Phosphorylierung und Gap Junctions
Charakterisierung der Interaktion von Connexin 43 mit der Ubiquitin-Protein-Ligase Nedd4

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Kerstin Leykauf

aus Bad Tölz

Marburg/Lahn 2004

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am _____ angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. R. Renkawitz-Pohl

Zweitgutachter: Prof. Dr. A. Alonso

Tag der mündlichen Prüfung am _____

Veröffentlichungen

1. **Leykauf, K.**, Dürst, M., and Alonso, A. (2003) Phosphorylation and subcellular distribution of connexin 43 in normal and stressed cells.
   Cell Tissue Res. **311**, 23-30.

2. **Leykauf, K.**, Salek, M., Schlüter, H., Lehmann, W. D., and Alonso, A. (2004) Identification by nano-ESI-MS of membrane proteins differentially expressed in HPV16 E5-transfected human keratinocytes.
   J. Gen. Virol. **85,** 1427-1431

3. Gould, V. E., Mosquera, J. M., **Leykauf, K.**, Gattuso, P., Dürst, M., and Alonso, A. The phosphorylated form of connexin 43 is upregulated in breast hyperplasias and carcinomas and in their neoformed capillaries.
   Hum. Pathol., eingereicht

4. Steinhoff, I., **Leykauf, K.**, Bleyl, U., Dürst, M., and Alonso, A. Phosphorylation of the gap junction protein connexion 43 in CIN lesions and cervical carcinomas.
   Cancer Lett., eingereicht

5. **Leykauf, K.**, Salek, M., Bomke, J., Frech, M., Lehmann, W. D., Dürst, M., and Alonso, A. The WW2 domain of the ubiquitin-protein ligase Nedd4 binds efficiently to the C-Terminus of connexin43.
   J. Biol. Chem., eingereicht

6. **Leykauf, K.**, Dürst, M., and Alonso, A. Centrosomal localization of connexin 43.
   Manuskript in Bearbeitung

Präsentationen der Arbeit auf Kongressen

1. **Leykauf, K.**, Dürst, M., and Alonso, A. (2002) Expression and phosphorylation of connexin 43 in normal and malignized cervical epithelium. (Poster); "20th International Papillomavirus Conference", Paris, Frankreich.

2. **Leykauf, K.,** Salek, M., Lehmann, W. D., Dürst, M., and Alonso, A. (2003) SA226P antibody: a new valuable tool in gap junction research. (Poster); "26. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie", Bonn.

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung 1

2 Einleitung 3

2.1 Rolle von Gap Junctions in der normalen und gestörten Zell-Zell-Kommunikation 3

2.2 Aufbau, Struktur und Funktion von Gap Junctions 4

2.3 Connexine 6

2.3.1 Nomenklatur 6

2.3.2 Membrantopologie und Struktur von Connexinen 7

2.3.3 Phosphorylierung von Connexinen 8

2.3.3.1 Cx43-Phosphorylierung 9

2.3.4 Synthese und Abbau von Connexinen 11

2.4 Degradationssysteme 13

2.4.1 Abbau von Proteinen durch das Lysosom 13

2.4.2 Abbau von Proteinen durch das Ubiquitin-Proteasom-System 14

2.4.3 Ubiquitin-Protein-Ligasen (E3-Enzyme) 16

2.5 Problemstellung 18

3 Material 20

3.1 Geräte 20

3.2 Verbrauchsmaterialien 21

3.3 Kits 22

3.4 Chemikalien und Enzyme 23

3.4.1 Chemikalien 23

3.4.2 Enzyme 23

3.5 Mikroorganismen 23

3.6 Antibiotika 24

3.7 Oligonukleotide 24

3.8 Plasmide 24

3.9 Peptide 26

3.10 Zelllinien 26

3.11 Zellkultur-Medien und –Zusätze 26
3.12 Biochemikalien 27
3.13 Antikörper 27
3.13.1 Erstantikörper 27
3.13.2 Zweitantikörper 28

4 Methoden 29
4.1 Molekularbiologische Methoden 29
4.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien 29
4.1.2 Hydrolytische Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktions-endonukleasen 30
4.1.3 Analytische und präparative Agarosegel-Elektrophorese 30
4.1.4 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen 31
4.1.5 Klonierung von DNA-Fragmenten 32
4.1.5.1 Ligation von DNA-Fragmenten 32
4.1.5.2 Herstellung von elektrokompetenten *E.coli*–Zellen 32
4.1.5.3 Elektroporation von *E.coli*–Zellen und anschließende Selektion 33
4.1.5.4 Stammhaltung 34
4.1.6 Polymerase-Ketten-Reaktion 34
4.2 Zellbiologische Methoden 35
4.2.1 Kultivierung von eukaryontischen Zellen 35
4.2.1.1 Kultivierung von WB-F344 Zellen 36
4.2.1.2 Kultivierung von Hepa1c1c7 WT Zellen 36
4.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen 37
4.2.3 Zellzahlbestimmung 37
4.3 Proteinbiochemische Methoden 38
4.3.1 Herstellung von Zellextrakten 38
4.3.1.1 RIPA-Extrakte 38
4.3.1.2 SDS-Extrakte 39
4.3.1.3 E1A-Extrakte 39
4.3.2 Aufreinigung von Centrosomen 40
4.3.3 Proteinkonzentrationsbestimmung 42
4.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 43
4.3.5 Aufreinigung von Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteinen 46

4.3.6 Pulldown-Analysen 47
4.3.7 Peptid-Interaktionsstudien mittels Surface-Plasmon-Resonance 48
4.4 Immunologische Methoden 51
4.4.1 Western Blot Analyse 51
4.4.1.1 Transfer der Proteine auf eine Membran 51
4.4.1.2 Unspezifisches Anfärben der Proteine durch Ponceau S 52
4.4.1.3 Immunologischer Nachweis von Proteinen 52
4.4.1.4 Entfernen von Antikörpern von einer Membran durch Strippen 53
4.4.2 Indirekte Immunfluoreszenz 53

5 Ergebnisse 55
5.1 Charakterisierung des Antikörpers SA226P 55
5.1.1 Spezifische Erkennung einer phosphorylierten Form von Cx43 durch den Antikörper SA226P 56
5.1.2 Immunlokalisation von Cx43 in WB-F344 Zellen 58
5.1.3 Immunlokalisation von phosphoryliertem Cx43 in EGF-behandelten WB-F344 Zellen 59
5.1.4 Inhibierung der Phosphorylierung von Cx43 in EGF-stimulierten WB-F344 Zellen durch AG1478 und PD98059 61
5.2 Identifikation und Charakterisierung der Interaktion zwischen Cx43 und der Ubiqutin-Protein_Ligase Nedd4 66
5.2.1 Bindung des C-Terminus von Cx43 an Nedd4 66
5.2.2 Bindung der Nedd4 Domänen WW2 und WW3 an Cx43 69
5.2.3 Bindung der WW2-Domäne von Nedd4 an das PY-Motiv von Cx43 72
5.2.4 Kolokalisation von Cx43 und Nedd4 in der Säugerzelllinie Hepa1c1c7 WT 79
5.2.5 Die Ubiquitinierung von Cx43 durch Nedd4 erfolgt nicht an der Plasmamembran 81
5.3 Immunlokalisation von S279/S282-phosphorylierten Cx43-Formen während der Mitose und mögliche Auswirkungen 83
5.3.1 Kolokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 mit Nedd4 und Ubiquitin in mitotischen Zellen 83
5.3.2 Immunlokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 in den Centrosomen von mitotischen WB-F344 Zellen 86

5.3.3 Nachweis der Cx43-Formen P0 und P4 sowie von Nedd4 in den Centrosomen 91

5.4 Phosphorylierung und Proteasom-abhängiger Abbau von Cx43 93

5.4.1 Abbau von Gap Junction Plaque-lokalisiertem, phosphoryliertem Cx43 durch das Proteasom 94

6 Diskussion 97

6.1 Immunlokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 mit Antikörper SA226P 97

6.1.1 SA226P detektiert spezifisch S279/S282-phosphoryliertes Cx43 97

6.1.2 Immunlokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 100

6.2 Nedd4 – die Ubiquitin-Protein-Ligase als neuartiger Interaktionspartner von Cx43 102

6.2.1 *In vitro*-Bindung von Nedd4 an Cx43 über seine WW2- und WW3-Domänen 102

6.2.2 *In vitro*-Bindung der WW2-Domäne von Nedd4 an das PY-Motiv von Cx43 105

6.2.3 Abhängigkeit der Kolokalisation von Cx43 und Nedd4 bzw. Ubiquitin von der Cx43-Phosphorylierung 106

6.3 Die Bedeutung der phosphorylierten Serinreste S279 und S282 von Cx43 für die Zellzyklus-abhängige Steuerung der Gap Junctions 108

6.3.1 Immunlokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 in mitotischen Zellen 108

6.3.2 Mögliche Auswirkungen der S279/S282-Phosphorylierung auf Cx43 während der Mitose 110

6.3.3 Transport des S279/S282-phosphorylierten Cx43 von der Plasmamembran zu den Centrosomen mitotischer Zellen 112

6.4 Rolle des Proteasoms für den Abbau von Cx43 112

6.5 Abbau von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 in den Centrosomen 114

7 Literatur 116

8 Anhang 127

8.1 Abbildungsverzeichnis 127

8.2 Tabellarischer Lebenslauf 129

8.3 Danksagung 130

Abkürzungen

Allgemeine Abkürzungen

α-	Anti-
α-MEM	Minimum Essential Medium Eagle with alpha modification
Abb.	Abbildung
Amp	Ampizillin
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
AS	Aminosäure (n)
ATP	Adenosin-Triphosphat
bp	Basenpaare
bar	Maßeinheit des Drucks
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
bzw.	beziehungsweise
C2	intrazelluläre Schleife von Connexin-Proteinen
C2-Domäne	Domäne von Nedd4, die Ca^{2+}-abhängig an Membranstrukturen bindet
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Cx	Connexin
Cx26	Connexin 26
Cx32	Connexin 32
Cx43	Connexin 43
Cx43-CTer	Aminoterminal biotinyliertes Peptid, das die Aminosäurereste 271-288 des C-Terminus von Cx43 umfasst, wobei die Serinreste S279 und S282 unphosphoryliert vorliegen
$Cx43\text{-}CTer_{phosph.}$	Aminoterminal biotinyliertes Peptid, das die Aminosäurereste 271-288 des C-Terminus von Cx43 umfasst, wobei die Serinreste S279 und S282 phosphoryliert vorliegen
Cx43-CTer-Fwd	Forward-Primer für die PCR des C-Terminus von Cx43
Cx43-CTer-Rev	Reverse-Primer für die PCR des C-Terminus von Cx43
Cx43-NTer	Aminoterminal biotinyliertes Peptid, das die Aminosäurereste 5-22 des N-Terminus von Cx43 umfasst
Cx43-NTer-Fwd	Forward-Primer für die PCR des N-Terminus von Cx43
Cx43-NTer-Rev	Reverse-Primer für die PCR des N-Terminus von Cx43
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

dNTP	Gemisch aus dATP, dCTP, dGTP, dTTP (2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphate)
E1	1. extrazelluläre Schleife von Connexin-Proteinen / Ubiquitin-aktivierendes Enzym
E2	2. extrazelluläre Schleife von Connexin-Proteinen / Ubiquitin-konjugierendes Enzym
E3	Ubiquitin-Protein-Ligase
E6-AP	E6-assoziiertes Protein
EAH-Sepharose	Epoxy-coupled 1,6-Diaminohexane-Sepharose
E.coli	*Escherichia coli*
ECV	endosomale Trägervesikel (endosomal carrier vesicle)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
EGTA	N,N,N',N'-Tetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)
g	Gramm / Maßeinheit der Erdbeschleunigung
GDP	Guanosin-Diphosphat
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-Triphosphat
h	Stunde (n)
$H_2O_{demin.}$	Demineralisiertes Wasser
HECT	Homolog zum E6-AP C-Terminus
HEPES	(N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-2-ethanesulfonic acid)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	Meerrettich-Peroxidase (horseraddish peroxidase)
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
K_D	Dissoziationskonstante
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
KLH	"Keyhole Limpet Hemocyanin" Protein
kV	Kilovolt
LB	Luria-Bertani-Medium / LB-Puffer
M1, M2, M3, M4	1., 2., 3., 4. Transmembrandomäne von Connexin-Proteinen
M	molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
mL	Milliliter

mm^2	Quadratmillimeter
mM	millimolar
msec	Millisekunde (n)
MF	Minifuge 2, Heraeus Christ
min	Minute (n)
MVB	multivesikuläre Körper (multivesicular bodies)
nanoESI-MS	Nanoelectrospray ionization mass spectrometry
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	nanomolar
Nedd4	“Neural precursor cell expressed, developmentally downregulated 4” Protein
NP-40	Nonidet-P40
N-Terminus	Amino-Terminus
NuMA	“Nuclear Mitotic Apparatus“ Protein
OD	Optische Dichte
P0-P4	Phosphorylierungsformen 0-4
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBS-T	Phosphate Buffered Saline mit 0,1 % Tween®20
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PIPES	N-(2-hydroxyethyl)-Piperazine-N’-2-Ethane-Sulfonic Acid
pg	Pikogramm
pmol	Pikomol
PVDF	Polyvinylidene-Fluoride
PY-Motiv	xPPxY-Motiv
RING	Really Interesting New Gene
RNA	Ribonukleinsäure
rNedd4	“Neural precursor cell expressed, developmentally downregulated 4” Protein der Ratte
RT	Raumtemperatur
RU	Resonanz Einheit (en)
sec	Sekunde (n)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
S-Phase	Synthese-Phase des Zellzyklus
SPR	Surface Plasmon Resonance
Tab.	Tabelle
TEMED	(N,N,N’,N’-Tetramethylethylendiamin)
Tris	(2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol)
TZ	Tischzentrifuge 5417R, Eppendorf
U	Unit (s)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System

UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifuge TL-100, Beckman
V	Stromspannung gemessen in Volt
(w/v)	Gewicht/Volumen
(w/w)	Gewicht/Gewicht
WW-Domäne	Protein-Protein-Interaktions-Domäne von Nedd4
z.B.	Zum Beispiel
ZO-1	“Zonula Occludens 1” Protein
ZO-2	“Zonula Occludens 2” Protein
ZZ	Zellkultur-Zentrifuge 03400, Heraeus Christ
µF	Mikrofarad
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	mikromolar
Ω	Stromstärke gemessen in Ohm
°C	Grad Celsius

Abkürzungen in der Signaltransduktion

CK1	Casein Kinase 1
c-Src	Cellular Sarcoma
ERK1/2	Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2
ERK5	Extracellular Signal-regulated Kinase 5
Grb2	Growth Factor Receptor-bound Protein 2
MAP Kinase	Mitogen-activated Protein Kinase
MEK1	Mitogen-activated Protein Kinase/ERK1/2 Kinase
MEK5	Mitogen-activated Protein Kinase/ERK5 Kinase
MEKK2	Mitogen-activated Protein Kinase/ERK5 Kinase Kinase
p34	$p34^{cdc2}$/Cyclin B Kinase
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
SH2-Domäne	Src-Homologie 2-Domäne
SH3-Domäne	Src-Homologie 3-Domäne
SOS	“Son Of Sevenless” Protein
v-Src	Viral Sarcoma ($pp60^{src}$ Kinase)

1 Zusammenfassung

Das Gap Junction Protein Connexin 43 (Cx43) ist ein integrales Membranprotein mit einer sehr kurzen Halbwertszeit, dessen Abbau am Lysosom sowie am Proteasom erfolgt. Die Funktion von Cx43 wird über posttranslationale Modifikationen wie Ubiquitinierung und Phosphorylierung reguliert. Die Phosphorylierung des Proteins durch verschiedene Kinasen kann sich dabei positiv, aber auch negativ auf die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions auswirken. So ist z.B. die Phosphorylierung von Cx43 an den Serinresten S279 und S282 ausreichend, um eine Zell-Zell-Kommunikation zu inhibieren.

Um die Auswirkungen einer S279/S282-Phosphorylierung von Cx43 näher zu untersuchen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit der polyklonale Antikörper SA226P entwickelt und hergestellt. SA226P ist gegen ein Peptid gerichtet, das die beiden Serinreste S279 und S282 aus dem zytoplasmatischen Carboxy-Terminus (C-Terminus) von Cx43 in phosphorylierter Form enthält. In der indirekten Immunfluoreszenz unbehandelter Zellen wurde mit dem Antikörper SA226P eine schwache Färbung in den Zellkernen detektiert, die auf die Anwesenheit von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 hinweist. Dagegen war eine durch den epidermalen Wachstumsfaktor bedingte S279/S282-Phosphorylierung stets an die Lokalisation von Cx43 in den Gap Junction Plaques gekoppelt.

