laufhöhe des SH3GL3 sind Banden in den Spuren der ersten Waschfraktion vor Inkubation mit dem GST-getagten N-terminalen

Abschnitt des *h*SK3, in der letzten Waschfraktion nach Inkubation, der Spur des SH3GL3-Lysats sowie der Elutionsfraktion sichtbar. In den Spuren des letzten Waschschritts vor Inkubation (WA5), der ersten Waschschrittes nach Inkubation (WB1) sowie des Lysats des GST-getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 sind keine Banden nachweisbar. Daraus folgt, dass SH3GL3 sich durch Waschen vom Immobilized Cobalt Chelate Gel entfernen lässt, an das Immobilized Cobalt Chelate Gel bindet und davon in für Westernblots ausreichenden Mengen eluiert werden kann.

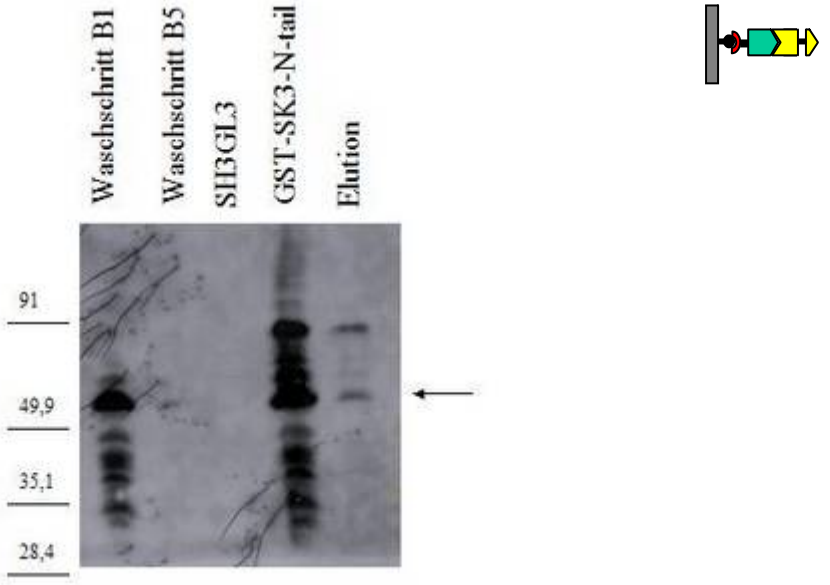

Abb. 20: Westernblot des Pull-Down-Experiments (anti-GST)

Nach Bindung von SH3GL3 an das Trägermaterial wurde dieses acht mal gewaschen, mit dem GST-getagten N-terminalen Abschnitt des *h*SK3 inkubiert, erneut 5 mal gewaschen und eluiert. Aufgetragen sind der erste und fünfte Waschschritt nach Inkubation (Waschschritt B1 und B5), SH3GL3, der GST-getagte N-terminale Abschnitt des *h*SK3 und die Elutionsfraktion. Westernblot mit anti-GST als Primär- und anti-rabbit als Sekundärantikörper.

Zum Nachweis des GST-getagten des N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 im Eluat des Pull-Down-Experiments wurde der in Abbildung 20 gezeigte Westernblot des gleichen Pull-Down-Experiments wie in Abbildung 19 durchgeführt. Bei diesem Westernblot wurde anti-GST als Primärantikörper eingesetzt. Auf dem Polyacrylamid–Gel wurden die erste und letzte Waschschritte nach Inkubation des an das Cobalt Chelate Gel gebundenen SH3GL3 mit Lysat des GST-getagtem N-terminalen Abschnitt des *h*SK3, die Lysate von SH3GL3 und GST-getagtem N-terminalen Abschnitt des *h*SK3 sowie die Elutionsfraktion aufgetragen. Während der Antikörper gegen GST keine Reaktion mit den Spuren des letzten Waschschrittes nach Inkubation des an das Cobalt Chelate Gel gebundenen

SH3GL3 (WB5) und dem SH3GL3-Lysat zeigt, ist eine deutliche Reaktion in den Spuren des ersten Waschschrittes (WB1), des Lysats des GST-getagte N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 und der Elutionsfraktion zu sehen. In der Spur des Lysats des N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 und der Elutionsfraktion sind zwei prominente Banden auf Laufhöhen zwischen 91,0 und 49,9 kDa erkennbar. Die höhere der beiden Banden läuft knapp unter 91,0 kDa, die untere bei etwas über 49,9 kDa. Die Laufhöhe des GST-getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 wurde in Abbildung 4 und 5 mit etwas über 49,9 kDa bestimmt. Eine dicke Bande auf dieser Höhe ist in allen drei Spuren erkennbar. Somit ist der N-terminale Abschnitt des *h*SK3 in allen drei Proben vorhanden.

Daraus können mehrere Schlüsse gezogen werden. Nach Bindung von SH3GL3 an Immobilized Cobalt Chelate Gel und Inkubation mit Lysat des GST-getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3, kann der GST-getagte N-terminale Abschnitts des *h*SK3 durch Waschen entfernt werden. Während in der ersten Waschfraktion noch sehr viel des GST-getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 nachweisbar ist, fehlt dieses in der fünften Waschfraktion. Der in der Elution nachweisbare GST-getagte N-terminale Abschnitts des *h*SK3 ist also in der Elutionsfraktion vorhanden, obwohl es in ausreichendem Maße durch Waschen vom Immobilized Cobalt Chelate Gel entfernt wurde. In der Immobilized Bait Kontrolle (IBC) wurde ausgeschlossen, dass eine Bindung der an GST-getagten N-terminalen Abschnitt des *h*SK3-Kanals an SH3GL3 über das GST-tag vermittelt wird und in der Non-Treated-Gel-Kontrolle (NTC) wurde ausgeschlossen, dass eine Bindung des GST-getagten N-terminalen Abschnitt des *h*SK3 an das Immobilized Cobalt Chelate Gel stattfindet. Daher kann aus dem Nachweis des GST-getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK in der Elutionsfraktion des Pull-Down-Assays gefolgert werden, dass der N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 an SH3GL3 bindet.

3.3.2.2 Interaktion von SH3GL3-ΔSH3 mit dem N-terminalen Abschnitt des *h*SK3

Um die Bindungsstelle der Interaktion zwischen SH3GL3 und dem N-terminalen Abschnitt des *h*SK3 im Pull-Down-Experiment nachzuweisen wurde SH3GL3ΔSH3 an Immobilized Cobalt Chelate Gel gebunden, nach mehreren Waschschritten mit Lysat des GST-getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 inkubiert, erneut gewaschen und eluiert. In Abbildung 21 ist die Spur der Elutionsfraktion des Westernblots dieses Pull-Down-Experiments zu sehen. Hier zeigt sich keine Bande auf Höhe des GST-getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3.

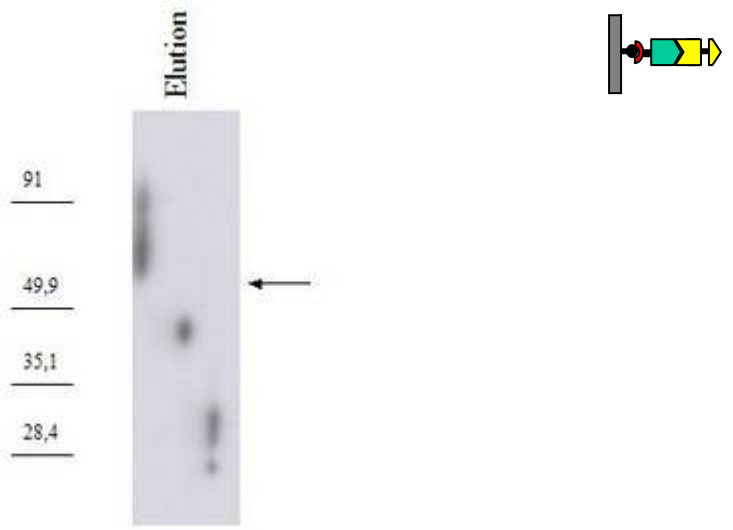

Abb. 21: Elution des Pull-Down-Assays mit SH3GL3ΔSH3 als Köderproteinen (anti-GST)

SH3GL3ΔSH3 wurde nach Bindung an das Immobilized Cobalt Chelate Gel mit Lysat des GST-getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 inkubiert, gewaschen und eluiert. Anti-GST als Primär- und anti-rabbit als Sekundärantikörper.