In Untersuchungen zu möglichen Bindungspartnern von Cx43 konnte die Ubiquitin-Protein-Ligase „neural precursor cell expressed, developmentally downregulated 4“ (Nedd4) als neuer Interaktionspartner identifiziert werden. Durch Pulldown-Analysen mit Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteinen der drei Protein-Protein-Interaktions-Domänen (WW1, WW2 und WW3) von Nedd4 wurde nachgewiesen, dass WW2 und WW3, nicht aber WW1 an den C-Terminus von Cx43 binden. Dass die WW2-Domäne spezifisch, aber in einer phosphorylierungsunabhängigen Weise an das PY-Motiv von Cx43 bindet, wurde mittels „Surface Plasmon Resonance“-Analysen gezeigt. Die Bindung der WW3-Domäne an andere Motive des C-Terminus von Cx43 scheint dagegen durch den Phosphorylierungsstatus von Cx43 reguliert zu werden. Diese zunächst *in vitro* gezeigte Interaktion von Cx43 und Nedd4, wurde *in vivo* in der indirekten Doppelimmunfluoreszenz durch eine Kolokalisation von Cx43 und Nedd4 in den multivesikulären Körpern bestätigt.

Anhand der Ergebnisse mit Antikörper SA226P konnte gezeigt werden, dass die S279/S282-Phosphorylierung von Cx43 während der Mitose eine bedeutende Rolle spielt. So konnte eine Kolokalisation speziell von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 mit Nedd4 und Ubiquitin in den Centrosomen von mitotischen Zellen nachgewiesen werden. Zudem wurden in mitotischen Zellen die Cx43-Proteine, die sich in Gap Junction Plaques an der Plasmamembran befanden, neben anderen Aminosäureresten in großem Maße an den beiden Serinresten S279 und S282 phosphoryliert. Es ist daher anzunehmen, dass die Phosphorylierung der beiden Serinreste S279 und S282 während der Mitose als eine Art Transportsignal fungiert, das zur gezielten Ubiquitinierung von Cx43 durch Nedd4 in den Centrosomen beiträgt.

Experimente mit dem Proteasom-Inhibitor Lactacystin ergaben, dass ausschließlich phosphorylierte, und vor allem S279/S282-phosphorylierte Formen von Cx43, die in Gap Junction Plaques an der Plasmamembran lokalisiert sind, am Proteasom abgebaut werden. Damit weisen auch diese Ergebnisse darauf hin, dass eine bestimmte Hyperphosphorylierung von Cx43, die die beiden Serinreste S279 und S282 einschließt, zu einer Internalisierung der Gap Junction Kanäle führt, um am Proteasom abgebaut zu werden.

2 Einleitung

2.1 Rolle von Gap Junctions in der normalen und gestörten Zell-Zell-Kommunikation

Eine grundlegende Voraussetzung für die koordinierte Funktion von Organen ist die interzelluläre Kommunikation von Zellverbänden. Dieses gewährleistet eine zielgerichtete Abstimmung zellulärer Interaktionen in einem multizellulären Organismus und bedingt letztendlich den Unterschied eines funktionsfähigen Organs zu einer bloßen Ansammlung von Einzelzellen.

Zur Aufrechterhaltung der Homöostase und zur Anpassung des Körpers auf sich ständig ändernde Umweltbedingungen bedient sich der Organismus verschiedener Methoden, um die Kommunikation zwischen den einzelnen Organen, Geweben und Zellen sicherzustellen. Über größere Distanzen erfolgt Kommunikation durch neuronale und endokrine Mechanismen (Neurotransmitter, Hormone, Mediatoren), dagegen wird sie über kurze Entfernungen durch auto- sowie parakrine Signale mittels Wachstumsfaktoren realisiert. Während diese beiden Arten der Kommunikation indirekt sind, erfolgt die direkte Kommunikation von benachbarten Zellen über Gap Junctions.

Gap Junctions sind membrangebundene Proteinstrukturen, welche die Zytoplasmata zweier benachbarter Zellen verbinden und dadurch einen direkten Austausch von chemischen oder elektrischen Signalen ermöglichen. Man findet Gap Junctions bei nahezu allen Säugetieren und in vielen Geweben in großer Zahl. Abgesehen von Blutzellen und Skelettmuskelzellen kommunizieren alle bislang untersuchten Körperzellen über diese Zell-Zell-Kanäle (Bruzzone *et al.*, 1996; Kumar und Gilula, 1996). Es sind jedoch nur Zellen in funktionellen Einheiten, wie sie in Organen und Geweben vorkommen, durch derartige Kanäle miteinander verbunden. So werden beispielsweise vor Beginn der Geburtswehen vermehrt Gap Junction Kanäle in der Uterusmuskulatur etabliert. Das elektrische Signal zu ihrer synchronen Kontraktion während der Wehen kann daher ungehindert und verzögerungsfrei von Zelle zu Zelle weitergeleitet werden (Miller *et al.*, 1989). Auch Aktionspotentiale, die die Kontraktionen des Herzmuskels auslösen, breiten sich über Gap Junction Kanäle der Herzmuskelzellen aus (Page und Shibata, 1981;

Spray und Burt, 1990; De Mello, 1994). Gap Junctions spielen zudem eine bedeutende Rolle bei der Kontrolle der Proliferation und der Zelldifferenzierung (Guthrie und Gilula, 1989; Yamasaki, 1990; Loewenstein und Rose, 1992; Holtz-Wagenblatt und Shalloway, 1993).

Veränderungen in der Expression und der Funktion von Gap Junctions sind mit zahlreichen Erkrankungen assoziiert (Willecke *et al.*, 2002), wie zum Beispiel (z.B.) der vererbten Taubheit (Kelsell *et al.*, 1997; Zelante *et al.*, 1997), der Augenkrankheit „Grauer Star“ (Shiels *et al.*, 1998), Erythrokeratoderma, einer krankhaften Hautverhornung (Richard *et al.*, 1997), einigen Formen von Nervenkrankheiten (Bergoffen *et al.*, 1993) oder Herzkrankheiten (Britz-Cunningham *et al.*, 1995). In vielen Tumorzellen und Zellen, die mit unterschiedlichen Karzinogenen behandelt wurden, wurde ein Verlust der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions nachgewiesen. Daher wird der Verlust der Funktion von Gap Junctions auch im Mehrstufenprozess der Karzinogenese diskutiert (Yamasaki, 1990; Mesnil und Yamasaki, 1993; Kurata und Lau, 1994; Matesic *et al.*, 1994; Yamasaki und Naus, 1996; Hanna *et al.*, 1999; Yamasaki *et al.*, 1999).

2.2. Aufbau, Struktur und Funktion von Gap Junctions

Gap Junction Kanäle gehören strukturell und funktionell zur Klasse der Ionenkanäle und setzen sich jeweils aus zwei „Halbkanälen“, Connexone genannt, zusammen. Dabei ist jedes Connexon aus sechs gleichwertigen Protein-Untereinheiten, den Connexinen, aufgebaut, die eine ringförmige Struktur mit einer zentralen Pore ausbilden (Musil und Goodenough, 1993; Cascio *et al.*, 1995; Falk *et al.*, 1997; Unger *et al.*, 1999). Die beiden Connexone eines Gap Junction Kanals bilden über den extrazellulären Spalt hinweg eine Kopf-an-Kopf Verbindung, wobei jede der beteiligten Zellen ein Connexon beisteuert. Auf diese Weise entsteht ein wassergefüllter Kanal zwischen den Zytoplasmata zweier kontaktierender Zellen, der gegenüber dem extrazellulären Raum absolut dicht ist (Goodenough *et al.*, 1996; Unger *et al.*, 1999). Dieses ermöglicht den Zellen einen passiven interzellulären Austausch von Ionen (z.B. Calciumionen), aber auch von hydrophilen Molekülen mit einem Molekulargewicht bis ca. 1000 Dalton

(z.B. second messenger wie das zyklische Adenosin-Monophosphat und Inositol-Triphosphat). Zudem wird der interzelluläre Transport von Metaboliten wie Aminosäuren, Nukleotiden und Glukose über derartige Kanäle gesteuert (Loewenstein, 1979; Schwarzmann *et al.*, 1981; Veenstra, 1996).

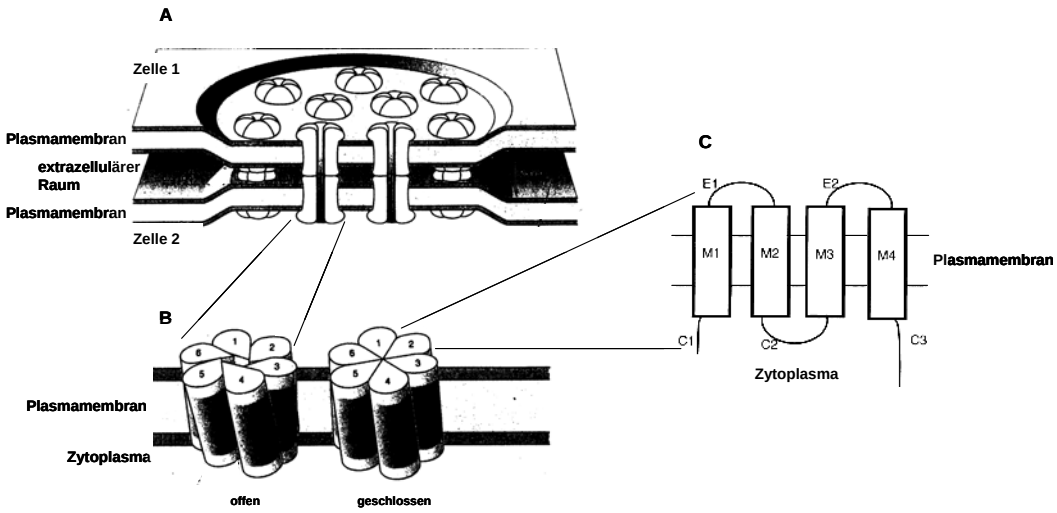


Abb. 2.1: Dreidimensionales Modell von Gap Junction Kanälen. (A) Beide Nachbarzellen stellen ein Connexon zu Verfügung, um über den extrazellulären Raum hinweg einen durchgängigen Gap Junction Kanal zu bilden. Eine Ansammlung von Gap Junction Kanälen wird als Gap Junction Plaque bezeichnet (Makowski *et al.*, 1977). **(B)** Modell eines einzelnen Connexons. Ein Connexon ist aus sechs Connexin-Untereinheiten aufgebaut. Ein Schließen der Connexone wird erreicht, indem sich die sechs Untereinheiten gegeneinander verschieben. Die dunklen Bereiche stellen den Bereich des Connexons dar, der in die Plasmamembran eingebettet ist (Unwin und Zampighi, 1980). **(C)** Topologisches Modell eines Connexins. Die Zylinder stellen die Transmembrandomänen (M1-M4) dar. Die Schleifen zwischen der ersten und zweiten beziehungsweise (bzw.) der dritten und vierten Transmembrandomäne liegen extrazellulär (E1 und E2). Der Amino- und der Carboxy-Terminus sowie die Schleifen zwischen der zweiten und der dritten Transmembrandomäne liegen intrazellulär (C1, C3 bzw. C2). (modifiziert nach Bruzzone *et al.*, 1996)

Das Öffnen und Schließen der Gap Junction Kanäle kann durch physiologische Parameter, wie dem zellulären pH-Wert oder der Ca^{2+}-Konzentration, aber auch durch pharmakologische Agenzien modifiziert werden (Turin und Warner, 1977; Loewenstein, 1981; Spray und Bennett, 1985; Mehta *et al.*, 1986; Oh *et al.*, 1991; Reynhout *et al.*, 1992; Berthoud *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1993; Morley *et al.*, 1996). Über Gap Junctions gekoppelte Zellen regulieren und koordinieren auf diese Weise den Stoffwechsel, was besonders bei der Wachstumskontrolle eine wichtige Rolle zu spielen scheint (Loewenstein, 1979; Yamasaki und Naus, 1996).

2.3 Connexine

Connexine, die Bausteine der Gap Junction Kanäle, gehören zu einer Multigenfamilie von Proteinen mit sehr ähnlicher Struktur und Membrantopologie (Willecke *et al.*, 1991; Bruzzone *et al.*, 1996; Goodenough *et al.*, 1996). Beim Menschen wurden mittlerweile 20 verschiedene Connexin-Proteine beschrieben, die eine Größe zwischen 25 und 62 Kilodalton (kD) besitzen und Kanäle mit speziellen funktionellen Eigenschaften bilden (Willecke *et al.*, 2002). Dabei beziehen sich die Unterschiede der verschiedenen Kanäle auf die Größe und die Ladung der Moleküle und Ionen, die den Kanal passieren können (Goodenough *et al.*, 1996; Kumar und Gilula, 1996; Veenstra, 1996).

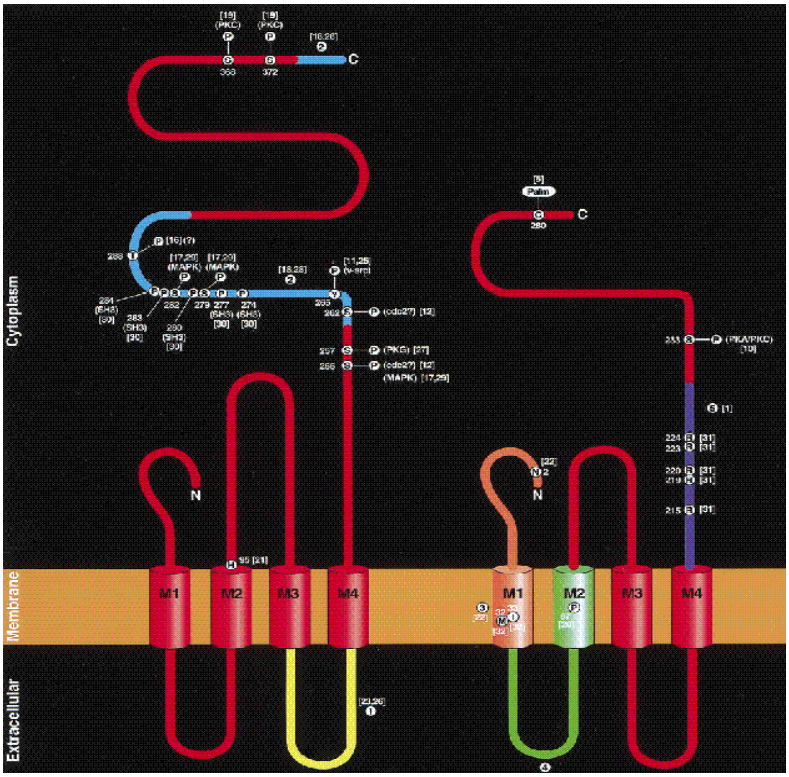
2.3.1 Nomenklatur

Für die Nomenklatur von Connexinen existieren zur Zeit noch zwei verschiedene Systeme. Im ersten System werden die Connexine aufgrund von Kriterien wie Homologie und Länge der zytoplasmatischen Schleife in drei Subgruppen unterteilt (α-Connexine, β-Connexine und γ-Connexine) (Kumar und Gilula, 1996). Diese Einteilung in Unterfamilien beruht vorwiegend auf Unterschieden in der Struktur der Connexine und reflektiert nach neueren Erkenntnissen nicht die Phylogenie dieser Proteine (Eiberger *et al.*, 2001; Harris, 2001).

Das zweite und wesentlich weiter verbreitete Nomenklatursystem von Connexinen ist das molekulargewichtsbasierte System (Goodenough *et al.*, 1996). Hier werden Connexine durch die Abkürzung „Cx“ mit einer unmittelbar angehängten zweistelligen Zahl bezeichnet, die sich aus der relativen Molekülmasse in kD ergibt. Cx43 steht z.B. für das Connexin mit dem Molekulargewicht 43 kD.

2.3.2 Membrantopologie und Struktur von Connexinen

Unter den verschiedenen Connexinen gibt es eine große Homologie. Aufgrund der Sequenzdaten und Antikörperbindungsstudien nimmt man für die Membrantopologie von Connexinen generell eine Tetra-Helix-Struktur an. Die vier α-helikalen Transmembrandomänen (M1-M4) werden dabei durch zwei extrazelluläre Schleifen (E1 und E2) und eine intrazelluläre Schleife (C2) verbunden, wobei der Amino-Terminus (N-Terminus) und der Carboxy-Terminus (C-Terminus) auf der zytoplasmatischen Seite lokalisiert sind (Goodenough *et al.*, 1996; Kumar und Gilula, 1996; Yeager, 1998; Evans *et al.*, 2000). Die Aminosäuresequenzen der vier Transmembranbereiche und der extrazellulären Schleifen sind unter den verschiedenen Connexinen hoch konserviert. Dagegen stellen die intrazelluläre Schleife und der C-Terminus die variablen Regionen des Proteins dar. Abbildung (Abb.) 2.2 zeigt die schematische Darstellung von zwei verschiedenen Connexinen, in der die Variabilität der Länge des C-Terminus deutlich wird.



Cx43 **Cx32**

Abb. 2.2: Variabilität der Connexine in der Länge ihres C-Terminus. Verschiedene Connexine sind untereinander sehr homolog. Alle Connexine besitzen vier Transmembrandomänen, wobei der N- und der C-Terminus intrazellulär lokalisiert sind. Während die extrazellulären Schleifen und die vier Transmembrandomänen hoch konserviert sind, unterscheiden sich die intrazellulären Schleifen und die C-Termini sowohl in der Länge als auch in der Aminosäurenzusammensetzung. Im Wesentlichen entscheidet die Länge des C-Terminus eines Connexins über die Unterschiede in der Größe zwischen verschiedenen Connexinen. (aus Yeager, 1998)

2.3.3 Phosphorylierung von Connexinen

Gap Junction Kanäle sind dynamische Strukturen mit schnellen Umsetzungsraten. Im Gegensatz zu anderen integralen Membranproteinen besitzt z.B. Cx43 eine Halbwertszeit von 1-5 Stunden in Kulturzellen (Traub *et al.*, 1989; Musil *et al.*, 1990; Laird *et al.*, 1991), in Organen (Beardslee *et al.*, 1998), aber auch in lebenden Tieren (Fallon und Goodenough, 1981). Eine derartig schnelle Umsetzungsrate der Connexine erfordert zusätzlich zur Regulation der Connexin-Synthese durch die Kontrolle der Transkription auch andere, wesentlich schnellere Regulations-mechanismen für die Zell-Zell-Kommunikation über Gap Junction Kanäle. Posttranslationale Modifikationen wie die Ubiquitinierung oder die Phosphorylierung der Connexin-Proteine stellen mögliche Regulationsmechanismen dar.

Die häufigste posttranslationale Modifikation der Connexine ist die Phosphorylierung von Serin- und Tyrosinresten durch verschiedene Proteinkinasen (Lampe und Lau, 2004). Nahezu alle Connexine werden durch Kinasen modifiziert, wobei sie hauptsächlich an ihren zytoplasmatischen C-Termini phosphoryliert werden. Eine Phosphorylierung von Aminosäuren am N-Terminus ist bislang nicht bekannt (Lampe und Lau, 2004).

Connexin26 (Cx26) ist das einzige Connexin, das nicht phosphoryliert wird (Traub *et al.*, 1989). Das liegt vermutlich daran, dass Cx26 das kleinste Connexin darstellt und der C-Terminus nur wenige Aminosäuren umfasst. Da aus Cx26 jedoch voll funktionsfähige Gap Junction Kanäle gebildet werden können, scheint eine Phosphorylierung der Connexine für die Bildung der Gap Junction Kanäle nicht essenziell zu sein. Vielmehr geht man davon aus, dass die verschiedenen Phosphorylierungen zu einer Feinjustierung der Regulation von Gap Junction Kanälen beitragen, um damit eine Anpassung der Zelle an sich verändernde Bedingungen zu gewährleisten. Betroffen sind davon der Transport der Connexone an die Plasmamembran, der Auf- und Abbau der Gap Junction Kanäle, das Öffnen und Schließen der Kanäle, sowie die Degradation des Connexin-Proteins (Lampe und Lau, 2004).

2.3.3.1 Cx43-Phosphorylierung

Da Cx43 in den meisten Geweben und Zelllinien exprimiert wird, ist das Wissen über die Phosphorylierung dieses Proteins im Vergleich zu anderen Connexinen am größten. In Western Blot Analysen mit Antikörpern gegen Cx43 zeigt sich phosphoryliertes Cx43 stets durch eine Veränderung des Laufverhaltens, wobei das Protein meist durch die drei Phosphorylierungsformen 0, 1 und 2 (P0-Form, P1-Form und P2-Form) repräsentiert wird. Während die am schnellsten laufende P0-Form dem unphosphorylierten Cx43 entspricht, stellen die P1- und die P2-Formen phosphorylierte Formen von Cx43 dar (Musil und Goodenough, 1991; Matesic *et al.*, 1994).

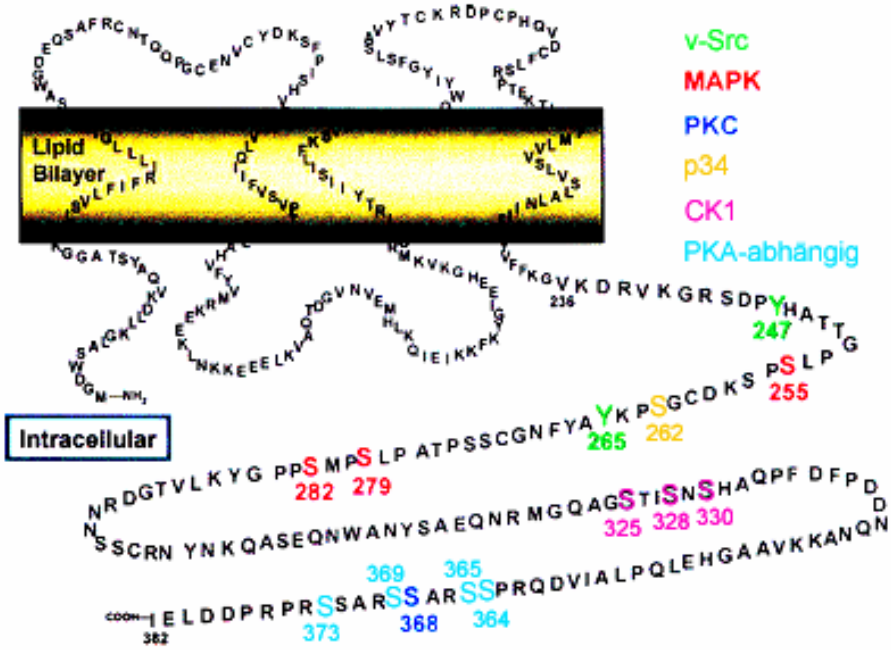


Abb. 2.3: Phosphorylierungsstellen in Cx43. Aminosäuren, die durch bekannte Kinasen phosphoryliert werden, sind in verschiedenen Farben dargestellt (v-Src, grün; MAP Kinase, rot; PKC, blau; p34, gelb; CK1, pink; PKA-abhängig, hellblau). (aus Lampe und Lau, 2004)

An der Phosphorylierung von zwölf Serinresten und zwei Tyrosinresten im C-Terminus von Cx43 sind unterschiedliche Kinasen beteiligt. Dazu zählen die Protein Kinase A (PKA) (Warn-Cramer *et al.*, 1996; TenBroek *et al.*, 2001; Shah *et al.*, 2002; Yogo *et al.*, 2002), die Protein Kinase C (PKC) (Lampe *et al.*, 2000), die $p34^{cdc2}$/Cyclin B Kinase (p34) (Warn-Cramer *et al.*, 1996; Kanemitsu *et al.*, 1998; Lampe *et al.*, 1998), die Casein Kinase 1 (CK1) (Cooper und Lampe, 2002),

die Mitogen-activated Protein Kinase (MAP Kinase) (Warn-Cramer *et al.*, 1996; Kanemitsu *et al.*, 1998; Lampe *et al.*, 1998) und die $pp60^{src}$ Kinase (v-Src) (Lin *et al.*, 2001). Nach heutigem Wissensstand scheint die Phosphorylierung von Cx43 die zelluläre Kommunikation über die Gap Junction Kanäle sowohl positiv als auch negativ zu beeinflussen. Die Kinasen PKA und CK1 sind für eine positive Regulation der Kommunikation verantwortlich, dagegen führen die aktivierten Kinasen v-Src, PKC, p34 und die MAP Kinasen zu einem Verlust der Gap Junction Kommunikation (Lampe und Lau, 2004). In Abb. 2.4 sollen die möglichen Angriffspunkte der Kinasen verdeutlicht werden.

Die aktivierten MAP Kinasen phosphorylieren Cx43 an den drei Serinresten S255, S279 und S282 und bewirken damit einen schnellen, aber transienten Verlust der interzellulären Kommunikation (Warn-Cramer *et al.*, 1996, 1998). Da die MAP Kinasen das vom epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) -Rezeptor ausgehende Signal weiterleiten, führt letztendlich jede Aktivierung des EGF-Rezeptors, z.B. hervorgerufen durch Liganden wie EGF, zur Phosphorylierung von Cx43 an diesen drei Serinresten (Lau *et al.*, 1992). Die beiden Signaltransduktionswege vom aktivierten EGF-Rezeptor bis zur Phosphorylierung von Cx43 sind bereits bekannt. Eine Bindung von EGF an den Rezeptor führt stets zu einer Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors (Honegger *et al.*, 1988; Carpenter und Wahl, 1990). Dieses bewirkt die Aktivierung des Ras/Raf/MEK1/ERK1/2- (Schlessinger, 2000) und/oder des c-Src/MEKK2/MEK5/ERK5-Signaltransduktionsweges (Sun *et al.*, 2003). Während die „extracellular signal-regulated kinase ½“ (ERK1/2) Cx43 hauptsächlich an den Serinresten S279, S282 phosphoryliert, scheint einzig der Serinrest S255 auch durch die „extracellular signal-regulated kinase 5“ (ERK5) phosphoryliert zu werden (Cameron *et al.*, 2003). Ob die MAP Kinasen ERK1/2 und ERK5 Cx43 unter verschiedenen Bedingungen oder in unterschiedlichen Zelllinien phosphorylieren, ist noch ungeklärt.
Neben ERK1/2 und ERK5 ist mit p34 eine weitere Kinase für die Phosphorylierung des Serinrestes S255 verantwortlich (Kanemitsu *et al.*, 1998; Lampe *et al.*, 1998). Die Phosphorylierung von Cx43 durch p34 beschränkt sich jedoch auf mitotische Zellen, führt aber durch die Verlagerung der Cx43-Proteine von der

Plasmamembran ins Zytoplasma ebenfalls zu einer verminderten Zell-Zell-Kommunikation (Xie *et al.*, 1997; Lampe *et al.*, 1998).
Der Serinrest S255 ist ein Beispiel dafür, dass Cx43 regulatorisch wichtige Aminosäurereste enthält, die durch unterschiedliche Kinasen und durch die Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege phosphoryliert werden können. Zudem wird anhand dieses Beispiels deutlich, dass sich die Phosphorylierungen von Cx43 nicht nur auf das Protein selbst auswirken, sondern auch eine wichtige Rolle im Zellzyklus und dadurch auch in der Gewebehomöostase spielen. Für das Durchlaufen des Zellzyklus sind transiente Veränderungen in der Zell-Zell-Kommunikation über Gap Junctions notwendig. Diese Veränderungen werden vermutlich durch bestimmte Cx43-Phosphorylierungen reguliert, da eine Phosphorylierung unterschiedlicher Serinreste zum Verlust der interzellulären Kommunikation während verschiedener Phasen des Zellzyklus führt (Kanemitsu *et al.*, 1998; Lampe *et al.*, 1998; Bittman und LoTurco, 1999).

2.3.4 Synthese und Abbau von Connexinen

Die Connexin-Polypeptide werden im endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und sofort nach der Synthese in Hexamere gruppiert, wobei die Oligomerisierung zu Connexonen entweder noch im ER oder aber im trans-Golgi-Apparat stattfindet (Musil und Goodenough, 1993; Falk *et al.*, 1997; Ahmad *et al.*, 1999). Im trans-Golgi-Kompartiment werden die Connexone in Transportvesikel verpackt und entlang der Mikrotubuli zur Plasmamembran transportiert (Lauf *et al.*, 2002). Über eine Vesikelfusion gelangen die Connexone in die Plasmamembran und bilden dort zunächst einen Pool von frei diffundierenden Connexonen (Zhang *et al.*, 1991; Storrie *et al.*, 1994; Cole *et al.*, 1996; Ellenberg *et al.*, 1997). Sobald die Connexone in einen Gap Junction Plaque einwandern, können sie mit Connexonen der benachbarten Zelle interagieren und Gap Junction Kanäle bilden. Die Interaktion der gegenüberliegenden Connexone wird dabei von den extrazellulären Schleifen gewährleistet (Perkins *et al.*, 1998; Unger *et al.*, 1999). Einzelne Kanäle aggregieren schließlich zu Gap Junction Plaques, die bis zu einige tausend Gap Junction Kanäle beinhalten können (McNutt und Weinstein, 1970; Forge *et al.*, 2003). Unter physiologischen Bedingungen können

Gap Junction Kanäle nicht mehr in die einzelnen Connexone zerlegt werden (Goshroy *et al.*, 1995). Der Abbau des gesamten Gap Junction Plaques erfolgt daher über sogenannte „Annular Gap Junctions“. Man geht davon aus, dass sich die Gap Junction Kanäle-enthaltenden Membranen in eine der beiden Zellen einstülpen und dadurch Vesikel mit einer Doppelmembran ins Zytoplasma abgeschnürt werden, um entweder wiederverwendet oder abgebaut zu werden (Larsen *et al.*, 1979, 1981; Mazet *et al.*, 1985; Naus *et al.*, 1993; Laird, 1996; Jordan *et al.*, 2001; Gaietta *et al.*, 2002). In Abb. 2.4 sind die einzelnen Schritte des Auf- und Abbaus von Gap Junction Kanälen schematisch dargestellt.

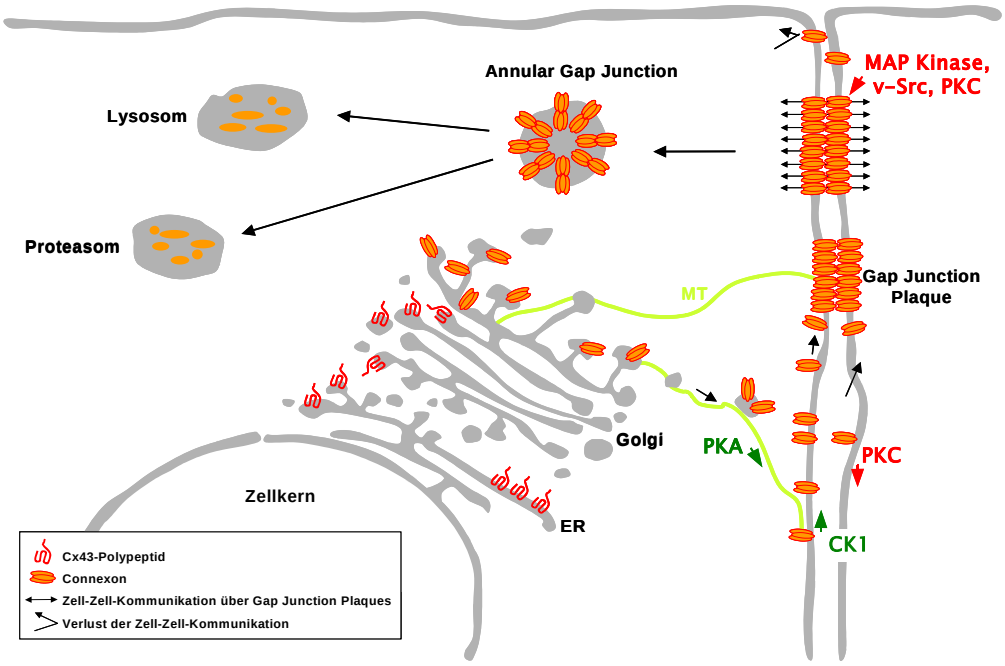


Abb. 2.4: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte, die zum Auf- und Abbau von Cx43-haltigen Gap Junction Kanälen führen. Zudem sind die möglichen Angriffsstellen der verschiedenen Proteinkinasen dargestellt. Kinasen, die zu einer erhöhten Zell-Zell-Kommunikation führen, sind grün markiert, während Kinasen, die sich inhibierend auswirken, in rot gekennzeichnet sind. PKA könnte die Kommunikation durch einen verstärkten Transport der Connexone an die Plasamamembran und durch einen gesteigerten Aufbau der Kanäle stimulieren. Unter basalen Bedingungen könnte CK1 für den Aufbau der Kanäle verantwortlich sein. PKC wirkt sich vermutlich inhibierend auf den Aufbau bzw. ein Öffnen und Schließen der Kanäle aus, was zu einem Verlust der Gap Junction Kommunikation führt. V-Src und die MAP Kinasen scheinen für ein Schließen der Kanäle verantwortlich zu sein. (modifiziert nach Segretain und Falk, 2004)

Als Abbauweg für internalisierte Vesikel wird der lysosomale Abbau (Larsen und Hai, 1978; Laing *et al.*, 1997; Musil *et al.*, 2000; Qin *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2003), aber auch ein Abbau über das Ubiquitin-Proteasom-System (Laing und Beyer, 1995; Laing *et al.*, 1997; Musil *et al.*, 2000; Rutz und Hulser, 2001; Qin *et al.*, 2003; Leithe und Rivedal, 2004) diskutiert.