Daraus kann gefolgert werden, dass die Bindung von SH3GL3 an den N-terminalen Abschnitt des *h*SK3 durch die SH3-Domäne des SH3GL3 vermittelt wird, da im Pull-Down-Assay mit SH3GL3 als „Köderprotein" der N-terminale Abschnitt des *h*SK3 im Eluat nachweisbar ist (siehe Abbildung 20), wohingegen im Pull-Down-Assay mit SH3GL3ΔSH3 als „Köderprotein" der N-terminale Abschnitt des *h*SK3 im Eluat nicht nachweisbar ist (siehe Abbildung 21).

3.3.3 Zusammenfassung der Pull-Down-Ergebnisse

Die Ergebnisse der Kontrollexperimente und des Pull-Down-Experiments lassen sich wie in Tabelle 14 zusammenfassen. Dabei bedeutet ein „+“, dass sich im oben aufgetragenen Experiment im Immunoblot, mittels des links aufgetragenen Antikörpers, die oben aufgetragenen Proteine nachweisen ließen.

Tab. 14: Zusammenfassung der Pull-Down-Ergebnisse

	SH3GL3	***SH3GL3ΔSH3***	***N-terminaler Abschnitt des hSK3***	***SH3GL3 : N-terminaler Abschnitt des hSK3***	***SH3GL3ΔSH3 : N-terminaler Abschnitt des hSK3***	***SH3GL3 : GST***	***BL21 DE3 : N-terminaler Abschnitt des hSK3***
anti-SH3GL3	+	+	-	+	+	+	-
anti-GST	-	-	+	+	-	-	-

4 Diskussion

4.1 Expression und Bestimmung der apparenten Molekulargewichte

Bevor die Pull-Down-Assays durchgeführt wurden, wurden zunächst die Expression von GST, dem GST-getagten N-terminalen Abschnitt des *h*SK3, SH3GL3 und SH3GL3ΔSH3 untersucht und deren apparentes Molekulargewicht bestimmt.

4.1.1 SH3GL3

Die Expression von in *E.coli* BL21 DE3 wurde mit IPTG induziert. In einer Induktionsreihe wurde der geeignete Zeitpunkt für die Lyse der Zellen nach Induktion des SH3GL3 bestimmt. Dazu wurde eine mit Ampicillin versetzte 25 ml Kultur der mit pET100/D-TOPO-SH3GL3-Plasmid transfizierten *E.coli* BL21 DE3 mit IPTG induziert und 0,5 ml Proben zum Zeitpunkt null, nach 30, 60, 150, 180, 360 Minuten, sowie nach Inkubation über Nacht genommen, lysiert und in dem in Abbildung 6 gezeigten Westernblot eingesetzt.

4.1.2 SH3GL3ΔSH3

Bei der Bestimmung der apparenten Laufhöhe des SH3GL3ΔSH3 im Polyacrylamid-Gel nach Schägger und Jagow wurde auf eine Induktionsreihe verzichtet und gleich eine lysierte Probe nach drei Stunden Induktion im Westernblot eingesetzt. Die Abbildung 10 zeigt einen Westernblot, in dem links SH3GL3ΔSH3, rechts das Lysat nicht transfizierter *E.coli* BL21 DE3 aufgetragen ist. Links ist eine prominente Bande mit einer Laufhöhe zwischen 35,1 kDA und 49,9 kDa zu erkennen, rechts ist keine Bande erkennbar. Aus dieser Abbildung lässt sich schließen, dass SH3GL3ΔSH3 ein apparentes Molekulargewicht zwischen 35,1 kDA und 49,9 kDA aufweist und der Anti-SH3GL3-Antikörper nicht mit Lysat des *E.coli* Leerstamms BL21 DE3 reagiert.

4.1.3 GST und der GST-getagte N-terminale Abschnitt des *h*SK3

Auch hier wurde auf eine Induktionsreihe verzichtet. Die Expression des GST-getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 und GST wurde in *E.coli* BL21 mit IPTG induziert. Nach drei Stunden wurden die Zellen lysiert und die Lysate neben dem Leerstamm *E.coli* BL21 im Westernblot eingesetzt. Abbildung 11 zeigt einen solchen Westernblot. Links wurde

das Lysat des GST-getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3, in der Mitte das Lysat des Leerstammes und rechts GST-Lysat aufgetragen. Man erkennt eine deutliche Reaktion des eingesetzten Anti-GST-Antikörpers mit dem GST-getagten N-terminalen Abschnitt des *h*SK3 sowie GST, ohne in der Spur des GST-getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 eine Bande als prominenteste ausmachen zu können. Eine sehr deutliche Bande lässt sich allerdings rechts in der GST-Laufspur unterhalb 31 kDa erkennen. Der Antikörper reagiert nicht in der Laufspur des Leerstammes, also ist diese Reaktion spezifisch für GST und das apparente Molekulargewicht von GST wird mit knapp unter 31 kDa bestimmt.

Um das apparente Molekulargewicht des GST-getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 zu bestimmen, wurde ein weiterer Versuch unternommen. Dazu wurde zunächst die Expression des GST-getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 mit IPTG induziert, das Lysat allerdings nicht sofort im Westernblot eingesetzt, sondern zunächst aufgereinigt. Nach der Aufreinigung mit GST-Agarose auf Handee-Spin-Cup-Säulen wurden neben dem kruden Lysat des GST getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 außerdem das zum Aufreinigen eingesetzte Immobilized Glutathion Gel, das Eluat nach Aufreinigung sowie das Lysat des Leerstammes in einem Westernblot eingesetzt.

Die Abbildungen 12 und 13 zeigen Abbildungen entsprechender Westernblots. Im in Abbildung 12 gezeigten Westernblot wurde anti-GST, im in Abbildung 13 gezeigten Westernblot wurde anti-SK3 als Primärantikörper eingesetzt. Die Pfeile in Abbildungen 12 und 13 zeigen Banden an, die sich in beiden Gelen auf gleicher Höhe befinden. Während beide Antikörper das genaue Bestimmen einer Bande im kruden Lysat nicht zulassen, zeigen sie eine prominente Bande in der Spur des GST-getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 nach Aufreinigung. Elution, etwas über 49,9 kDa Molekulargewicht.

Die Antikörper zeigen keine Reaktion in der Spur des Leerstammes an. Somit ist die Reaktion auf die Expression des Plasmids in den transfizierten Zellen zurückzuführen.

Aus diesen Beobachtungen lassen sich mehrere Schlüsse ziehen: Sowohl anti-GST als auch anti-SK3 lassen sich zur spezifischen Detektion des GST-getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 einsetzen und zeigen auf identischer Laufhöhe eine Bande, die mit knapp 60 kDa Molekulargewicht geschätzt werden kann. Weiterhin wird ein vollständiges Lösen des GST-getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 mit der eingesetzten Methode nicht erreicht.

In Hinblick auf den noch durchzuführenden Pull-Down-Assay wirft diese Abbildung die Frage auf, ob bei Einsatz des GST-Pull-Down-Assay eine eventuelle Interaktion überhaupt nachweisbar ist. Man geht bei Pull-Down-Assays von dem Gedanken aus, dass das

„Köder-Protein“ (hier GST-getagter N-terminaler Abschnitt des *h*SK3) an das „Säulenmaterial“ bindet und bei Bindung des „Räuber-Proteins“ an Ersteres, beide Proteine aus dem „Säulenmaterial“ eluiert werden. Aus den Abbildungen 12 und 13 kann entnommen werden, dass mit der eingesetzten Methode der GST-getagte N-terminalen Abschnitt des *h*SK3 zu guten Teilen nicht eluiert wird. Das Fehlen des Nachweises des Räuberproteins (in diesem Falle SH3GL3) im Eluat dieses Pull-Down-Experiments wäre eventuell darauf zurückzuführen, dass die Interaktionspartner nicht in ausreichendem Maße aus dem Gel eluiert wurden und bei einer schwachen Reaktion von anti-SH3GL3 mit dem Eluat die Konzentration von SH3GL3 im Eluat unter der Nachweisgrenze für den eingesetzten Antikörper anti-SH3GL3 wäre.
Um diesem methodischen Fehler aus dem Weg zu gehen, wurde dieser Ansatz nicht weiterverfolgt, sondern eine Methode verwendet, bei der zunächst SH3GL3 mittels des His-Tag an Immobilized Cobalt Chelate Gel gebunden und anschließend mit dem N-terminalen Abschnitt des *h*SK3 inkubiert wird. Hierzu wurden Methoden und Bestandteile des ProFound Pull-Down PolyHisProtein:Protein Interaction Kit (Fa. Pierce, Rockford, Illinois, USA) benutzt.

4.2 Elution von SH3GL3

Nachdem die Expression von SH3GL3 in *E.coli* BL21 DE3 gezeigt werden konnte und gezeigt wurde, dass GST-*h*SK3-N-tail nicht im ausreichenden Maße aus dem Immobilized Glutathione Gel eluiert wird, musste nachgewiesen werden, dass SH3GL3 aus dem Cobalt Chealate Gel eluerit werden kann.
Zunächst wurde dazu SH3GL3-Lysat mit Immobilized Cobalt Chelate inkubiert. Nach Inkubation wurde das Immobilized Cobalt Chelate gewaschen und eventuell gebundenes SH3GL3 mittels Elutionslösung eluiert. Abbildung 14 zeigt einen Westernblot, in dem von links nach rechts die erste Waschfraktion, die fünfte Waschfraktion, sowie das Eluat eingesetzt wurden. Man erkennt in allen drei Spuren eindeutig eine Reaktion des anti-SH3GL3-Antikörpers auf identischen Höhen, bei etwa 60 kDa. SH3GL3 lässt sich also mit der ausgewählten Methode aus dem Immobilized Cobalt Chelate eluieren und im Westernblot nachweisen.
Da in der fünften Waschfraktion immer noch eine Reaktion sichtbar ist, wurde in den folgenden Experimenten das Säulenmaterial nach Inkubation mit SH3GL3 mehr als fünf

mal gewaschen. Acht Waschschritte haben sich als suffizient herausgestellt, wie Abbildung 15 zeigt. Hier ist in der achten Waschfraktion kein SH3GL3 mehr nachweisbar.
Abbildung 16 zeigt einen Westernblot der letzten Waschfraktion vor Elution (WB5) und rechts davon den der Elutionsfraktion. Anti-SH3GL3 wurde als Primärantikörper eingesetzt. Lediglich in der Spur der Elution ist eine Reaktion zu erkennen (siehe Pfeil). In der Spur der Waschfraktion vor Elution (WB5) ist diese Bande nicht nachweisbar.
Dies zeigt erstens, dass nicht gebundenes SH3GL3 suffizient durch Waschen von der Säule entfernt wird und zweitens, dass SH3GL3 mit den gewählten Methoden suffizient aus dem Immobilized Cobalt Chelat Gel eluiert und anschließend nachgewiesen werden kann.

4.3 Kontrollexperimente

4.3.1 Immobilized-bait-Kontrolle

Ein bekanntes Problem bei Interaktionsstudien mittels Pull-Down-Assays und (Ko-) Immunpräzipitationen ist die Möglichkeit, dass beim Einsatz von Fusionsproteinen mit GST eine Interaktion der Interaktionspartner über das GST-tag vermittelt werden kann.
In den in dieser Arbeit vorgestellten Pull-Down-Assays wurde, zum Ausschluss eines falsch positiven Ergebnisses im Pull-Down-Experiment, die Immobilized-bait Kontrolle (IBC) durchgeführt.
Dabei wurde parallel zum eigentlichen Pull-Down-Experiment SH3GL3 auf eine Interaktion mit GST getestet. Abbildung 17 zeigt den Westernblot der Elutionsfraktion der IBC-Kontrolle. Anti-GST wurde als Primärantikörper eingesetzt. Die Laufhöhe von GST im Schägger & Jagow-Gel war vorher in Abbildung 8 als knapp unter 31 kDa bestimmt worden. In Abbildung 17 ist auf dieser Höhe keine Reaktion des anti-GST-Antikörpers nachweisbar (siehe Pfeil).
Ein Nachweis von GST in der Elutionsfraktion der IBC-Kontrolle sollte als Nachweis dafür gelten, dass die Interaktion von SH3GL3 mit dem GST-getagten N-terminalen Abschnitt des *h*SK3 über das GST-tag vermittelt wird. In diesem Fall hätte ein falsch positives Ergebnis im Pull-Down-Experiment vorgelegen.
Aus den Abbildungen 16 und 17 folgt, dass SH3GL3 in der Elutionsfraktion der IBC-Kontrolle nach Inkubation mit GST vorliegt, GST allerdings nicht. Dies führt zu dem Schluss, dass SH3GL3 nicht mit GST interagiert. Eine Interaktion von SH3GL3 und GST-SK3 im Pull-Down-Experiment wird daher nicht über das GST-tag vermittelt.

Man mag die berechtigte Frage stellen, wozu man im Pull-Down-Assay ein Fusionsprotein einsetzt, wenn dieser Einsatz eine weitere Kontrolle notwendig macht. Schließlich war der Ansatz, SK3 als Fusionsprotein von GST-SK3 als Köderprotein an einer GST-Säule einzusetzen, bereits nach ersten Vorversuchen verlassen worden. Weiterhin enthält der Expressionsvektor pGEX-6P1 eine Enterokinasebindungsstelle, welche die Trennung von SK3 und GST ermöglicht.

Der Grund, den N-terminalen Abschnitt des *h*SK3 als Fusionsprotein einzusetzen war, dass GST-Fusionsproteine in großen Mengen exprimiert werden. Der Einsatz als Fusionsprotein im Pull-Down-Assay ergibt sich aus den Überlegungen, dass die Trennung zeitaufwändige zusätzliche Arbeitsschritte notwendig gemacht hätte und die Proteinausbeute vermutlich unter nicht enzymatischer Proteolyse gelitten hätte.

Weiterhin lassen sich beim Einsatz des Fusionsproteins mehrere Antikörper einsetzen. In diesem Fall wurde so die Laufhöhe von GST-getagtem N-terminalen Abschnitt des *h*SK3 im Schägger & Jagow-Gel bestimmt (siehe Abbildungen 12 und 13).

4.3.2 Non-treated-gel-Kontrolle

Ein weiteres bekanntes Problem bei Interaktionsstudien mittels Pull-Down-Assays und (Ko-) Immunpräzipitationen ist die Möglichkeit, dass mehr als nur einer der Interaktionspartner mit dem Säulenmaterial interagieren kann.