2.4 Degradationssysteme

Der klassische Abbau von zellulären Proteinen erfolgt über das Lysosom. In diesem zum sekretorischen System gehörenden Kompartiment werden Proteine durch verschiedene Proteasen und Peptidasen gespalten und abgebaut (Knop *et al.*, 1993). Diese lysosomale Proteolyse ermöglicht die Rückgewinnung von Aminosäuren beziehungsweise die Energiegewinnung unter Hungerbedingungen. Der Abbau von zellulären Proteinen spielt aber auch eine entscheidende Rolle in der zellulären Regulation. Neben der Transkriptionskontrolle und den posttranslationalen Proteinmodifikationen ist die Degradation von Proteinen ein wichtiges Instrument zur schnellen und spezifischen Inaktivierung von Proteinen als Antwort auf veränderte Umgebungsbedingungen oder zur Steuerung zellulärer Prozesse, wie z.B. während der Mitose (Heinemeyer *et al.*, 1991). Dieser hochspezifische Abbau von Proteinen wird durch das Ubiquitin-Proteasom-System realisiert.

2.4.1 Abbau von Proteinen durch das Lysosom

Integrale Membranproteine, die über das lysosomale System abgebaut werden, gelangen zunächst über die Endozytose in die frühen Endosomen. Der Transport von den frühen zu den späten Endosomen wird von endosomalen Trägervesikeln („endosomal carrier vesicles“, ECV) vermittelt, die große Mengen an internalen Vesikeln enthalten und deshalb auch als multivesikuläre Körper („multivesicular bodies“, MVB) bezeichnet werden. Einzelne Vesikel eines MVB, in denen sich die abzubauenden Proteine ansammeln, entstehen durch die Einstülpung der endosomalen Membran in das Lumen der frühen Endosomen. Für das Eindringen der abzubauenden Transmembranproteine in die MVB ist eine Ubiquitinierung essenziell (Katzmann *et al.*, 2001, 2002). MVB reifen zu späten Endosomen heran und verschmelzen schließlich mit dem Lysosom, in dem der Proteinabbau stattfindet (Futter *et al.*, 1996). Neben integralen Membranproteinen bauen die Lysosomen auch extrazelluläre Proteine und Pathogene, die in die Zelle eingedrungen sind, ab. Proteasen, Glykosidasen, Nukleasen, Lipasen, Phosphatasen und Lysozym prozessieren dabei alle in die Lysosomen

eindringenden Stoffe (Axline, 1970; Morton, 1976; Rojas-Espinosa *et al.*, 1982; Knop *et al.*, 1993; Hunzicker und Geuze, 1996). Lange Zeit wurde die Hypothese favorisiert, dass ausschließlich das Lysosom für die Umsetzungsrate der Proteine verantwortlich ist. Erst später erkannte man, dass die meisten Proteine über ein anderes, hochspezifisches System, das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS), abgebaut werden.

2.4.2 Abbau von Proteinen durch das Ubiquitin-Proteasom-System

Das UPS, das im Zytoplasma, am ER und im Zellkern lokalisiert ist, ist verantwortlich für die Degradation eines Großteils der zytosolischen und nukleären Proteine. Aber auch falsch gefaltete, fehlerhaft zusammengesetzte Proteine und integrale Membranproteine werden vom UPS erkannt und abgebaut (Rivett *et al.*, 1992; Rubin und Finley, 1995; Palmer *et al.*, 1996; Reits *et al.*, 1997; Enenkel *et al.*, 1998; Wilkinson *et al.*, 1998; Ulrich, 2002). Nach neuesten Erkenntnissen existiert ein aktives 26S-Proteasom auch in den Centrosomen (Wigley *et al.*, 1999; Fabunmi *et al.*, 2000).
Der Abbau von Proteinen durch das UPS erfordert zwei aufeinanderfolgende Schritte:

1. Die Markierung des Substrats durch Anhängen von einem oder mehreren Ubiquitinresten
2. Die Degradation des markierten Proteins durch das 26S-Proteasom unter Freisetzung von wiederverwertbarem Ubiquitin

Wie in Abb. 2.5 dargestellt, ist die Konjugation des hoch konservierten, 76 Aminosäuren langen Ubiquitins an das Substrat abhängig von Adenosin-Triphosphat (ATP) und wird in drei Schritten durchgeführt. Im ersten, ATP-verbrauchenden Schritt, wird ein Ubiquitinmolekül über seinen C-terminalen Glycinrest auf das sogenannte Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1) übertragen. Dabei entsteht eine energiereiche Thioesterbindung zwischen dem Glycinrest des Ubiquitins und einem Cysteinrest von E1. Das an das E1 gebundene Ubiquitin wird im zweiten Schritt in einer Transacylierungsreaktion auf den katalytisch aktiven

Cysteinrest eines Ubiquitin-konjugierenden Enzyms (E2) übertragen. E2-Enzyme sind die Ubiquitin-vermittelnden Enzyme zwischen E1 und einer Ubiquitin-Protein-Ligase (E3). Das E3-Enzym ermöglicht in einem dritten Schritt die kovalente Bindung des C-terminalen Glycinrestes von Ubiquitin an die ε-Aminogruppe eines Lysinrestes im Substrat. Das zu ubiquitinierende Substrat bindet dabei in der Regel spezifisch an E3. In weiteren Zyklen werden mehrere Ubiquitinreste auf bestimmte Lysinseitenketten der bereits vorhandenen Ubiquitin-Moleküle übertragen, so dass verzweigte Ketten mit bis zu zehn oder mehr Ubiquitinresten entstehen können (Breitschopf *et al.*, 1998; Ciechanover, 1998; Glickman und Ciechanover, 2002).

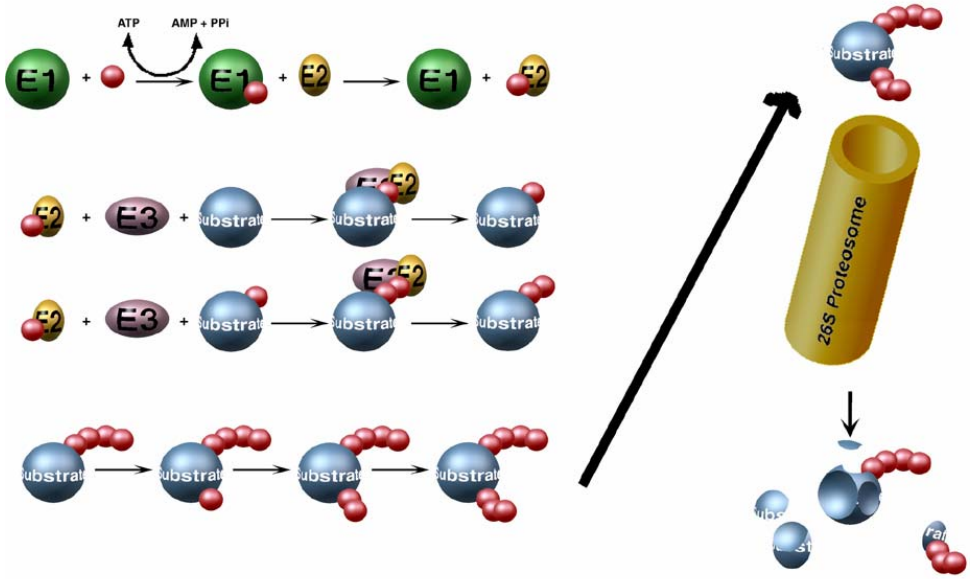


Abb. 2.5: Schematische Darstellung des Ubiquitin-Proteasom-Systems. Im ersten Schritt entsteht zunächst unter ATP-Verbrauch ein Thioester zwischen dem C-terminalen Glycin des Ubiquitins (rote Kugel) und dem katalytisch aktiven Cysteinrest des Ubiquitin-aktivierenden Enzyms, E1 (grüne Kugel). Das aktivierte Ubiquitin wird erneut unter Ausbildung eines Thioesters auf das Ubiquitin-konjugierende Enzym, E2 (gelbes Ellipsoid), übertragen. Ubiquitin-Protein-Ligasen, E3 (violettes Ellipsoid), sorgen für den Transfer des Ubiquitins auf das Substrat (blaue Kugel). In weiteren Zyklen werden mehrere Ubiquitinreste auf die bereits vorhandenen Ubiquitin-Moleküle übertragen. In einem zweiten Schritt erfolgt die Degradation des markierten Proteins im 26S-Proteasom.

Die Ubiquitin-Protein-Ligasen übernehmen die wichtige Rolle der Substrat-erkennung. Sie sind substratspezifisch, können aber auch verschiedene Substrate über ähnliche, jedoch nicht identische Motive erkennen. In seltenen Fällen kann ein Substrat auch Ziel von verschiedenen Ubiquitin-Protein-Ligasen sein, vermutlich über unterschiedliche Erkennungssequenzen (Ciechanover, 1998).

2.4.3 Ubiquitin-Protein-Ligasen (E3-Enzyme)

Strukturell und funktionell lässt sich die heterogene Gruppe der Ubiquitin-Protein-Ligasen mit einigen Ausnahmen in die beiden großen Familien der „really interesting new gene“ (RING) -Finger-Ligasen und der „homolog zum E6-AP C-Terminus“ (HECT) -Ligasen einteilen (Glickman und Ciechanover, 2002; Coscoy und Ganem, 2003).

RING-Finger-Ligasen zeichnen sich durch eine sogenannte RING-Finger-Domäne aus, eine Protein-Protein-Interaktions-Domäne, die man erstmals für das „really interesting new gene“ (RING) -Protein beschrieben hat (Freemont *et al.*, 1991; Lovering *et al.*, 1993). RING-Finger-Ligasen vermitteln die Übertragung des Ubiquitins vom E2-Enzym auf das Zielprotein nur indirekt. Das E2-Enzym bindet dabei an das RING-Finger-Motiv, während das Substrat mit anderen Protein-Protein-Interaktions-Domänen der Ubiquitin-Protein-Ligase interagiert. Vermutlich wird durch diese räumliche Annäherung von E2-Enzym und Substrat die Übertragung von Ubiquitin erleichtert (Jackson *et al.*, 2000; Joazeiro und Weissman, 2000).

Die HECT-Ligasen sind die einzigen Ligasen, die Ubiquitin vom E2-Enzym übernehmen und auf das Zielprotein übertragen. Hierfür besitzen die HECT-Ligasen eine charakteristische C-terminale, ca. 350 Aminosäuren umfassende HECT-Domäne. Sie zeichnet sich durch einen konservierten, katalytisch aktiven Cysteinrest aus, der, wie die Cysteinreste der E2- und E3-Enzyme, einen Thioester mit Ubiquitin bildet. Anschließend wird das gebundene Ubiquitin von der HECT-Ligase auf die ε-Aminogruppe eines Lysinrestes des Zielproteins übertragen (Huibregtse *et al.*, 1995; Scheffner *et al.*, 1995). Das erste isolierte Protein mit einem derartigen Motiv war das sogenannte E6-assoziierte Protein (E6-AP), woraus sich der Domänenname HECT „homolog zum E6-AP C-Terminus“ ableitet. Neben der namensgebenden HECT-Domäne verfügen HECT-Ligasen über einen variablen N-Terminus, eine C2-Domäne und zwei bis vier WW-Domänen (Kumar *et al.*, 1992, 1997; Staub *et al.*, 1996).

Die C2-Domäne umfasst ca. 120 Aminosäuren und erlaubt eine Calcium-abhängige Bindung der Ubiquitin-Protein-Ligase an Phospholipide und Membranen (Nalefski und Falke, 1996; Plant *et al.*, 1997, 2000).

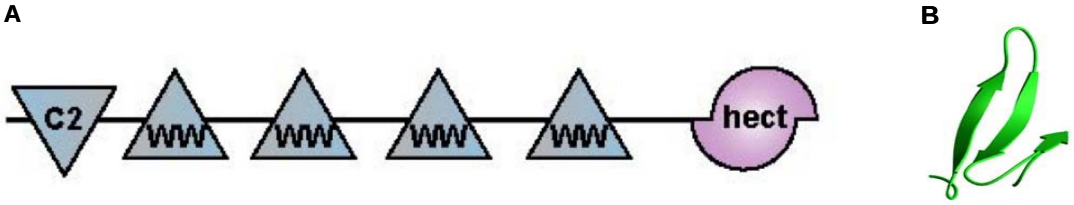


Abb. 2.6: Aufbau der HECT-Ligase „neural precursor cell expressed, developmentally downregulated 4 (Nedd4). (A) Schematische Übersicht über humanes Nedd4. Humanes Nedd4 setzt sich aus einer N-terminalen C2-Domäne, vier WW-Domänen und einer C-terminalen, katalytischen HECT-Domäne zusammen. **(B)** Dreidimensionale Struktur einer WW-Domäne von Nedd4. Drei antiparallele β-Faltblatt-Strukturen bilden eine hydrophobe Bindeoberfläche, die hauptsächlich an prolinreiche Sequenzen des Zielproteins binden.

Die sogenannten WW-Domänen haben eine Länge von ca. 40 Aminosäuren und gewährleisten die spezifische Interaktion der Ubiquitin-Protein-Ligase mit seinen Substraten (Rotin *et al.*, 2000; Zarrinpar und Lim, 2000). Neben einem konservierten Prolinrest enthalten WW-Domänen stets zwei hoch konservierte Tryptophanreste, die namensgebend für diese Domänen sind (Chen und Sudol, 1995; Sudol, 1996). Eine WW-Domäne setzt sich aus drei antiparallelen β-Faltblatt-Strukturen zusammen und bildet damit eine hydrophobe Bindeoberfläche, die hauptsächlich an prolinreiche Sequenzen des Zielproteins bindet (Macias *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 2000; Verdecia *et al.*, 2000; Kanelis *et al.*, 2001; Pires *et al.*, 2001). Bislang wurden vier verschiedene WW-Bindemotive beschrieben: das PY-Motiv (Macias *et al.*, 1996), das PGM-Motiv (Lehman *et al.*, 1998), das PPLP-Motiv (Bedfort *et al.*, 1996; Chan *et al.*, 1996) und bestimmte Phosphoserin- und Phosphothreonin-enthaltende Sequenzen (Lu *et al.*, 1999). Je nach Präferenz zu einem dieser vier Sequenzmotive, wurden alle WW-Domänen in vier Gruppen eingeteilt (Kay *et al.*, 2000; Kasanov *et al.*, 2001). Neben den WW-Domänen von Dystrophin und von dem „YES-associated protein 65“ wurden auch die WW-Domänen des Proteins „neural precursor cell expressed, developmentally downregulated 4“ (Nedd4) in die Klasse I der WW-Domänen eingeordnet, da sie spezifisch an Proteine binden, die ein PY-Motiv enthalten.

Dass die Ubiquitinierung von Proteinen durch die E1-, E2- und E3-Enzyme nicht ausschließlich an den Abbau am Proteasom gekoppelt ist, sondern auch andere Funktionen ausübt, kann am Beispiel der Nedd4-Ubiquitin-Protein-Ligasen gezeigt werden. Die Familie der Nedd4-Ubiquitin-Protein-Ligasen ist die mit den am besten untersuchten HECT-Ligasen. Diese Ligasen üben verschiedenste Funktionen in unterschiedlichen Organismen aus. Durch die Ubiquitinierung werden Membranproteine, wie z.B. der epitheliale Natriumkanal, internalisiert und über den Endozytose-Weg abgebaut (Hein *et al.*, 1995; Staub *et al.*, 1996, 1997, 2000; Lucero und Lagunas, 1997; Springael und Andre, 1998; Rotin *et al.*, 2000; Gajewska *et al.*, 2001). Die Ubiquitinierung mit Hilfe von Nedd4-Ubiquitin-Protein-Ligasen scheint zudem eine wichtige Rolle für das Virus-Budding und die Exozytose von einigen Membranproteinen zu spielen (Helliwell *et al.*, 2001; Kikonyogo *et al*., 2001; Yasuda *et al.*, 2003; Sakurai *et al.*, 2004). Des Weiteren wurde eine Ubiquitin-abhängige Regulation von Transkriptionsfaktoren gezeigt. Hauptsächlich aber wurde der Proteasom-abhängige Abbau als Folge einer Ubiquitinierung beschrieben (Mosser *et al.*, 1998; Wood *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2000; Conkright *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001).