Die Konsequenz ist also, dass der Nachweis beider Interaktionspartner in der Elutionsfraktion eines Pull-Down-Assay erst dann als Interaktion gewertet werden kann, wenn nachgewiesen ist, dass nur einer der Interaktionspartner an das Säulenmaterial bindet.

Zum Ausschluss eines falsch positiven Ergebnisses wurde in den in dieser Arbeit vorgestellten Pull-Down-Assay die Non-treated-Gel-Kontrolle durchgeführt.

Dazu wurde parallel zum eigentlichen Pull-Down-Experiment, eine Säule mit Immobilized Cobalt Chelate Gel nicht mit SH3GL3, sondern mit dem Lysat des Leerstammes BL21 DE3 inkubiert. Die Säule wurde anschliessend mit dem GST-getagten N-terminalen Abschnitt des *h*SK3 inkubiert, und schließlich eluiert. Das Eluat wurde in einem Westernblot auf das Vorkommen des GST-getagten N-terminalen Abschnitt des *h*SK3 hin untersucht. Abbildung 18 zeigt einen Westernblot mit der fünften Waschfraktion nach Inkubation mit dem GST-getagten N-terminalen Abschnitt des *h*SK3, sowie die Elutionsfraktion der Non-treated-Gel-Kontrolle. Als Primärantikörper ist anti-GST eingesetzt worden. Weder in der Spur der fünften Waschfraktion (Waschschritt B5) nach Inkubation mit dem GST-getagten N-terminalen Abschnitt des *h*SK3, noch in der Spur der

Elutionsfraktion ist eine Reaktion zu erkennen. Der GST-getagte N-terminale Abschnitt des *h*SK3 bindet also nicht an das Säulenmaterial.
Der Nachweis des zweiten Interaktionspartners (hier der GST-getagte N-terminale Abschnitt des *h*SK3) in der Elutionsfraktion des Pull-Down-Experiments ist also nicht auf insuffizientes Waschen von der Säule oder eine Elution bei Bindung an das Säulenmaterial zurückzuführen, sonder an ein Bindung an das SH3GL3.

4.4 Pull-Down-Experimente

Das Prinzip des Pull-Down-Experiments wurde bereits im Kapitel 4.3 besprochen und in Abbildung 6 schematisch dargestellt. Abbildung 19 zeigt einen Westernblot des Pull-Down-Experiments. Als Primärantikörper wurde anti-SH3GL3 eingesetzt.
Von links nach rechts sind der erste (WA1) und letzte (WA8) Waschschritt vor Inkubation mit dem GST-getagten N-terminalen Abschnitt des *h*SK3, der erste (WB1) und letzte (WB5) Waschschritt nach Inkubation, SH3GL3, der GST-getagte N-terminale Abschnitt des *h*SK3 sowie die Elutionsfraktion aufgetragen.
Abbildung 19 bestätigt die Ergebnisse der Vorversuche und liefert gleichzeitig weitere Erkenntnisse. Die Laufhöhe des SH3GL3 in der fünften Spur von links beträgt knapp über 49,9 kDa und bestätigt damit die Folgerungen, die aus dem Westernblot in Abbildung 6 gezogen wurden. Weiterhin kann man daraus, dass in der Spur des Lysats des GST-getagten N-terminalen Abschnitt des *h*SK3 keine Bande sichtbar ist schließen, dass keine Kreuzreaktion zwischen anti-SH3GL3 und dem GST-getagten N-terminalen Abschnitt des *h*SK3 besteht.
Die Anzahl der Waschschritte vor Inkubation mit dem GST-getagten N-terminalen Abschnitt des *h*SK3 scheint ausreichend zu sein. Die Erhöhung der Anzahl der Waschschritte dient lediglich dazu, die Anzahl in Lösung befindlicher Interaktionspartner zu verringern und die Reaktion des anti-GST mit dem an die Säule gebundenen GST-getagten N-terminalen Abschnitt des *h*SK3 zu verbessern.
Die mithin wichtigste Information, die aus Abbildung 19 gewonnen werden kann, ist, dass SH3GL3 in ausreichender Menge mit der gewählten Elutionsmethode aus dem Immobilized Cobalt Chelate Gel eluiert werden kann.
Abbildung 20 zeigt den Westernblot des selben Pull-Down-Experiments wie in Abbildung 19, als Primärantikörper wurde in diesem Fall anti-GST eingesetzt. Von links nach rechts sind der erste (WB1) und letzte (WB5) Waschschritt nach Inkubation mit dem GST-

getagten N-terminalen Abschnitt des *h*SK3, SH3GL3, Lysat des GST-getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 sowie die Elutionsfraktion aufgetragen.
Auch Abb. 20 bestätigt Ergebnisse von Vorversuchen.
Die Laufhöhe des GST-getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 mit der Laufhöhe, die in den Abbildungen 12 und 13 bestimmt wurde, stimmt überein.
Der GST-getagte N-terminale Abschnitt des *h*SK3 lässt sich im ersten Waschschritt (WB1) noch in großen Mengen nachweisen. In der Spur des fünften Waschschritts (WB5) ist keine Reaktion des anti-GST auf Höhe des GST-getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 erkennbar. Daraus lässt sich schließen, dass die Waschprozedur nach Inkubation suffizient ist, um nicht gebundene Moleküle des GST-getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 zu entfernen.
Da in der Spur des SH3GL3-Lysats keine Reaktion von anti-GST sichtbar ist, lässt sich als weitere Information entnehmen, dass keine Kreuzreaktion zwischen anti-GST und SH3GL3 besteht. Dies ist ein um so wichtigerer Punkt, da die Laufhöhen von SH3GL3 und dem GST-getagten N-terminalen Abschnitt des *h*SK3 im Schägger & Jagow-Gel nicht weit auseinander liegen. Darauf, dass keine Kreuzreaktion zwischen anti-SH3GL3 mit dem GST-getagten N-terminalen Abschnitt des *h*SK3 besteht, wurde bereits hingewiesen.
Die wichtigste Information, die der Abbildung 20 entnommen werden kann ist, dass in der Spur der Elutionsfraktion des Pull-Down-Experiments eine Bande sichtbar ist, die erstens mit der Laufhöhe des GST-getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 aus Abb. 13, zweitens mit der prominentesten Bande in der Laufspur des ersten Waschschrittes nach Inkubation mit Lysat des GST-getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 sowie Lysat GST-getagten N-terminalen Abschnitt des *h*SK3 übereinstimmt. Damit ist N-terminalen Abschnitt des *h*SK3 im Eluat des Pull-Down-Experiments nachgewiesen.
Abbildung 21 zeigt die Laufspur der Elutionsfraktion eines Pull-Down-Experiments, bei dem SH3GL3ΔSH3 und Lysat des GST-getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 eingesetzt wurden. Als Primärantikörper wurde anti-GST eingesetzt. Hier ist auf der Laufhöhe des GST-getagten N-terminalen Abschnitts des *h*SK3 keine Reaktion nachweisbar, der N-terminale Abschnitt des *h*SK3 kommt also in der Elutionsfraktion des Pull-Down-Experiments, bei dem SH3GL3ΔSH3 und GST-getagte N-terminalen Abschnitt des *h*SK3 eingesetzt werden, nicht vor.
Der Nachweis der Interaktion von SH3GL3 mit dem N-terminalen Abschnitt des *h*SK3 im Pulldown-Experiment und das Fehlen dieses Nachweises im Puldown mit SH3GL3ΔSH3 mit dem N-terminalen Abschnitt des *h*SK3 spricht also dafür, dass die SH3GL3:SK3

Interaktion durch die Bindung der SH3-Domäne an den N-terminalen Abschnitt des *h*SK3 geschieht.