2.5 Problemstellung

Bereits seit langem ist die Beteiligung der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions an der Tumorprogression und an der Wachstumskontrolle von Zellen im Allgemeinen bekannt. Unabhängig von der Art des Tumors konnte für verschiedene Spezies gezeigt werden, dass es in maligne transformierten Zellen zu einem Verlust der Zell-Zell-Kommunikation kommt (Loewenstein und Kanno, 1966, 1967; Kanno und Matsui, 1968; Jamakosmanovic und Loewenstein, 1968). Der Verlust der Zell-Zell-Kommunikation in Tumorgewebe wurde dabei auf eine verminderte Anzahl der Gap Junction-bildenden Connexine und auf ein sehr differenzielles Phosphorylierungsmuster der Connexine zurückgeführt (Oh *et al.*, 1991; Lau *et al.*, 1992; Shinoura *et al.*, 1996; Tsai *et al.*, 1996; Hossain *et al.*, 1998; Hanna *et al.*, 1999; King *et al.*, 2000). Ein Verlust der Gap Junction Funktion kann aber auch mit zahlreichen anderen Krankheiten, wie der vererbten Taubheit (Kelsell

et al., 1997; Zelante *et al.*, 1997), dem „Grauen Star“ (Shiels *et al.*, 1998) und Nerven- (Bergoffen *et al.*, 1993), Haut- (Richard *et al.*,1997) oder Herzkrankheiten (Britz-Cunningham *et al.*, 1995) assoziiert sein.
Für Cx43, dem am besten untersuchten Connexin, ist z.B. die Phosphorylierung der beiden Serinreste S279 und S282 aus dem zytoplasmatischen C-Terminus ausreichend, um eine interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions zu unterbinden (Warn-Cramer *et al.*, 1996, 1998). Obwohl der Signaltransduktionsweg, der zu einer S279/S282-Phosphorylierung von Cx43 führt, bereits ausführlich beschrieben ist, konnte bisher die genaue Funktion dieser Cx43-Phosphorylierung nicht bestimmt werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher zu untersuchen, inwieweit sich die gleichzeitige Phosphorylierung der beiden Serinreste S279 und S282 auf das Gap Junction Protein Cx43 auswirkt. Bislang war kein Antikörper verfügbar, der spezifisch die beiden Serinreste S279 und S282 von Cx43 im phosphorylierten Zustand erkennt. Durch die Entwicklung und Herstellung des Cx43-Antikörpers SA226P, der spezifisch die S279/S282-phosphorylierten Formen von Cx43 detektiert, sollte die Untersuchung der Auswirkungen einer S279/S282-Phosphorylierung auf Cx43 und die Zelle ermöglicht werden. Die Charakterisierung des Antikörpers SA226P sollte mit Hilfe von Western Blot Analysen und indirekten Immunfluoreszenzen durchgeführt werden.
Zudem sollte anhand von Pulldown-Analysen mit Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteinen des zytoplasmatischen N- und C-Terminus von Cx43 ein Interaktionspartner von Cx43 identifiziert werden, dessen Bindung möglicherweise über die Phosphorylierung der Serinreste S279 und S282 reguliert wird.
Da bereits bekannt ist, dass eine Zellzyklus-abhängige Phosphorylierung an einigen Serinresten von Cx43 zu einem Verlust der interzellulären Kommunikation während der Mitose führt, sollte die Lokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 in Interphasezellen und mitotischen Zellen verglichen werden. Mögliche Auswirkungen auf die Zelle sollten dabei untersucht werden.
Cx43 ist ein Protein mit einer sehr kurzen Halbwertszeit. Durch die Behandlung der Zellen mit einem Proteasom-Inhibitor sollte überprüft werden, inwieweit sich die S279/S282-Phosphorylierung auf den Abbau von Cx43 durch das Proteasom auswirkt.

3 Material

3.1 Geräte

Tab. 3.1: In dieser Arbeit verwendete Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Agarosegelkammer		AGS (Heidelberg)
Analysenwaage	GT 410	NeoLab (Heidelberg)
Bakterienschüttler	TR 125’	Infors (Bottmingen, Schweiz)
Brutschrank		Labotect (Göttingen)
Elektroporationsgerät	Gene Pulser II	BioRad (München)
Entwicklermaschine	AGFA Classic E.O.S.	AGFA (Köln)
Halbtrocken-Elektroblotter		cti GmbH (Idstein)
Mikroskope	LEICA DMRD	Leitz (Wetzlar)
	LEICA TCS SP	
pH-Meter		WTW (Neuhofen, Österreich)
PCR-Maschine	Gene Amp PCR System 2400	Applied Biosystems (Darmstadt)
Refraktometer		
Scanner		Hewlett Packard (U.S.A.)
Schüttler		Tecnomara (Schweiz)
Spektralphotometer		Hitachi (Japan)
Sterile Werkbank	BSB 4A	Gelaire Flow Laboratories (Opera, Italien)
Ultraschall-Gerät	Sonifier W-250	Ultraschall & Labortechnik (Schwäbisch Gmünd)
Zählkammer	Neubauer	Migge (Heidelberg)

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Zentrifugen	(MF) Minifuge 2	Heraeus Christ (Osterode)
	RC5C (SLA-3000 Rotor bzw. HB-6 Rotor)	Sorvall (Bad Homburg)
	(TZ) Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf (Engelsberg)
	(UZ) Ultrazenrifuge TL-100 (TLA-100.3 Rotor bzw. SW27 Rotor)	Beckman (München)
	(ZZ) Zellkultur-Zentrifuge 03400	Heraeus Christ (Osterode)

3.2 Verbrauchsmaterialien

Tab. 3.2: In dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Chemilumineszenzfilm (Hyperfilm ECL)	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Complete™, EDTA-free, protease inhibitor cocktail tablets	Roche Diagnostics (Mannheim)
Corex®-Zentrifugenröhrchen (30 mL)	Corex (U.S.A.)
Deckgläschen	Migge (Heidelberg)
Elektroporationsküvetten	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
Fluoprep™	BioMerieux (Marcy l'Etiole, Frankreich)
Kryo-Röhrchen	Nalgene (Rochester, U.S.A.)
Objektträger	Langenbrinck (Emmendingen)
Parafilm	American National Can (Chicago, U.S.A)
Pasteurpipetten	WU (Mainz)
Petrischalen	Greiner (Frickenhausen)
Pipettenspitzen	Roth (Karlsruhe)
Pipettenspitzen gestopft	AGS (Heidelberg)
Plastikküvetten	Greiner (Frickenhausen)

Bezeichnung	Hersteller
Plastikröhrchen 15 mL	Sarstedt (Nümbrecht)
Plastikröhrchen 50 mL	Greiner (Frickenhausen)
PVDF-Membran	Millipore (Eschborn)
Quarzküvetten	Migge (Heidelberg)
Reagenzgläser	Migge (Heidelberg)
Reaktionsgefäße (0,5 mL; 1,5 mL; 2,0 mL)	Eppendorf (Engelsberg)
Smart Ladder	Eurogentec (Seraing, Belgien)
Skalpelle	Bayha (Tuttlingen)
Sterilfilter (0,2 µm Porengröße)	Millipore (Eschborn)
Whatman-Filterpapier 3 MM	Schleicher & Schüll (Dassel)
Zellkulturschalen 15 cm ø	Greiner (Frickenhausen)
10 cm ø	Greiner (Frickenhausen)
6er well	TPP (Schweiz)
24er well	Costar (Bodenheim)
Zellschaber	Costar (Bodenheim)
Zentrifugenröhrchen aus dünnwandigem Plastik (38,5 mL)	Herolab (Wiesloch)

3.3 Kits

Tab. 3.3: In dieser Arbeit verwendete Kits

Bezeichnung	Hersteller
DC Protein Assay	BioRad (München)
QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QIAgen Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
QIAshredder	Qiagen (Hilden)

Bezeichnung	Hersteller
Western Lightning™ chemiluminescence Reagent Plus	Perkin Elmer (Überlingen)
ECL+Plus™ chemiluminescence Kit	Amersham (Braunschweig)
Re-Blot Plus Western Blot Recycling Kit	Chemicon (Hofheim)
SimplyBlue™SafeStain	Invitrogen (Groningen, Niederlande)

3.4 Chemikalien und Enzyme

3.4.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Taufkirchen) bezogen.

3.4.2 Enzyme

Die verschiedenen Restriktionsendonukleasen und die T4-DNA-Ligase wurden von MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und New England Biolabs (Frankfurt am Main) bezogen.

3.5 Mikroorganismen

Tab. 3.4: In dieser Arbeit verwendete Mikroorganismen

Mikroorganismus	Charakteristika	Quelle
E. coli BL21 (elektrokompetent)	Genotyp: F^-, *ompT*, hsdS (r_B^-, m_B^-), *gal;* Protease-defizienter *E. coli* Stamm zur Expression der GST-Fusionsproteine	Pharmacia Biotech (Cambridge, England)

3.6 Antibiotika

Tab. 3.5: In dieser Arbeit verwendetes Antibiotikum

Antibiotikum	Abkürzung	Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Ampizillin	Amp	100 mg/mL	0,1 mg/L

3.7 Oligonukleotide

Synthetische Oligonukleotide wurden von Herrn W. Weinig (DKFZ) hergestellt.

Tab. 3.6: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Nukleotidsequenz[1]	Strang[2]
Cx43-NTer-Fwd	5'- CG GGA TCC GGT GAT TGG AGT GCC TTG GGG –3'	s
Cx43-NTer-Rev	5'- CG GAA TTC TTA CTT CCC TCC GGC CGT GGA GTA G –3'	as
Cx43-CTer-Fwd	5'- CG GGA TCC TTC TAT GTC TTC TTC AAG GGC G –3'	s
CX43-CTer-Rev	5'- TC GAA TTC TTA GAT CTC CAG GTC ATC AGG C –3'	as

)[1] *Bam*HI-Schnittstelle; *Eco*RI-Schnittstelle; STOP-Codon

)[2] „s" bedeutet *sense*-; „as" *antisense*-Strang

3.8 Plasmide

Tab. 3.7: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Bezeichnung	Charakteristika	Quelle
pFlag-CMV^{TM}-2-Cx43	Amp^{R}; Expressionsvektor für Säugetierzellen cDNA von Cx43 (human) über *Bgl*II in pFlag-CMV^{TM}-2 kloniert	diese Arbeit
pGEX-4T-3	Amp^{R}; bakterieller Expressionsvektor	Pharmacia Biotech (Cambridge, U.S.A.)

Bezeichnung	Charakteristika	Quelle
pGEX-4T-3-Cx43-NTer	Amp^R; bakterieller Expressionsvektor PCR-Produkt des N-Terminus von humanem Cx43 über *Bam*HI und *Eco*RI in pGEX-4T-3 kloniert	diese Arbeit
pGEX-4T-3-Cx43-CTer	Amp^R; bakterieller Expressionsvektor PCR-Produkt des C-Terminus von humanem Cx43 über *Bam*HI und *Eco*RI in pGEX-4T-3 kloniert	diese Arbeit
pGEX-2TK-WW1	Amp^R; bakterieller Expressionsvektor PCR-Produkt der WW1-Domäne von Nedd4 aus der Ratte über *Eco*RI und *Bam*HI in pGEX-2TK kloniert	Dr. D. Rotin (hospital for sick children, Toronto, Canada)
pGEX-2TK-WW2	Amp^R; bakterieller Expressionsvektor PCR-Produkt der WW2-Domäne von Nedd4 aus der Ratte über *Eco*RI und *Bam*HI in pGEX-2TK kloniert	Dr. D. Rotin (hospital for sick children, Toronto, Canada)
pGEX-2TK-WW3	Amp^R; bakterieller Expressionsvektor PCR-Produkt der WW3-Domäne von Nedd4 aus der Ratte über *Eco*RI und *Bam*HI in pGEX-2TK kloniert	Dr. D. Rotin (hospital for sick children, Toronto, Canada)

3.9 Peptide

Synthetische Peptide wurden von Dr. R. Pipkorn (DKFZ) hergestellt.

Tab. 3.8: In dieser Arbeit verwendete Peptide

Bezeichnung	Peptidsequenz	Länge (AS)
Cx43-NTer	Biotin-SALGKLLDKVQAYSTAGG-$CONH_2$	18
$Cx43\text{-}CTer_{phosph.}$	Biotin-CSSPTAPL_pSPM_pSPPGYKL-$CONH_2$	18
Cx43-CTer	Biotin-CSSPTAPLSPMSPPGYKL-$CONH_2$	18
Albumin	Biotin-AMLSLGTKADTHDEILEG-$CONH_2$	18

3.10 Zelllinien

Tab. 3.9: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien

Bezeichnung	Herkunft	Quelle
Hepa1c1c7 WT	Hepatomzellen einer Maus (monolayer)	Dr. J. P. Whitlock jun. (Stanford University, Stanford, U.S.A.)
WB-F344	Leberepithelzellen einer Ratte (monolayer)	Dr. H. Sies (Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf)

3.11 Zellkultur-Medien und -Zusätze

Tab. 3.10: In dieser Arbeit verwendete Medien und Zusätze

Bezeichnung	Hersteller
Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) mit Glutamin	GIBCO BRL (Eggenstein)
10% fötales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories (Cölbe)
1% Penicillin/Streptomycin (10.000 U/mL)	GIBCO BRL (Eggenstein)

Bezeichnung	Hersteller
Minimum Essential Medium Eagle mit alpha Modifikation (α-MEM)	GIBCO BRL (Eggenstein)
5% fötales Kälberserum Gold (FCS Gold)	PAA Laboratories (Cölbe)
1% Penicillin/Streptomycin (10.000 U/mL)	GIBCO BRL (Eggenstein)

3.12 Biochemikalien

Tab. 3.11: In dieser Arbeit verwendete Biochemikalien

Bezeichnung	Abkürzung	Stammlösung	Endkonzentration im Medium	Hersteller
Brefeldin A	BFA	2 mg/mL	2 µg/mL	Sigma (Taufkirchen)
Clasto-Lactacystin β-Lactone	LC	10 mM	10 µM	Calbiochem (Bad Soden)
Cytochalasin B	CytoB	10 mg/mL	5 µg/mL	Sigma (Taufkirchen)
Epidermal Growth Factor	EGF	50 µg/mL	100 ng/mL	Roche Diagnostics (Mannheim)
Nocodazol	Noco	5 mg/mL	10 µg/mL	Calbiochem (Bad Soden)

3.13 Antikörper

3.13.1 Erstantikörper

Tab. 3.12: In dieser Arbeit verwendete Erstantikörper

Bezeichnung	Katalognummer	Spezifität	Quelle
SA226P	---	rabbit IgG	diese Arbeit

Bezeichnung	Katalognummer	Spezifität	Quelle
anti-Cx43	71-0700	rabbit IgG	Zytomed (Berlin)
anti-Cx43	C13720	mouse IgG	BD Transduction Laboratories (Heidelberg)
anti-Nedd4	07-049	rabbit IgG	Upstate Biotechnology (Dundee, Schottland)
anti-Nedd4	N95520	mouse IgG	BD Transduction Laboratories (Heidelberg)
anti-Ubiquitin	3936	mouse IgG	Cell Signaling Technology™ (Beverly, U.S.A.)
anti-γ-Tubulin	T6557	mouse IgG	Sigma (Taufkirchen)
anti-Pericentrin	---	mouse IgG	Dr. A. Merdes (University of Edinburgh, Edinburgh, Schottland)
anti-Histon H1	Hybridom-überstand	mouse IgG	Dr. S. Khochbin (Institut Albert Bonniot, Grenoble, Frankreich)

3.13.2 Zweitantikörper

Tab. 3.12: In dieser Arbeit verwendete Zweitantikörper

Bezeichnung	Katalognummer	Quelle
Ziege-anti-Kaninchen IgG, Peroxidase-gekoppelt	A0545	Sigma (Taufkirchen)
Kaninchen-anti-Maus IgG, Peroxidase-gekoppelt	A9044	Sigma (Taufkirchen)
Ziege-anti-Kaninchen IgG, Alexa 488-gekoppelt	A-11034	Molecular Probes (Leiden, Niederlande)
Ziege-anti-Kaninchen IgG, Alexa 594-gekoppelt	A-11037	Molecular Probes (Leiden, Niederlande)
Ziege-anti-Maus IgG, Alexa 488-gekoppelt	A-11029	Molecular Probes (Leiden, Niederlande)
Ziege-anti-Maus IgG, Alexa 594-gekoppelt	A-11032	Molecular Probes (Leiden, Niederlande)

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Isolierung von Plasmid-DNA (3.8) erfolgte aus *E. coli*-Kulturen, die mit einer Einzelkolonie von einer LB-Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 37 °C in LB-Flüssigmedium auf dem Schüttler bei 250 Upm inkubiert wurden. Zur präparativen Isolierung hochreiner Plasmid-DNA wurde der Plasmid Mini- beziehungsweise (bzw.) Maxi-Kit der Firma Qiagen (Hilden) benutzt. Das Verfahren beruht auf der alkalischen Zellwand-Lyse bei gleichzeitiger Denaturierung der genomischen und der Plasmid-DNA. Durch die nachfolgende Absenkung des pH-Wertes wurden genomische DNA und bakterielle Proteine ausgefällt, während die Plasmid-DNA in Lösung blieb und renaturiert wurde. Nach Abtrennung der gefällten Komponenten durch Zentrifugation wurde die Plasmid-DNA über eine Anionenaustauschersäule aufgereinigt oder direkt mit Isopropanol gefällt. Das Pellet wurde mit eiskaltem 70 %-igem Ethanol gewaschen, nachfolgend für 15 Minuten (min) mit 13.600 g zentrifugiert, im Vakuum oder an der Luft getrocknet und in sterilem $H_2O_{demin.}$ aufgenommen. Die Konzentration der wässrigen DNA-Lösungen wurde spektrophotometrisch bestimmt, wobei die Absorption bei Wellenlängen von 260 und 280 nm gegen einen Blindwert von $H_2O_{demin.}$ in einer Quarzküvette gemessen wurden. Aus den erhaltenen Absorptionswerten wurde die Konzentration der Nukleinsäure berechnet und ihre Reinheit abgeschätzt. Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, Proteine bei 280 nm. Bei einem Quotienten E_{260} / E_{280} von 1,8 - 2,0 beträgt die Reinheit der DNA 70-95 %.

Es gelten folgende Richtwerte:

DNA (doppelsträngig):	$OD_{260\ nm}$ = 1,0 entspricht etwa 50 µg DNA / mL
DNA (einzelsträngig):	$OD_{260\ nm}$ = 1,0 entspricht etwa 40 µg DNA / mL
DNA (Oligonukleotide):	$OD_{260\ nm}$ = 1,0 entspricht etwa 20 µg DNA / mL

(Sambrook *et al.*, 1989)

4.1.2 Hydrolytische Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen (Nathans und Smith, 1975)

Die sequenzspezifische Spaltung von doppelsträngiger Plasmid-DNA erfolgte mit bakteriellen Typ II-Restriktionsendonukleasen, die palindromische Sequenzen erkennen. Durch die Spaltung der Erkennungssequenz (4-8 Nukleotide) entstehen glatte oder einzelsträngige 3´- bzw. 5´- überhängende Enden.
Für einen vollständigen Verdau wurde 1 µg DNA in einen Ansatz von 10 µL Gesamtvolumen eingesetzt. Die in $H_2O_{demin.}$ gelöste DNA wurde mit der entsprechenden Restriktionsendonuklease und dem dazugehörigen Reaktionspuffer versetzt und zwischen 2 und 16 Stunden (h) bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur inkubiert. Die Berechnung der notwendigen Enzymmenge erfolgte in der Regel nach der Formel:
1 U spaltet 1 µg DNA pro Stunde.
Die Reaktion wurde mit Hilfe der Agarosegel-Elektrophorese (4.1.3) überprüft.

4.1.3 Analytische und präparative Agarosegel-Elektrophorese

Zur Analyse oder Präparation von DNA-Fragmenten wurden diese in Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auftrennung von linearen, doppelsträngigen DNA-Fragmenten in einem elektrischen Feld beruht auf der Tatsache, dass die elektrophoretische Beweglichkeit der DNA antiproportional zum Logarithmus der Anzahl der Basenpaare ist (Meyers *et al.*, 1976). Nach Zugabe von Ethidiumbromid, welches in GC-Paare der DNA interkaliert, können DNA-Fragmente unter ultraviolettem (UV)-Licht aufgrund der Abgabe von Fluoreszenzlicht sichtbar gemacht werden.
Der verwendete Agarosegehalt der Gele richtete sich nach der Größe der zu trennenden Fragmente und variierte zwischen 0,8 % (w/v) und 1,5 % (w/v). Die entsprechende Agarosemenge wurde in 1 x TAE-Puffer (40 mM Tris/Essigsäure; 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)) bis zur Homogenität aufgekocht, nach dem Abkühlen auf 50-60 °C mit 0,75 µg/mL Ethidiumbromid versetzt und in eine Gelkammer mit Gelkamm gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 1/6 Volumen Probenpuffer (0,25 % Bromphenolblau; 0,25 % Xylencyanol; 40 % Saccharose)

versetzt und zur Elektrophorese in die durch den Gelkamm geformten Geltaschen pipettiert. Als Größenstandard wurde ein „1 kb“-Marker (GIBCO BRL, Eggenstein) eingesetzt. Die angelegte Spannung während der Elektrophorese betrug je nach der Größe des Gels 80-120 V. Die Banden wurden anschließend zur Dokumentation im UV-Durchlicht bei 312 nm fotografiert. Bei präparativen Gelen wurde die interessierende Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel erfolgte mittels des „QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit“ der Firma Qiagen (Hilden) (4.1.4).

4.1.4 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung der DNA aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des „QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit“ der Firma Qiagen (Hilden). Das Prinzip dieses Kits beruht auf der selektiven und quantitativen Adsorption von DNA an Silicagel-Partikel unter Hochsalzbedingungen. Die DNA bleibt während des Waschvorgangs an die Silicagel-Partikel gebunden und kann am Ende der Aufreinigung spezifisch abgelöst werden.

Das gewünschte DNA-Fragment wurde unter UV-Licht (312 nm) mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Pro 100 mg Gelgewicht wurden 300 µL QX1-Puffer (Qiagen, Hilden) zugegeben. Nach Zugabe von 30 µL der QIAEX II-Silicagel-Suspension wurde der Ansatz für 10 min bei 50 °C inkubiert, wobei die Lösung alle 2 min gevortext wurde, um die Silicagel-Partikel in Suspension zu halten. Die hohe Konzentration an chaotrophem Salz in dem QX1-Puffer schwächt die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Zuckern im Agarosepolymer und erlaubt somit ein Auflösen des Gels. Die Silicagel-Partikel mit der gebundenen DNA wurden durch aufeinanderfolgende Zentrifugation (1 min; 13.000 g) und Resuspension je einmal in 500 µL QX1-Puffer und zweimal in 500 µL PE-Puffer (Qiagen, Hilden) gewaschen. Nach dem Trocknen des Pellets bei Raumtemperatur (RT) wurde dieses mit 20 µL $H_2O_{demin.}$ versetzt und je nach Länge des zu extrahierenden DNA-Fragmentes 5 oder 10 min bei RT inkubiert. Die unlöslichen Silicagel-Partikel wurden durch Zentrifugation (1 min; 10.000 g) von der jetzt in Lösung vorliegenden DNA abgetrennt. Die eluierte DNA wurde gelelektrophoretisch überprüft (4.1.3).

4.1.5 Klonierung von DNA-Fragmenten

Die zu klonierenden DNA-Fragmente und die Vektoren wurden zunächst mit der entsprechenden Restriktionsendonuklease behandelt (4.1.2). Das gespaltene DNA-Fragment wurde danach auf einem Agarosegel aufgetrennt (4.1.3) und aus diesem anschließend isoliert (4.1.4). Das aufgereinigte DNA-Fragment wurde durch Ligation in den geöffneten Vektor inseriert (4.1.5.1), nachfolgend wurde das Ligationsprodukt in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert (4.1.5.3).

4.1.5.1 Ligation von DNA-Fragmenten (Feretti und Sgaramella, 1981)

Unter Ligation versteht man die enzymatische, kovalente Verknüpfung doppelsträngiger DNA-Fragmente. Unter Verbrauch von Adenosin-Triphosphat katalysieren T4-DNA-Ligasen die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einer freien 5´-Phosphatgruppe und einer freien 3´-Hydroxylgruppe. Zwei beliebige doppelsträngige DNA-Moleküle mit freien kompatiblen 5´- und 3´-Enden können auf diese Weise kovalent zusammengefügt werden.
Vektor- und Insert-DNA wurden in einem Molaritäten-Verhältnis von 1:3 eingesetzt, wobei die Gesamtmenge an Insert-DNA ca. 100 ng betrug. Entsprechend der Insertlänge variierte die benutzte Menge an Vektor-DNA. Für einen 20 µL Ligationsansatz wurden eingesetzt:

	x	ng	Vektor-DNA
	y	ng	Insert-DNA
	2	µL	10 x T4-DNA-Ligase-Puffer
	2	µL	T4-DNA-Ligase (10 U/µL)
ad	20	µL	$H_2O_{demin.}$

Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 16 °C inkubiert und anschließend direkt zur Transformation in *E. coli*-Zellen verwendet (4.1.5.3).

4.1.5.2 Herstellung von elektrokompetenten *E.coli* DH5α-Zellen

Zellen, die in der Lage sind, Fremd-DNA aufzunehmen, bezeichnet man als kompetente Zellen. 5 mL LB-Medium wurden mit einer auf LB-Agar gewachsenen Einzelkolonie von *E. coli* DH5α inokuliert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

1,25 mL dieser Übernachtkultur wurden in 250 mL LB-Medium überimpft und bis zum Erreichen einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,6 bei 37 °C inkubiert. In diesem Stadium befindet sich ein Großteil der Zellen in der frühen exponentiellen Wachstumsphase, in der die Kompetenz gut induziert werden kann. Die Zellen wurden für 30 min auf Eis gekühlt und danach bei 6000 Upm und 4 °C für 15 min zentrifugiert (vorgekühlter SLA 3000-Rotor). Das Bakterienpellet wurde in 250 mL eiskaltem, sterilem $H_2O_{demin.}$ resuspendiert, erneut bei gleichen Bedingungen zentrifugiert und anschließend in 125 mL eiskaltem, sterilem $H_2O_{demin.}$ resuspendiert. Nach wiederholter Zentrifugation wurde das Pellet in 5 mL eiskaltem, sterilem 10 %-igen Glycerin resuspendiert und ein letztes Mal bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet mit 0,2 mL eiskaltem, sterilem 10 %-igen Glycerin in Lösung gebracht. Die kompetenten Zellen wurden zu je 40 µL in Eppendorfgefäßen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Verwendung erfolgte die Lagerung bei –80 °C.

4.1.5.3 Elektroporation von *E.coli*-Zellen und anschließende Selektion

Die Elektroporation dient der Übertragung von Plasmiden in elektrokompetente Zellen. Durch kurzzeitiges Anlegen einer Hochspannung wird eine erhöhte Durchlässigkeit der Plasmamembranen erzeugt, durch die DNA in die Zellen gelangen kann. Die elektrokompetenten *E. coli* DH5α-Zellen (4.1.5.2) wurden auf Eis aufgetaut und mit 0,1 bis 5 µg Plasmid-DNA bzw. 1-2 µL Ligationsansatz versetzt. Dieses Gemisch wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Gene Pulser®/E.coli Pulser™ Cuvette, BioRad, München) mit 0,2 cm Spaltbreite überführt und in die Küvettenklammer des GenePulser-Apparats (BioRad, München) gestellt. Das Gerät wurde nachfolgend mit folgenden Einstellungen gestartet:

GenePulser	:	25 µF / 2,5 kV
Pulser Controller	:	200 Ω

Bei einer erfolgreichen Elektroporation sollte die Zeitkonstante τ im Bereich zwischen 4,8 und 5,3 msec liegen. Nach erfolgter Elektroporation wurden die Zellen sofort in 1 mL LB-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert.

Anschließend wurden Aliquots von 100 und 500 µL auf entsprechendem Selektivagar ausplattiert.

LB-Medium

Luria-Bertani-Medium (Sambrook *et al*., 1989)

	0,50 %	(w/v)	Bacto-Hefe-Extrakt
	1,00 %	(w/v)	Bacto-Trypton
	1,00 %	(w/v)	NaCl
	0,25 %	(w/v)	$MgSO_4$ x 7 H_2O
			$H_2O_{demin.}$
pH	7,0		

Das LB-Medium wurde im Autoklaven sterilisiert (30 min, 121 °C, 1,3 bar). Zur Herstellung fester Nährböden wurden dem Medium 1,5 % Bacto-Agar zugegeben.

4.1.5.4 Stammhaltung

Zur längeren Aufbewahrung von Bakterien wurden 600 µL einer über einen Tag bei 37 °C auf dem Rundschüttler mit 250 Upm gewachsenen Kultur mit 400 µL einer sterilen 86 %-igen Glycerinlösung gemischt und die Zellen bei –80 °C gelagert.

4.1.6 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wird zur Amplifikation von DNA-Fragmenten verwendet, die zwischen bekannten doppelsträngigen Sequenzbereichen liegen (Saiki *et al.*, 1988). Mittels der bekannten Sequenzinformation können zwei Oligonukleotide (Primer; 3.7) synthetisiert werden, von denen der eine komplementär zum kodierenden Strang, der andere komplementär zum nicht-kodierenden Strang ist. Nach Denaturierung der Matrizen-DNA und Anlagerung der Primer an die DNA synthetisiert die Taq-Polymerase die komplementären Gegenstränge ausgehend von den 3'-Enden der Primer. Dann wird der synthetisierte DNA-Doppelstrang erneut denaturiert, so dass eine Anlagerung der Primer an weitere DNA-Fragmente ermöglicht wird. Die Amplifikation der DNA-Fragmente erfolgt exponentiell.

Das Standard-Volumen eines PCR-Ansatzes betrug 50 µL und bestand aus:

0,3 µL	DNA (pFlag-CMV^{TM}-2-Cx43; 0,35 µg/µL)
33,7 µL	$H_2O_{demin.}$
4,0 µL	dNTPs (10 mM)
3,0 µL	$MgCl_2$ (25 mM)
5,0 µL	10 x PCR-Puffer
1,5 µL	Forward-Primer (10 pmol/µL)
1,5 µL	Reverse-Primer (10 pmol/µL)
1,0 µL	Taq-Polymerase (5 U/µL)

Die Standard-PCR-Reaktion wurde in einem Thermocycler (GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer) nach folgendem Protokoll durchgeführt:

95 °C	2 min	
95 °C	30 sec	30 Zyklen
58 °C	30 sec	
72 °C	45 sec	
72 °C	10 min	

Je nach Größe des zu amplifizierenden Fragments und der Homologie des Primers können die Polymerisationszeit sowie die Anlagerungstemperatur variiert werden. Das erhaltene PCR-Fragment wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt (4.1.3) und mit dem QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit“ der Firma Qiagen (Hilden) aus der Agarosematrix isoliert (4.1.4).

4.2 Zellbiologische Methoden

4.2.1 Kultivierung von eukaryontischen Zellen

Bei den verwendeten WB-F344 Zellen und Hepa1c1c7 WT Zellen handelt es sich um Zelllinien, die in Adhäsionskultur wachsen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C in einer zu 5 % gesättigten CO_2-Atmosphäre. Um ein gleichbleibendes Wachstum und das Überleben adhärenter Zellen zu gewährleisten, mussten die Zellen bei Erreichen der Konfluenz trypsiniert und in größerer Verdünnung auf neue Zellkulturschalen verteilt werden.

4.2.1.1 Kultivierung von WB-F344 Zellen

Zur Untersuchung der Lokalisation und Funktion von Connexin43 (Cx43) wurde die epitheliale Rattenleber-Zelllinie WB-F344 verwendet (Tsao *et al.*, 1984; Coleman *et al.*, 1997). Für die Experimente wurden die WB-F344 Zellen in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO_2-Begasung kultiviert. Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 100 % angezüchtet, bevor sie 24 h mit DMEM ohne FCS ausgehungert wurden. Das Aushungern diente dazu, alle Zellen in einen Ruhezustand des Zellzyklus zu versetzen. Zudem wird dadurch die vollständige Entfernung von Wachstumsfaktoren aus dem Medium gewährleistet, damit die Basisaktivität der Kinasen und anderer zellulärer Enzyme besonders gering ist. Dieses ist notwendig, da ansonsten schwache Aktivierungen in der Signalkaskade nicht wahrgenommen werden könnten. Nach dem Aushungern wurden die Zellen schließlich mit verschiedenen Biochemikalien behandelt.
Für die Weiterkultur wurden subkonfluente WB-F344 Zellen für 20 min mit 0,05 % EDTA in „phosphate buffered saline" (PBS) bei 37 °C inkubiert, bevor 1 mL Trypsin/EDTA zugegeben wurde. Nach ca. 5 min Inkubation im Brutschrank lösten sich die Zellen ab. Durch Auf- und Abpipettieren mit einer Pasteurpipette wurden die Zellen vereinzelt und im Verhältnis von 1:5 bis 1:20 auf neue im Durchmesser 10 cm große Schalen verteilt.

4.2.1.2 Kultivierung von Hepa1c1c7 WT Zellen

Für die Experimente wurden die Hepa1c1c7 WT Zellen in Minimum Essential Medium Eagle mit alpha Modifikation (α-MEM) mit 5 % FCS „Gold" und 1 % Penicillin/Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO_2-Begasung kultiviert. Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von ca. 70-80 % angezüchtet, bevor sie 24 h mit α-MEM ohne FCS „Gold" ausgehungert wurden. Nach dem Aushungern wurden die Zellen für 15 min mit dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) behandelt.
Für die Weiterkultur wurden die subkonfluenten Hepa1c1c7 WT Zellen einmal kurz mit 0,05 % EDTA/PBS gespült, bevor 1 mL Trypsin/EDTA für 5 min zugegeben wurde. Nachdem sich die Zellen abgelöst hatten, wurden sie mit einer

Pasteurpipette vereinzelt und im Verhältnis 1:5 oder 1:10 auf eine neue im Durchmesser 10 cm große Schale verteilt.