4.5 Der N-terminale Abschnitt des *h*SK3

Im Vergleich zu den SK1- und SK2-Kanälen verfügt die α-Untereinheit des *h*SK3 über einen etwa doppelt so langen intrazellulären N-terminalen Anteil, wobei die Transmembrandomänen eine hohe Homologie aufweisen (Köhler *et al.*, 1996).
Eine weitere Besonderheit des *h*SK3 im Vergleich der N-Termini sind die bereits in der Einleitung beschriebenen Polyglutaminrepeats, die eine prolinreiche Domäne (PRD) begrenzen. Der zweite, mehr C-terminal gelegene Polyglutaminrepeat ist hoch polymorph, wobei in einer Kontrollgruppe gesunder Individuen das am häufigsten vertretene Allel des KCNN3-Gens, welches für den humanen SK3-Kanal kodiert, 19 Glutamine im zweiten Polyglutaminrepeat enthält. Bei den in dieser Arbeit vorgestellten Experimenten wurde eine Sequenz der ersten 299 Aminosäuren des *h*SK3 mit 19 Glutaminen im zweiten Polyglutaminrepeat verwendet.

Die N-terminale Abschnitt des *h*SK3 unterscheidet sich von denen des *h*SK1 und *h*SK2 dadurch, dass Interaktionen zwischen zwei N-terminalen Abschnitt sowie zwischen den N- und C-terminalen Abschnitten auftreten, wobei im Gegensatz zur *h*SK3:SH3GL3-Interaktion die Länge des ersten Polyglutaminrepeats keinen Einfluss auf die Bindung hat. Die N-C-Bindung hat keinen Einfluss auf die Ca^{2+}-Sensivität, wohl aber auf die Leitfähigkeit des Kanals (Frei *et al.,* 2006). Die Verringerung der Leitfähigkeit/des Stroms des nativen *h*SK3 durch ein Peptid aus den ersten 299 Aminosäuren des hSK3 wurde durch eine Bildung von N-N-Interaktionen zwischen einer α-Untereinheit und dem Peptid anstelle von N-C-Interaktionen innerhalb ein und der selben α-Untereinheit erklärt (Frei *et al.,* 2006).

Die Sequenz der prolinreichen Domäne und der beiden Polyglutaminrepeats weist eine hohe Homologie zu einer Sequenz des Proteins Huntingtin auf. Diese Homologie ist bemerkenswert, da Huntingtin mit SH3GL3 interagiert (Sittler *et al.*, 1998). Von daher war es naheliegend, den humanen SK3-Kanal auf die Interaktion mit SH3GL3 hin zu untersuchen. Der Nachweis der Interaktion des N-terminalen Abschnittes des humanen SK3-Kanals mit SH3GL3 gelang auch in Hefe-Zwei-Hybrid-Versuchen (Spindler, 2003, Spindler *et al.*, 2003, a).

Prolinreiche Domänen können PxxP-Motive enthalten, die im Komplex mit ihren Bindungspartnern eine PP-II-Helix Konfiguration einnehmen (Musaccho *et al.*, 1994). Als diese Bindungspartner sind SH3-Domänen beschrieben (Kuriyan und Cowburn, 1993).

Bei der Interaktion von Huntingtin mit SH3GL3 konnte ein Einfluss der Länge der Glutaminrepeats auf die Interaktion gezeigt werden. Dabei verfügte eine Isoform des Huntingtins mit 51 Glutaminen über eine fünffach höherer Affinität zu SH3GL3 als eine Isoform mit 20 Glutaminen (Sittler *et al.*, 1998). Die Zunahme der Bindungsstärke hängt allerdings nicht direkt mit der Längen des Glutaminrepeats zusammen. In Hefe-Zwei-Hybrid-Versuchen interagierte SH3GL3 nur mit dem N-Terminus einer *h*SK3-Isoform, dessen zweiter Polyglutaminrepeat 19 Glutaminen enthielt, nicht mit längeren oder kürzeren (Spindler 2003). Die glutaminreichen Regionen bewirken daher möglicherweise lediglich eine Konformation, bei der eine hohe und spezifische Bindung möglich ist.
Mit den bisherigen Experimenten war es nicht möglich die Bindungsstelle einzugrenzen. Mit den bisherigen Experimenten ist es nicht einmal möglich zu sagen, ob die Bindung zwischen SH3GL3 und *h*SK3 mittels einer Interaktion zwischen der prolinreichen Domäne und der SH3-Domäne vermittelt wird.
In den in dieser Arbeit vorgestellten Versuchen konnte eine Interaktion des SH3GL3 mit dem N-terminalen Abschnitt des *h*SK3 in Pulldown-Assays nachgewiesen werden. Um die Bindungsstelle besser eingrenzen zu können wurde statt des für die Interaktion hoch kritischen Bereichs des *h*SK3 die SH3-Domäne des SH3GL3 deletiert. Nach Deletion der SH3-Domäne des SH3GL3 konnte die Interaktion nicht mehr nachgewiesen werden, was den Schluss zulässt, dass die Interaktion zwischen SH3GL3 und dem *h*SK3 über die SH3-Domäne des SH3GL3 und die prolinreiche Domäne des *h*SK3 vermittelt wird.

4.6 Funktion der *h*SK3:SH3GL3-Interaktion

Mit Hilfe der in dieser Arbeit vorgestellten Experimente lassen sich noch keine Aussagen über die Funktion der *h*SK3:SH3GL3-Interaktion treffen. Anhand einiger aus der Literatur bekannten Daten lassen sich jedoch Vermutungen diesbezüglich anstellen.

Das Vorkommen des SK3-Kanals in präsynaptischen Vesikeln konnte bereits nachgewiesen werden (Obermeier *et al.*, 2003, Roncarati *et al.*, 2001). Der SK3 erfüllt eine Funktion bei der Nachhyperpolarisation der Zellmembran (Stocker *et al*., 2003, Wolfart *et al*., 2001). Damit ist die Expression des SK3-Kanals in der Zellmembran, bzw. der Strom des Kanals, wichtig für die Aktivität der Neurone. So zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass der SK3 in dopaminergen Mittelhirnneuronen der Maus die Frequenz spontaner Entladungen beeinflusst (Wolfart *et al*., 2001) und der SK3 den I_{AHP}-Strom in Motoneuronen des dorsal vagal nucleus (Pedarzani *et al*., 2000) und der Substantia nigra vermittelt (Wolfart *et al*., 2001).

Membranproteine gelangen vom endoplasmatischen Retikulum über den cis- und trans-Golgi-Apparat in Vesikeln, welche mit der Zellmembran verschmelzen, in die Zellmembran. Ihr Abbau in der Zellmembran geschieht mittels Endozytose von Membranabschnitten, in welche die Proteine integriert sind.

Eine direkte Beeinflussung der Aktivität von Neuronen durch die Expression von Ionenkanälen auf der Zellmembran legt nahe, dass diese Expression gesteuert erfolgt, da ansonsten die Aktivität der Neurone zufällig durch das Muster der Ionenkanalzusammensetzung erfolgen würde.

Der Weg von der Kanal-mRNA zum funktionellen Protein ist ein komplexer Prozess (Übersicht bei Deutsch, 2003) und für Ionenkanälen erst zum Teil bekannt.

Die Proteinsynthese des sich in der Elongation befindlichen Peptids stoppt am Ribosom, bis es durch ein signal recognition particle gebunden wird. Dieses bindet an einen Rezeptor am ER, wo dann ein Komplex aus Ribosom, wachsendem Peptid und Translocon entsteht, in dem die Elongation weiter voranschreitet. Dabei findet die Integration des Kanals in die Lipiddoppelschicht und gleichzeitig oder im Anschluss die Assoziation mit weiteren Proteinen statt. Auf dem Weg vom ER über cis- und trans-Golgi-Apparat finden weitere Vorgänge statt. Fehlgefaltete oder fehlzusammengesetzte Kanalproteine stellen ein Retentionssignal dar, Signale für den anterograden Transport und der Phosphorilierungszustand sind wichtige Determinanten des weiteren Traffickings zur Zellmembran.

Ein wichtiges Signal für das Forward-Trafficking der SK-Kanäle stellt die Bindung von Calmodulin an den C-terminalen Abschnitt des Kanals dar (Joiner *et al*., 2001, Lee *et al.,* 2003), was ein Signal für den Transport vom ER zum Golgi darstellt (Roncarati *et al.,* 2005). Weiterhin sind der N-terminale sowie ein proximaler Bereich des C-terminalen cytoplasmatischen Abschnitts notwendig für das forward-trafficking (Roncarati *et al.,* 2005).

Ein weiteres Signal, zumindest für den *h*SK3, stellen Interaktionen des cytoplasmatischen N-terminalen Abschnittes einzelner α-Untereinheiten untereinander und mit den C-terminalen Abschnitten dar (Frei et al., 2006).

Für die Regulation der Expression des *h*SK3 auf der Zellmembran scheinen neben der Ebene der Genexpression und der Ebene des forward traffickings weitere Mechanismen, nämlich auf der Ebene des backward traffickings denkbar.

Beispiele für die Regulation der Expression auf der Zellmembran durch Änderung des backward-trafficking sind die Regulation der Expression des β_1-Rezeptors (Tang *et al.*, 1999) und des D_2-Rezeptors (Sugiura *et al.*, 2004) auf der Zellmembran durch Endophiline. SH3GL1 interagiert mittels seiner SH3-Domäne mit einer prolinreichen Domäne in der dritten intrazellulären Schleife des β_1-Rezeptors (Tang *et al.*, 1999). Durch Überexpression des SH3GL1 konnte die Agonisten-bedingte Internalisierung des β_1-Rezeptors in HEK293-Zellen verstärkt werden. Dieser Effekt wurde bei Einsatz eines SH3GL1-Konstrukts mit deletierter SH3-Domäne nicht beobachtet werden.

Daher ist eine Regulation der Expression des *h*SK3-Kanals durch die Interaktion mit SH3GL3 auf der Ebene des backward trafficking denkbar.

Während bei anderen Mitgliedern der Endophilin-Familie eine LPAAT-Aktivität postuliert wurde, welche die Endozytose-Rate erhöht, konnte diese Enzymaktivität bei SH3GL3 nicht nachgewiesen werden. Die LPAAT wird zwar von einigen Autoren als Artefakt betrachtet (Gallop *et al.*, 2005), aber unabhängig davon verringert SH3GL3 die Internalisation von D_2-Rezeptoren (Sugiura *et al.*, 2004) in vitro, was früher mit einer verringerten LPAAT-Aktivität in Verbindung gebracht wurde. Daher ist sehr gut denkbar, dass die Interaktion des *h*SK3 mit SH3GL3 in vivo eine verringerte Internalisation des *h*SK3-Kanals und damit eine Veränderung des backward-trafficking oder des Recycling des Kanals während der Endozytose exozytotischerVesikel an der Synapse bewirkt. Folge davon könnte eine veränderte Aktivität von zum Beispiel dopaminergen Neuronen des Mittelhirns sein.

Ein Ansatz, um diese Hypothese zu überprüfen, wäre zum Beispiel zu untersuchen, ob in einem Endozytose-Assay mit FITC-markiertem Transferrin eine Veränderung der Endozytoserate des *h*SK3 durch Koexpression mit SH3GL3 auftritt. Ein weitere Ansatz wäre, zu untersuchen, ob in depolarisierbaren Zellen eine Veränderung der Aufnahme von geeigneten Membranfarbstoffen (z.B. FM4-64) in das Innere der Zelle durch die Koexpression von *h*SK3 mit SH3GL3 zu beobachten ist. Ein Ansatz zu Prüfung der Frage, ob eine eventuelle Beeinflussung der Endozytose des *h*SK3 spezifisch auf die Interaktion zurückzuführen ist, wäre zu untersuchen, ob diese Effekte bei der Kotransfektion von *h*SK3 mit SH3GL3ΔSH3 nicht nachzuweisen sind.

5 Zusammenfassung

In Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob das Endophilin SH3GL3 mit dem N-terminalen Abschnitt des humanen SK3-Kanals interagiert.

Zunächst wurden SH3GL3 und ein SH3GL3, bei dem die SH3-Domäne deletiert wurde, SH3GL3ΔSH3, in den prokaryoten Expressionsvektor pET100/D-TOPO kloniert. Anschließend wurden SH3GL3 und SH3GL3ΔSH3 in *E.coli* BL21 DE3 exprimiert. Der N-terminale Abschnitt des *h*SK3 wurde in *E.coli* BL21 exprimiert, wobei dieser Abschnitt eine Länge von 299 Aminosäuren hat, 19 Glutamine in der zweiten Glutamin-reichen Region enthält und an GST fusioniert war. Der Nachweis der Expression erfolgte im Western-Blot mit spezifischen Antikörpern gegen SH3GL3 und GST.

Kreuzreaktionen zwischen den gegen SH3GL3 und SH3GL3ΔSH3 gerichteten Antikörpern und GST und den an GST fusionierten N-terminalen Abschnitt des *h*SK3, bzw. den gegen GST gerichteten Antikörpern und SH3GL3 und SH3GL3ΔSH3 wurden ausgeschlossen. Damit ließen sich SH3GL3, SH3GL3ΔSH3, GST und der an GST fusionierte N-terminale Abschnitt des *h*SK3 eindeutig im Western-Blot identifizieren. Im Western-Blot konnten die apparenten Molekulargewicht von SH3GL3 und SH3GL3ΔSH3 sowie GST und der an GST fusionierte N-terminale Abschnitt des *h*SK3 anhand spezifischer Antikörper bestimmt werden.

Nach diesen Vorarbeiten wurde in einem Pull-Down-Assay untersucht, ob der N-terminale Abschnitt des *h*SK3 mit SH3GL3 interagiert und ob die Interaktion über die SH3-Domäne des SH3GL3 vermittelt wird.

In einem Pull-Down-Assay wird einer der Interaktionspartner spezifisch an eine Träger-Matrix gebunden und nach ausreichendem Waschen und Entfernen nicht gebundenen Proteins mit dem zweiten Interaktionspartner inkubiert. Nach erneutem Waschen, zum sicheren Entfernen von nicht gebundenem zweitem Interaktionspartner aus der Matrix, erfolgt die Elution des ersten Interaktionspartners. Lassen sich beide Interaktionspartner im Eluat nachweisen, ist die Interaktion bewiesen, wenn in Kontrollexperimenten gezeigt werden kann, dass der zweite Interaktionspartner nicht an die Matrix bindet und bei Fusionsproteinen die Bindung nicht über ein an das interessierende Protein fusionierte „tag“ vermittelt wird.

Zunächst wurde ein Pulldown-Assay versucht, bei dem der an GST fusionierte N-terminale Abschnitt des *h*SK3 zunächst über Glutathion-Sepharose aufgereinigt wurde. Hierbei zeigte sich jedoch, dass die Elution aus dem Gel nur mit einer geringen Ausbeute möglich

war, weswegen dieses System wieder verlassen wurde und ein Pulldown-Assay mit Aufreinigung des his-getaggten SH3GL3, bzw. SH3GL3ΔSH3, über ein Kobalt-Chelat-Gel als Matrix etabliert wurde. Kontrollexperimente zeigten, dass GST und der an GST fusionierte N-terminale Abschnitt des hSK3 nicht an das Kobalt-Chelat-Gel binden.