4.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen einer subkonfluenten im Durchmesser 10 cm Schale wurden trypsiniert wie unter 4.2.1 beschrieben und für 5 min bei 1200 Upm in der Zellkultur-Zentrifuge zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 2 mL kaltem FCS mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert und je 1 mL in ein Kryoröhrchen überführt. Damit die Zellen langsam einfrieren, wurden die Röhrchen mit Papiertüchern umwickelt, einige Stunden bei -20 °C und über Nacht bei -80 °C gelagert, bevor sie endgültig in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden.
Zum schnellen Auftauen der Zellen wurden diese direkt nach der Entnahme aus dem flüssigen Stickstoff in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und mit 10 mL warmem Kulturmedium in im Durchmesser 10 cm Schalen ausgesät. Sobald sich alle Zellen am Schalenboden angeheftet hatten, wurde das Medium gewechselt, um das DMSO zu entfernen.

4.2.3 Zellzahlbestimmung

Für die Immunfluoreszenz war es erforderlich, dass die Zellen direkt auf den Deckgläschen kultiviert wurden. Um bei jedem Experiment eine definierte Anzahl an Zellen auf die Deckgläschen auszusäen, wurde die Zellzahl vorher bestimmt. Hierfür wurden die trypsinierten und vereinzelten Zellen mit DMEM bzw. α-MEM verdünnt und mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt. Jeweils zwei durch Schliffe markierte Großquadrate wurden ausgezählt und die Zellzahl nach folgender Formel bestimmt:

Zellzahl / mL = Anzahl der gezählten Zellen pro Großquadrat × 10000

4.3 Proteinbiochemische Methoden

4.3.1 Herstellung von Zellextrakten

4.3.1.1 RIPA-Extrakte

Für die Analysen von Cx43 wurden hauptsächlich Zellextrakte mit RIPA-Puffer verwendet, da der RIPA-Puffer genügend Detergenzien enthält, um Cx43 aus der Membran zu lösen. RIPA enthält zudem nur wenig Natriumdodecylsulfat (SDS) und wirkt daher weniger stark denaturierend auf Proteine, was eine wichtige Voraussetzung für eine Immunpräzipitation ist.

Zur Proteinextraktion wurde das Medium von konfluenten, unbehandelten bzw. mit verschiedenen Biochemikalien behandelten WB-F344 Zellen entfernt und die Zellen anschließend zweimal mit eiskaltem PBS gespült. Nachdem die entsprechende Menge RIPA-Puffer auf die Zellen pipettiert wurde (für in Durchmesser 10 cm Schalen wurden 500 µL RIPA, für 6er wells wurden 200 µL RIPA verwendet), wurden diese für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend mit einem Zellschaber abgekratzt. Zum Scheren der DNA wurde die Zellsuspension zweimal über eine QIAshredder-Säule (Qiagen, Hilden) bei 14000 Upm in der Tischzentrifuge (TZ) für 1 bzw. 5 min zentrifugiert. Die Proteinkonzentrationsbestimmung (4.3.3) erfolgte mit 10 µL des Lysats, der Rest wurde bei -80 °C eingefroren.

RIPA-Puffer		
	150,0 mM	NaCl
	50,0 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	1,0 mM	EGTA
	1,0 mM	EDTA
	0,25 %	Natrium-Desoxycholat
	1,0 %	NP-40
	0,1 %	SDS
		$H_2O_{demin.}$

Vor Gebrauch wurden die Inhibitoren zugegeben:

1:40	Complete™, EDTA-free, protease inhibitor cocktail tablets (Stammlösung: 1 Tablette in 2 mL $H_2O_{demin.}$ gelöst; Roche Diagnostic, Mannheim)	
2 mM	Natriumorthovanadat	(Phosphataseinhibitor)
2 mM	Natriumfluorid	(Phosphataseinhibitor)

4.3.1.2 SDS-Extrakte

Für Western Blot Analysen eignen sich SDS-Proteinextrakte sehr gut, da sie relativ unempfindlich gegenüber mehrmaligem Einfrieren und Auftauen sind. Die konfluenten und behandelten bzw. nicht behandelten WB-F344 Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gespült. Eine entsprechende Menge an 95 °C heißem 1 %-igem SDS wurde auf die Zellen gegeben und diese mit einem Zellschaber abgekratzt (für im Durchmesser 10 cm Schalen wurden 500 µL 1 %-iges SDS, für 6er wells wurden 200 µL 1 %-iges SDS verwendet). Zum Scheren der DNA wurde die Zellsuspension zweimal über eine QIAshredder-Säule (Qiagen, Hilden) bei 14000 Upm (TZ) für 1 bzw. 5 min zentrifugiert. Für die Proteinkonzentrations-bestimmung (4.3.3) wurden 10 µL des Lysats entnommen, der Rest wurde bei -80 °C eingefroren.

4.3.1.3 E1A-Extrakte

Für die Pulldown-Analysen dürfen die Zellextrakte nur wenig Detergenz enthalten, daher wurden die Proteinextrakte mit dem E1A-Puffer hergestellt. Proteinextrakte in E1A-Puffer sind allerdings sehr empfindlich und müssen rasch aufgearbeitet werden.

Die in im Durchmesser 10 cm Schalen gewachsenen WB-F344 Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, 30 min auf Eis mit 500 µL E1A-Puffer inkubiert und abgekratzt. Die in der Zellsuspension enthaltene DNA wurde durch eine zweimalige Zentrifugation über eine QIAshredder-Säule (Qiagen, Hilden) geschert. Mussten die Zellextrakte von vielen Zellkulturschalen gepoolt werden, wurde die DNA in einem 15-minütigen Zentrifugationsschritt bei 14000 Upm und 4 °C pelletiert und die Proteine-enthaltenden Überstände vereinigt. Für die Proteinkonzentrations-bestimmung (4.3.3) wurden 10 µL des Lysats entnommen, der Rest wurde bei -80 °C eingefroren.

E1A-Puffer		
	250,0 mM	NaCl
	0,1 %	Triton-X-100
	50,0 mM	HEPES, pH 7,4
	10,0 mM	$MgCl_2$
		$H_2O_{demin.}$

pH 7,0 (mit HCl)

Der Puffer wurde bei 4 °C gelagert, vor Gebrauch wurden die Inhibitoren zugegeben:

1:40	Complete™, EDTA-free, protease inhibitor cocktail tablets (Stammlösung: 1 Tablette in 2 mL $H_2O_{demin.}$ gelöst; Roche Diagnostic, Mannheim)	
2 mM	Natriumorthovanadat	(Phosphataseinhibitor)
2 mM	Natriumfluorid	(Phosphataseinhibitor)

4.3.2 Aufreinigung von Centrosomen

Da für eine Centrosomen-Präparation sehr viel Ausgangsmaterial benötigt wird, wurden die Zellen für diesen Versuch in 20 Maxischalen (Ø 15 cm) ausgesät und in DMEM mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO_2-Begasung kultiviert. Die Zellen wurden bis zu einer „Überkonfluenz" angezüchtet, bevor sie für 1,5 h mit 5 µg/mL Cytochalasin B und 10 µg/mL Nocodazol (gelöst in 15 mL DMEM mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomcin) bei 37 °C behandelt wurden. Cytochalasin B und Nocodazol wirken sich negativ auf die Polymerisation der Aktinfilamente bzw. Mikrotubuli aus und verhindern damit die Zellteilung (Forscher und Smith, 1988; Rennison *et al.*, 1992; Thyberg und Moskalewski, 1992; Theodoropoulos *et al.*, 1994; Cimini *et al.*, 1998). Zur einfacheren Handhabung wurden zunächst 10 Maxischalen mit Cytochalasin B und Nocodazol behandelt, die weiteren 10 Maxischalen folgten ca. 45 min zeitversetzt. Der entscheidende Schritt der Centrosomen-Aufreinigung ist die Zelllyse. Durch die Puffer mit geringem Salzanteil können die Centrosomen von den Zellkernen separiert und in Lösung gebracht werden. Um eine gute Lyse zu erzielen, die verhindert, dass die meisten Centrosomen im folgenden Ablauf mit den Zellkernen pelletiert werden, muss darauf geachtet werden, dass diese Waschschritte sehr schnell erfolgen. Daher wurden die Zellen nach der Inkubation mit Cytochalasin B und Nocodazol im Kühlraum bei 4 °C zügig nacheinander mit 1 × PBS, 0,1 × PBS mit 8 % (w/v) Saccharose, 8 % (w/v) Saccharose und 1 × LB gewaschen. Die Zellen wurden anschließend mit 10 mL LB + 0,5 % NP-40 für 10 min auf dem Schüttler bei 4 °C inkubiert. Das Lysat von jeweils 2,5 Maxiplatten wurde gepoolt, in ein 30 mL Glas-Corexröhrchen überführt und mit 1/50 Volumen (500 µL) 50 × PE

versetzt. Um die Zellkerne zu pelletieren, wurden die Lysate mit 3000 Upm für 3 min bei 4 °C (gekühlter HB-6 Rotor) zentrifugiert. Die Überstände, die die Centrosomen enthielten, wurden in ein neues Glas-Corexröhrchen überführt und vorsichtig mit 2 mL 20 %-igem Ficoll unterschichtet. Durch die Zentrifugation mit 12700 Upm für 15 min bei 4 °C (gekühlter HB-6 Rotor) reichern sich die Centrosomen in den Interphasen zwischen den Lysaten und den Ficoll-Kissen an. Die Überstände, bis ca. 2 ml über den Ficoll-Kissen, wurden mit einer Pasteurpipette abgesaugt und verworfen. Die Interphasen (ca. 2 mL) wurden mit einer Pasteurpipette abgenommen und in einem neuen Glas-Corexröhrchen gepoolt. Um zu gewährleisten, dass die gepoolten Interphasen auf dem Saccharose-Gradienten liegen und nicht sinken, darf die Ficoll-Konzentration höchstens 10 % (w/w) für die weitere Aufarbeitung betragen. Daher wurde die Ficoll-Konzentration mit einem Refraktometer gemessen und gegebenenfalls mit 1 × PE + 0,1 % NP-40 verdünnt. Die Interphasen wurden dann auf einen Saccharose-Gradienten geladen und mit 24000 Upm für 1 h bei 2 °C zentrifugiert (gekühlter SW28 Rotor). Dem Gradienten wurden von unten jeweils 500 µL-Fraktionen entnommen und deren Saccharose-Gehalt mit Hilfe des Refraktometers bestimmt. Diejenigen Fraktionen, die einen Saccharose-Gehalt von 48 % - 60 % besaßen, enthielten die Centrosomen und wurden daher gepoolt. Zur Entfernung der Saccharose und um die Centrosomen anzukonzentrieren, wurden die gepoolten Centrosomen-Fraktionen mit 10 mM PIPES pH 7,2 verdünnt und mit 30000 Upm in der Ultrazentrifuge (UZ) für 1 h bei 4 °C zentrifugiert (Ti70 Winkelrotor). Die ankonzentrierten Centrosomen im Pellet wurden schließlich in 6 x Probenpuffer (4.3.4) aufgenommen und mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (4.3.4) untersucht.

Puffer

Das β-Mercaptoethanol wurde erst kurz vor Gebrauch den Lösungen zugegeben.

PBS	130,0 mM	NaCl
	2,0 mM	KCl
	8,0 mM	Na_2HPO_4
	2,0 mM	KH_2PO_4
		$H_2O_{demin.}$

PE

10,0 mM	PIPES
1,0 mM	EDTA
8,0 mM	β-Mercaptoethanol
	$H_2O_{demin.}$

pH 7,2 (mit KOH)

LB

1,0 mM	Tris
8,0 mM	β-Mercaptoethanol
	$H_2O_{demin.}$

pH 8,0 (mit HCl)

Ficoll-Lösung

20,0 % (w/w)	Ficoll in PE + 0,1 % NP-40
8,0 mM	β-Mercaptoethanol

Herstellung des Saccharose-Gradienten

In ein spezielles Zentrifugenröhrchen aus Plastik für den Rotor SW28 wurde zunächst ein Kissen von 4 mL 65,0 % Saccharose pipettiert. Auf dieses Kissen wurden ca. 16 mL eines Gradienten von 20,0 % - 62,5 % Saccharose mit Hilfe einer Gradientenmischmaschine geladen.

20,0 % (w/w)	Saccharose in PE + 0,1 % TritonX-100
8,0 mM	β-Mercaptoethanol
62,5 % (w/w)	Saccharose in PE + 0,1 % TritonX-100
8,0 mM	β-Mercaptoethanol
65,0 % (w/w)	Saccharose in PE + 0,1 % TritonX-100
8,0 mM	β-Mercaptoethanol

4.3.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten erfolgte mit dem DC Protein Assay (BioRad, München). Diese Methode beruht auf einer Folin-Reaktion nach Lowry. Dabei reagieren die Proteine hauptsächlich über ihre Tyrosin- und Tryptophanreste im alkalischen Medium mit Kupfertartrat. Das Folin-Reagenz wird

von dem Protein-Kupfer-Komplex reduziert, wobei charakteristische blaue Produkte mit einem Absorptionsmaximum bei 750 nm entstehen.
Es wurden jeweils 10 µL der Proteinextrakte mit $H_2O_{demin.}$ in einem Reagenzglas auf 100 µL aufgefüllt und mit 490 µL Reagenz A sowie 10 µL Reagenz S versetzt. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 4 mL Reagenz B und Mischen auf dem Vortexer gestartet. Nach 20-minütiger Inkubation bei RT konnte die Farbentwicklung am Spektralphotometer bei 750 nm gemessen werden. Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte anhand einer Eichkurve mit bovinem γ-IgG als Standard.

4.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine durch Gelelektrophorese erfolgte nach einer modifizierten Methode von Laemmli (Laemmli, 1970). Bei dieser denaturierenden Gelelektrophorese werden die aufgetragenen Proteine annähernd nach ihrer Größe aufgetrennt. Um die Sekundär- und Tertiärstrukturen zu zerstören, müssen die Proteine vor dem Auftragen durch β-Mercaptoethanol reduziert und mit Detergenzien wie SDS denaturiert werden. Die amphipatischen SDS-Moleküle lagern sich mit ihren hydrophoben Anteilen an die Proteine an. Durch die stark negativen Ladungen der Sulfatreste des SDS wird die eigentliche Ladung des Proteins maskiert. Somit weisen die SDS-beladenen Proteine im Verhältnis zu ihrer Masse fast identische Ladungen auf, liegen in entfalteter Konformation vor und wandern daher nur in Abhängigkeit ihrer Molekülgröße durch die Gelmatrix.
Eine diskrete Proteinauftrennung nach dem Molekulargewicht wird durch die Verwendung von Sammel- und Trenngel erreicht, wobei es zu einer Konzentrierung der Proteine in einer schmalen Bande im Sammelgel vor deren Eintritt ins Trenngel kommt. Durch den niedrigen pH-Wert (pH 6,8) im 4,5 %-igen Sammelgel wird aufgrund der dort elektrophoretisch kaum mobilen Glyzinat-Zwitterionen und der voranlaufenden mobilen Chloridionen eine Konzentrierung der Proteine in Höhe der Chloridionen erreicht. Im Trenngel liegt ein pH-Wert von 8,8 vor, der eine elektrophoretische Auftrennung der Proteine nach dem Molekulargewicht ermöglicht. Um die optimale Auftrennung der unterschiedlichen Proteine zu ermöglichen, wurden für das Trenngel verschiedene Konzentrationen von

Acrylamid/Bisacrylamid gewählt. Bei großen Proteinen wurde ein 7,5 %-iges Trenngel (große Porenweite), bei kleineren Proteinen ein 12,5 %-iges Trenngel verwendet.

Die Trenngellösung wurde gemischt und nach der Induktion der Polymerisation mit Ammoniumperoxiddisulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) zwischen zwei mit einem Schlauch abgedichteten Glasplatten gegossen. Das noch flüssige Trenngel wurde mit absolutem Ethanol überschichtet, um Luftblasen zu entfernen. Nach der Aushärtung des Trenngels wurde das Ethanol entfernt, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Probenkamm in das Sammelgel eingeführt. Nach dem Aushärten des Sammelgels wurde der Kamm gezogen. Die Proteinproben wurden mit 6 x Probenpuffer vermischt und vor dem Auftragen auf das Sammelgel für 5 min zur Denaturierung aufgekocht. Die Auftrennung erfolgte je nach Proteingröße 1-3 h bei 120 V (kleines Gel) oder über Nacht bei 40-110 V (großes Gel) in TGS-Puffer. Zur Größenabschätzung der aufgetrennten Proteine wurden 20 µL Proteinmarker aufgetragen.