Da im Eluat des Pull-Down-Assays sowohl SH3GL3 als auch der an GST fusionierte N-terminale Abschnitt des *h*SK3 nachgewiesen werden konnten, ist bewiesen, dass eine Interaktion zwischen SH3GL3 und den N-terminalen 299 Aminosäuren des *h*SK3 *in vitro* stattfindet.

In einem weiteren Pull-Down-Assay wurde untersucht, ob eine Interaktion zwischen dem N-terminalen Abschnitt des *h*SK3 und einem um die SH3-verkürzten SH3GL3, SH3GL3ΔSH3, stattfindet. Im Eluat dieses Pull-Down-Assays ließ sich der N-terminale Abschnitt des *h*SK3 nicht nachweisen. Daraus kann geschlossen werden, dass die SH3-Domäne des SH3GL3 als Bindedomäne bei der Interaktion zwischen SH3Gl3 und den N-terminalen 299 Aminosäuren des *h*SK3 fungiert.

6 Literaturverzeichnis

Behrens, M. I., Jalil, P., Serani, A., Vergara, F. & Alvarez, O. (1994). Possible role of apamin-sensitive K^+ channels in myotonic dystrophy. *Muscle Nerve* **17**, 1264-1270.

Blank T., Nijholt I., Kye M.J., Radulovic J., Spiess J. (2003). Small-conductance, Ca^{2+}-activated K^+ channel SK3 generates age-related memory and LTP deficits. *Nature Neuroscience* 2003, 911-912.

Bosch M., Kelly M.J., Rønnekleiv O.K.. (2002). Distribution, Neuronal Colocalization, and 17β-E2 Modulation of Small Conductance Calcium-Activated K-Channel (SK3) mRNA in the Guinea Pig Brain. *Endocrinology* **143**,1097–1107.

Bullock, W. O., Fernandez, J. M. & Short, J. M. (1987). XL1-blue : A high efficiency plasmid transforming recombinant Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* **5**, 376-379.

Cardno, A. G., Bowen, T., Guy, C. A., Jones, L. A., McCarthy, G., Williams, N. M., Murphy, K. C., Spurlock, G., Gray, M., Sanders, R. D., Craddock, N., McGuffin, P., Owen, M. J. & O'Donovan, M. C. (1999). CAG repeat length in the hSKCa3 gene and symptom dimensions in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* **45**, 1592-1596.

Chandy, K. G., Fantino, E., Wittekindt, O., Kalman, K., Tong, L. L., Ho, T. H., Gutman, G. A., Crocq, M. A., Ganguli, R., Nimgaonkar, V., Morris-Rosendahl, D. J. & Gargus, J. J. (1998). Isolation of a novel potassium channel gene hSKCa3 containing a polymorphic CAG repeat: A candidate for schizophrenia and bipolar disorder ? *Mol. Psychiatry* **3**, 32-37.

Deutsch, C., (2003). The Birth of a Channel. *Neuron* **40**, 265-276.

Dror, V., Shamir, E., Ghanshani, S., Kimhi, R., Swartz, M., Barak, Y., Weizman, R., Avivi, L., Litmanovitch, T., Fantino, E., Kalman, K., Jones, E. G., Chandy, K. G., Gargus, J. J., Gutman, G. A., Navon, R. (1999). *h*KCa3/KCNN3 potassium channel gene: association of longer CAG repeats with schizophrenia in Israeli Ashkenazi Jews, expression in human tissues and localization to chromosome 1q21. *Mol. Psychiatry,* **4**, 254–260.

Farsad, K., Ringstad, N., Takei, K., Floyd S., Rose, K., De Camilli, P. (2001). Generation of high curvature membranes mediated by direct endophilin bilayer interactions. *J. Cell Biol.*, **155(2)**, 193-200.

Feliciello, I. & Chinali, G. (1993). A modified alkaline lysis method for the preparation of highly purified plasmid DNA from Escherichia coli. *Anal. Biochem.* **212**, 394-401.

Fletcher, S., Bowden, S.E.H., Marrion N.V. (2003). False interaction of Syntaxin 1A with Ca^{2+}-activated K^+ channel revealed by co-immunoprecipitation and pull-down assays: implications for identification of protein-protein interactions. *Neuropharmacology*. **44**, 817-827.

Frei, E., Spindler, I., Grissmer, S., Jäger, H. (2006). Interaction of N-terminal and C-Terminal Parts of the Small Conductance Ca^{2+} Activated K^+ Channel, hSK3. *Cell Physiol Biochem* **18**, 165-176.

Gallop, J.L., Butler, P.,J.,G., McMahon, H.,T. (2005). Endophilins and CtBP/BARS are not acyl transferases in endocytosis or Golgi fission. *Nature* **438**, 675-678.

Gallop, J.L., Jao, C.G., Kent, H.M., Butler, P.J.G., Evans., P.R., Langen, R., MacMahon H.T. (2005). Mechanism of Endophilin N-BAR domain-mediated membrane curvature. *EMBO J* **25**, 2898-2910.

Giachino, C., Lantelme, E., Lanzetti, L., Saccone, S., Della Valle, G. & Migone, N. (1997). A novel SH3-containing human gene family preferentially expressed in the central nervous system. *Genomics* **41**, 427-434.

Guichet A., Wucherpfennig T., Dudu V., Etter S., Wilsch-Bräuniger M., Hellwig A., González-Gaitán M., Huttner W.B., Schmidt A.A. (2002). Essential role of endophilin A in synaptic vesicle budding at the *Drosophila* neuromuscular junction. *EMBO J*, **21**, 1661-1672, 2002.

Habermann, B., (2004) The BAR-domain family of proteins: a case of bending and binding? *EMBO reports* **5**, 250-255.

Hill, E., van der Kaay, J., Downes, C. P. & Smythe, E. (2006). The role of dynamin and its binding partners in coated pit invagination and scission. *J. Cell Biol.* **152**, 309-323.

Hosseini, R., Benton, D. C., Dunn, P. M., Jenkinson, D. H. and Moss, G. W. (2001). SK3 is an important component of K(+) channels mediating the afterhyperpolarization in cultured rat SCG neurones. *J. Physiol.,* **535**, 323–334.

Huttner WB, Schmidt, A. (2000). Lipids, lipid modification and lipid–protein interaction in membrane budding and fission — insights from the roles of endophilin A1 and synaptophysin in synaptic vesicle endocytosis. *Current Opinion in Neurobiology*, **10(5)**, 543-551.

Joiner, W.J, Khanna, R., Schlicher, L.C., and Kaczmarek, L.K. (2001). Calmodulin regulates assembly and trafficking of SK4/IK1 Ca2+-activated K+ channels, J. *Biol. Chem.* **276**, 37980-37985.

Kido, M., Yamanaka, K., Mitani, T., Niki, H., Ogura, T., and Hiraga, S. (1996). RNase E Polypeptides Lacking a Carboxyl-terminal Half Suppress a *mukB* mutation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol. 178*, 3917-3925.

Kohler, M., Hirschberg, B., Bond, C. T., Kinzie, J. M., Marrion, N. V., Maylie, J., Adelman, J. P. (1996). Smallconductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science,* **273**, 1709–1714.

Kuriyan, J., Cowburn, D. (1993). Structures of SH2 and SH3 domains. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**,828-37.

Masuda, M., Takeda, S., Sone, M., Ohki., T., Mori, H., Kamioka, Y., Mochizuki, N. (2006). Endophilin BAR domain drives membrane curvature by two newly identified structure-based mechanisms. *EMBO J* **25,** 2889-2897.

McMahon H.T., Gallop., J.,L. (2005). Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature* **438**, 590-596.

Modregger J., Schmidt A.A., Ritter, B., Huttner W.B., Plomann, M. (2003) Characterization of Endophilin B1b, a Brain-specific Membrane-associated Lysophosphatidic Acid Acyl Transferase with Properties Distinct from Endophilin A1. *J. Biol. Chem.* **278**: 4160-4167.

Musacchio, A., Saraste, M., Wilmanns, M. (1994) High-resolution crystal structures of tyrosine kinase SH3 domains complexed with proline-rich peptides. *Nature Struct. Biol.* **1**,546-51.

Obermair, G.J., Kaufmann, W.A ., Knaus H.G., Flucher, B.E. (2003) The small conductance Ca2+-activated K+ channel SK3 is localized in nerve terminals of excitatory synapses of cultured mouse hippocampal neurons. *Eur. J. Neuroscience* **17**(4),721-31.

Pawson, T. (1995) Protein modules and signalling networks. *Nature (London)* **373,** 573–580.

Pedarzani, P., Kulik, A., Muller, M., Ballanyi, K., Stocker, M., (2000). Molecular determinants of Ca^{2+}- dependant K^{+}-channels in rat dorsal vagal neurones. *J. Physiol. (London)* **527**, 283-290.

Pedarzani P., Mosbacher J., Rivard A., Cingolani L.A., Oliver D., Stocker M., Adelman J.P., Fakler B., 2001, Control of electrical activity in central neurons by modulating the gating of small conductance Ca_{2+}-activated K_{+}channels. *J Biol Chem* **276**, 9762-9769.

Pribnow, D., Johnson-Pais, T., Bond, C. T., Keen, J., Johnson, R. A., Janowsky, A., Silvia, C., Thayer, M., Maylie, J. and Adelman, J. P. (1999). Skeletal muscle and small-conductance calcium-activated potassium channels. *Muscle and Nerve* **22**, 742–750.

Ringstad, N., Gad, H., Low, P., Di Paolo, G., Brodin, L., Shupliakov, O. & De Camilli, P. (1999). Endophilin/SH3p4 is required for the transition from early to late stages in clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis. *Neuron* **24**, 143-154.

Ringstad, N., Nemoto, Y. & De Camilli, P. (1997). The SH3p4/SH3p8/SH3p13 protein family: Binding partners for synaptojanin and dynamin via a Grb2-like Src homology 3 domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 8569-8574.

Ringstad N., Nemoto Y., De Camilli P. (2001). Differential expression of endophilin 1 and 2 dimers at central nervous system synapses. *J. Biol. Chem.* **276,** 40424–40430.

Roncarati, R., Di Chio, M., Sava, A., Terstappen, T.C., Fumagalli, G., (2001). Presynaptic localisation of the small conductance calcium-activated potassium channel SK3 at the neuromuscular junction. *Neuroscience* **104**, 253-262.

Roncarati, R., Decimo, I., Fumagalli, G., (2005). Assembly and trafficking of human small conductance Ca2+-activated K+ channel SK3 are governed by different molecular domains. *Mol. Cell. Neurosci*. **28**, 314– 325.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning - A Laboratory Manual.* 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA, Anhang C1, 10.27-10.37.

Scales S.J., Scheller R.H. (1999). Lipid membranes shape up. *Nature*. **401**,123-124.

Schägger, H. & von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379.

Schmidt A., Wolde M., Thiele C., Fest W., Kratzin H., Podtelejnikow A.V., Witke W., Huttner W.B., Söling H.D. (1999) Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid, *Nature* **401**, 133 – 141.

Shumann S. (1988). Recombination mediated by Vaccinia Virus DNATopoisomerase I in Escherichia coli is sequence specific *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 10104-10108.

Shuman, S. (1994). Novel Approach to Molecular Cloning and Polynucleotide Synthesis Using Vaccinia DNA Topoisomerase. *J. Biol. Chem*. **269**, 32678-326.

Sittler, A., Wälter, S., Wedemeyer, N., Hasenbank, R., Scherzinger, E., Eickhoff, H., Bates, G. P., Lehrach, H. & Wanker, E.E. (1998). SH3GL3 associates with the huntingtin exon 1 protein and promotes the formation of polygln-containing protein aggregates. *Mol. Cell* **2**, 427-436.

Spindler, I. (2003). Identifikation von Interaktionspartnern der Ca^{2+}-aktivierten Kaliumkanäle, *h*SK1 – 3, Med Dissertation, Universität Ulm.

Spindler, I., Wanker, E., Wälter, S., Chandy, K.,G., Grissmer, S., Jäger, H. (2003). Interaction of SH3GL3 with the cytoplasmic N-tail of the small Ca^{2+}-activated K^+ channel, *h*SK3 (KCNN3). *Biophysical Journal*, **84**, 236a.

Spindler, I. (b), Wanker, E., Wälter, S., Chandy, K.,G., Lehmann-Horn, F., Grissmer, S., Jäger, H. (2003). Characterization of the cytoplasmic N-tail of the small Ca^{2+} activated potassium channel. *h*SK3 (2003) *European Journal of Physiology*, Supplement to Vol **443**, 274-275b.

Stocker, M. and Pedarzani, P. (2000). Differential distribution of three Ca2+-activated K+ channel subunits, SK1, SK2, and SK3, in the adult rat central nervous system. *Mol. Cell Neurosci.,* **15**, 476-493.

Sugiura H., Iwata K., Matsuoka M., Hayashi H., Takemiya T., Yasuda S., Ichikawa M., Yamauchi T., Mehlen P., Haga T., Yamagata K. (2004) Inhibitory role of endophilin 3 in receptor-mediated endocytosis. *J. Biol. Chem*. **279**(22), 23343-23348.

Tang, Y., Hu, L.A., Miller, W.E., Ringstad, N., Hall, R.A., Pitcher, J.A., DeCamilli, P. & Lefkowitz, R.J. (1999). Identification of the endophilins (SH3p4/p8/p13) as novel

binding partners for the β1-adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 12559-12564.

Weiner, M. P., Anderson, C., Jerpseth, B., Wells, S., Johnson-Browne, B. *et al.* (1994) *Strategies* **7**(2), 41–43.

Xia, X.M., Fakler, B., Rivard, A., Wayman, G., Johnson-Pais, T., Keen, J.E., Ishii, T., Hirschberg, B., Bond, C.T., Lutsenko, S., Maylie, J. and Adelman, J.P. (1998). Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature,* **395**, 503–507.

Xu D.Q., Thompson J., Cisar, J.O. (2003). Genetic loci for coaggregation receptor polysaccharide biosynthesis in Streptococcus gordonii 38. *J Bacteriol*. **185**(18), 5419-5430.

7 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Grissmer möchte ich für die Überlassung des Themas und die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe danken. Frau Dr. Heike Jäger danke ich für die Betreuung auch unter schwierigen Umständen. Für viele hilfreiche Ratschläge danke ich Drs. Oliver Wittekindt, Tobias Dreker, Eva Frei und Snezana Maljevic.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Lehmann-Horn danke ich für die Unterstützung und die Aufnahme in das Graduiertenkolleg „Diagnostische und Therapeutische Konzepte in der Molekularen Medizin“. Herrn Prof. Dr. Holger Lerche danke ich für die Begutachtung meiner Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Erich Wanker und Frau Dr. Stephanie Wälter danke ich besonders für die zur Verfügung gestellten Antikörper.

Die weiterführenden Experimente wären ohne die Hilfe von Frau PD Dr. Eva Küppers (Bereitstellung von Zellen), und Herrn PD Dr. Werner Melzer und Dr. Daniel Ursu (Zur Verfügungstellung des Konfokalmikroskops) nie möglich gewesen.