Rotiphoresegel 30	30,0 %	Acrylamid (AA)
	0,8 %	Bisacrylamid (BA)

Trenngellösungen (großes Gel)

	7,5 %	**10 %**	**12,5 %**
30 % AA / 0,8 % BA	7,5 mL	10 mL	12,5 mL
1M Tris/HCl, pH 8,8	11,25 mL	11,25 mL	11,25 mL
$H_2O_{demin.}$	---	8,15 mL	5,65 mL
10 % SDS	300 µL	300 µL	300 µL
10 % APS	200 µL	200 µL	200 µL
TEMED	15 µL	15 µL	15 µL

Sammelgellösung (großes Gel)

	4,5 %
30 % AA / 0,8 % BA	1,5 mL
1M Tris/HCl, pH 6,8	1,25 mL
$H_2O_{demin.}$	7,0 mL
10 % SDS	100 µL
10 % APS	100 µL
TEMED	15 µL

6 x Probenpuffer		50,0 mM	Tris/HCl, pH 6,8
		34,4 %	Glycerin
		10,0 %	SDS
		10,0 %	β-Mercaptoethanol
		0,06 %	Bromphenolblau
			$H_2O_{demin.}$
10 x TGS-Puffer		30,3 g	Tris
		144,0 g	Glycin
		10,0 g	SDS
	ad	1,0 L	$H_2O_{demin.}$

4.3.5 Aufreinigung von Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteinen

Zur Herstellung von Glutathion-S-Transferase (GST) -Fusionsproteinen wurden zunächst die verschiedenen PCR-Produkte (4.1.6) in den Expressionsvektor pGEX-4T-3 kloniert (4.1.5), um anschließend diese Konstrukte in Protease-defiziente Bakterien (*E.coli* BL21) zu transformieren (4.1.5.3). Als Kontrolle dienten Zellen, die nur mit dem leeren Vektor transformiert worden waren und somit nur GST exprimierten.

Es wurden 500 mL LB^{Amp}-Medium mit 5 mL der jeweiligen Übernachtkultur angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 - 0,6 angezüchtet. Zur Induktion der Fusionsprotein-Expression wurde 100 µM IPTG zugegeben und die Bakterien eine weitere Stunde auf dem Schüttler bei 37 °C inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend durch eine zehnminütige Zentrifugation bei 4000 Upm und 4 °C (SLA 3000-Rotor) pelletiert und auf Eis in 25 mL kaltem PBS resuspendiert. Nach der Behandlung mit Ultraschall (4 x 30 sec) wurde 1 % Triton X-100 zugegeben und 30 min bei RT rotiert, wodurch die GST-Fusionsproteine freigesetzt wurden. Die Zelltrümmer wurden durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 12000 × g und 4 °C abgetrennt. Dem proteinhaltigen Überstand wurden 250 µL einer 50 %-igen Glutathion-Sepharose®4B Suspension (Pharmacia Biotech) zugegeben und 30 min bei RT rotiert. Während dieser Inkubation erfolgte die Bindung des Fusionsproteins mit seinem GST-Anteil an das komplementäre Glutathion. Die gebundenen Proteine wurden durch eine Zentrifugation bei 500 × g für 5 min und 4 °C präzipitiert und zweimal mit je 5 mL eiskaltem PBS gewaschen. Das Pellet wurde anschließend in 250 µL E1A-Puffer aufgenommen und bei 4 °C für höchstens eine Woche gelagert.

Auf einem kleinen 12,5 %-igen Polyacrylamidgel wurden jeweils 10 µL der isolierten GST-Fusionsproteine aufgetrennt und in Coomassie Blau angefärbt, um die Menge im Vergleich zum Marker und die Reinheit der Proteine zu bestimmen. Zur Dokumentation wurden die Gele bei 80 °C im Vakuum getrocknet.

Färben von Proteinen mit Coomassie Brilliant Blue R

(50 mg/Tablette; GERBU)

Färbelösung	4 Tabletten in 250 mL 10 % Essigsäure
Entfärber	10 % Essigsäure

4.3.6 Pulldown-Analysen

Zur Isolierung von Interaktionspartnern von Cx43 und zur Überprüfung der Bindung von Cx43 an das Protein „neural precursor cell expressed, developmentally downregulated 4“ (Nedd4) wurden Pulldown-Analysen mit an Glutathion-Sepharose gebundenen GST-Fusionsproteinen (4.3.5) durchgeführt.

Je nach Versuchsansatz wurden jeweils 500 µg oder 6,7 mg E1A-Proteinextrakte (4.3.1.3) mit E1A-Puffer auf ein gleiches Volumen aufgefüllt und mit je 50 – 200 µL der aufgereinigten GST-Fusionsproteine versetzt. Dabei wurde darauf geachtet, dass annähernd die gleiche Menge an GST-Fusionsproteinen in die verschiedenen Ansätze eingesetzt wurden. Abgeschätzt wurde die Menge der isolierten GST-Fusionsproteine auf einem kleinen 12,5 %-igen Polyacrylamid-Testgel, das mit Coomassie Blau angefärbt worden war (4.3.5). Als negative Kontrolle wurde GST ohne Fusionsproteinanteil eingesetzt. Die Ansätze wurden über Nacht bei 4 °C rotiert und die gebundenen Proteine durch eine dreiminütige Zentrifugation bei 3500 Upm (TZ) und 4 °C präzipitiert. Das Pellet wurde anschließend 4 × mit je 500 µL kaltem E1A-Puffer gewaschen, mit 50 µL 6 × Probenpuffer (4.3.4) versetzt und auf ein großes 7,5 %-iges bzw. 12,5 %-iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine über SDS-PAGE (4.3.4) erfolgte über Nacht. Um die gewünschten Proteinbanden mit der „nanoelectrospray ionization mass spectrometry“ analysieren zu können, wurde das Polyacrylamidgel mit Coomassie SimplyBlue™SafeStain (Invitrogen, Groningen, Niederlande) gefärbt. Diese Färbemethode ist annähernd so sensitiv wie eine Silberfärbung. Im Gegensatz zu einem mit Silber gefärbten Polyacrylamidgel liefert ein mit Coomassie SimplyBlue™SafeStain gefärbtes Gel aber wesentlich bessere Ergebnisse in der „nanoelectrospray ionization mass spectrometry“.

Zur Entfernung von Pufferresten wurde das Polyacrylamidgel zunächst 3 × 5 min in $H_2O_{demin.}$ gewaschen. Die Färbung der Protein-enthaltenden Banden erfolgte in 100 mL SimplyBlue™SafeStain für 1 h. Um das Gel von ungebundenem SimplyBlue™SafeStain zu befreien, wurde es in 500 mL $H_2O_{demin.}$ gewaschen. Zur Fixierung der Färbung wurden die 500 mL $H_2O_{demin.}$ nach 1 h mit 100 mL 20 % (w/v) NaCl versetzt und das Gel darin für mindestens 2 h inkubiert.

4.3.7 Peptid-Interaktionsstudien mittels Surface Plasmon Resonance

Die Surface Plasmon Resonance (SPR)-Messung mit einem BIAcore 3000-Gerät ermöglichte die Identifizierung und Charakterisierung einer Bindung zwischen verschiedenen Peptiden (Johnsson *et al.,* 1991; Johnsson und Malmqvist, 1992). Zu den Grundelementen eines BIAcore 3000-Geräts zählen der Sensorchip, ein SPR-Detektor und ein spezielles Flusssystem, mit dem gewährleistet wird, dass der Puffer und die Proben direkt an der Chip-Oberfläche entlang fließen (Abb. 4.1).

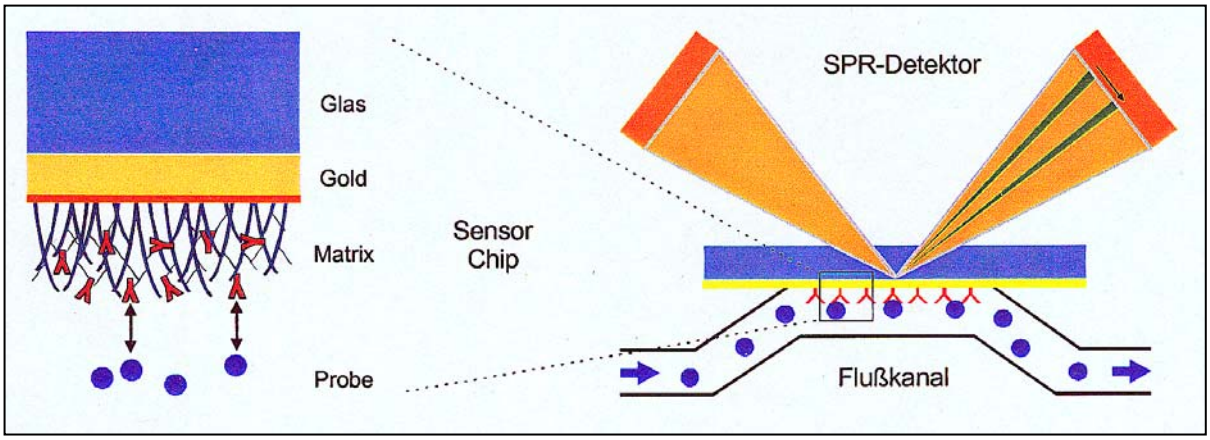


Abb. 4.1: Prinzip der BIAcore-Technologie. Der Sensorchip besteht aus einem Glasträger, einer Goldschicht und der Oberflächenmatrix. Der optische SPR-Detektor liegt an der Glasseite des Chips und misst über den Brechungsindex die „Masse“, die an der Matrix angelagert ist. Bindet eine Probe, so führt dieses direkt zum Signalausschlag.
(aus http://www.fgcz.ethz.ch/technology/biacore.basics.pdf)

Der optische SPR-Detektor liegt an der Glasseite des Chips und misst die Masse, die an der Matrix angelagert ist. Sobald Moleküle in der Probe an Peptide der Chipoberfläche binden, ändert sich die Masse an der Oberfläche und damit der Brechungsindex. Der SPR-Dektor erfasst die Masse des Bindungspartners, wobei er Änderungen von weniger als 1 pg pro mm^2 (≈ 1 RU) registrieren kann. Wird diese Veränderung anschließend gegen die Zeit der Interaktion aufgetragen, ergibt sich eine quantitative Messung der Bindung, die in Resonanz-Einheiten (RU) angegeben wird.

Schon während der Probeninjektion lässt sich erkennen, ob eine Wechselwirkung mit dem immobilisierten Peptid stattfindet. Zu Beginn liefert das Puffersignal eine Basislinie. Während der Probeninjektion kommt es zur Assoziation des Analyten zum Liganden und damit zu einem Signalanstieg. Die Signalhöhe entspricht dabei

der biologisch aktiven Konzentration in der Probe. Nach Ende der Probeninjektion dissoziieren beide Bindungspartner voneinander, wodurch das Signal abfällt. Der Kurvenverlauf gibt damit neben der Bindungsaffinität auch die Dynamik einer Komplexbildung und deren Zerfall wieder. Nach einer kurzen Regenerationszeit pendelt sich das Signal wieder an der Basislinie ein und die Oberfläche steht für die nächsten Messungen zur Verfügung.

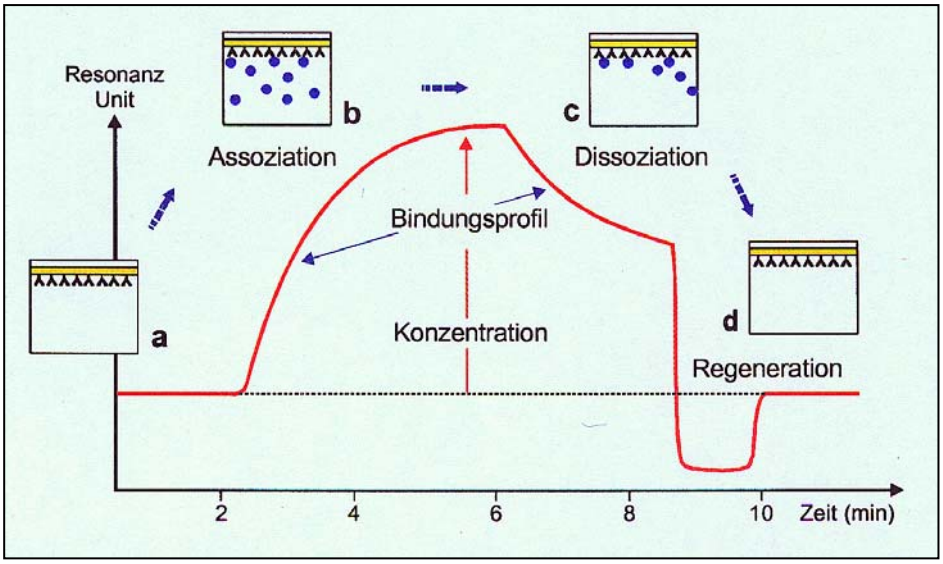


Abb. 4.2: Schematisches Sensorgramm mit Regenerationsphase. Die Kästchen geben den Zustand am Sensorchip, das Diagramm die Anzeige am Bildschirm wieder. **a**, Basislinie im Pufferfluss. **b**, Probeninjektion, Bindung und Signalanstieg. **c**, Dissoziation und Signalabfall im anschließenden Pufferfluss. **d**, Basislinie nach der Regeneration.
(aus http://www.fgcz.ethz.ch/technology/biacore.basics.pdf)

Für die Experimente dieser Arbeit wurden aminoterminal biotinylierte Peptide (Liganden) über eine Biotin-Streptavidin-Bindung irreversibel an die Oberfläche eines SA-Sensorchips gebunden (Abb. 4.3). Der verwendete Streptavidin-beschichtete Sensorchip ist in vier kleinere Quadrate unterteilt, die unterschiedlich beladen werden können. Die Anordnung der Liganden auf dem SA-Sensorchip erfolgte folgendermaßen:

Quadrat 1	**Referenz** (Peptid aus humanem Albumin)
Quadrat 2	**Negativkontrolle** (Peptid aus N-Terminus von Cx43)
Quadrat 3	**Probe 1** (unphosphoryliertes Peptid mit PY-Motiv von Cx43)
Quadrat 4	**Probe 2** (phosphoryliertes Peptid mit PY-Motiv von Cx43)

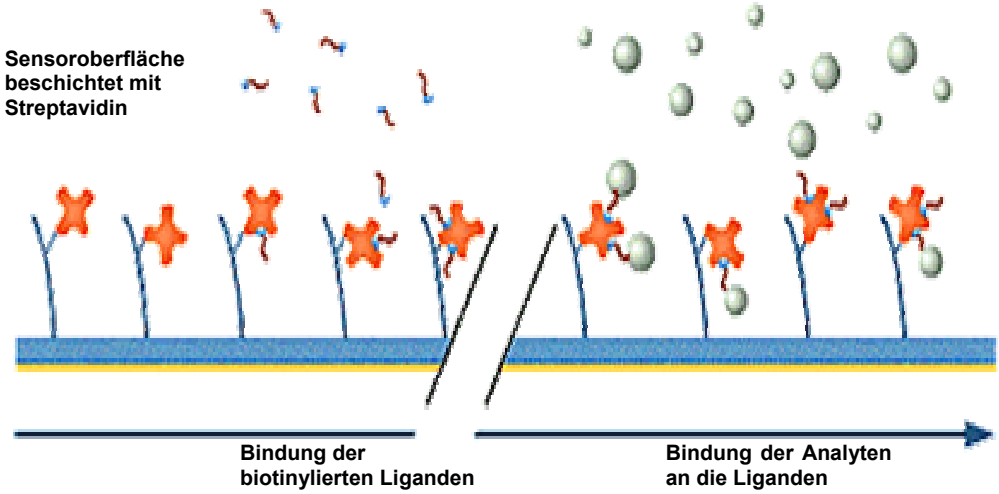


Abb. 4.3: Schematische Darstellung der Oberfläche eines SA-Sensorchips. Bindung biotinylierter Liganden an die Streptavidin-beschichtete Oberfläche eines SA-Sensorchips. Die anschließende Interaktion zwischen den gebundenen Liganden und den Analyten aus der Probe kann mit einem SPR-Detektor gemessen werden.
(modifiziert aus http://www.biacore.com/products/sensorchips/chipsa.lasso)

Um 150-200 RU der biotinylierten Peptide als Liganden auf dem SA-Sensorchip zu immobilisieren, wurden jeweils 40 µL einer 25-50 ng/mL Peptidlösung in das Flusssystem injiziert. Nicht gebundene Liganden wurden in einem Waschschritt mit HBS-EP-Puffer entfernt. Für die eigentlichen Messungen wurden jeweils 45 µL der potentiellen Bindungspartner, die Fusionsproteine GST-WW1, GST-WW2 bzw. GST-WW3, in das Flusssystem injiziert, wobei verschiedene Konzentrationen in einem Intervall von 48,0 µM bis 3,0 mM getestet wurden.

Die Kopplungsreaktion sowie die Messungen wurden gemäß den Protokollen des Herstellers (BIAcore AB, Freiburg) durchgeführt. Die Bindungsstudien erfolgten in HBS-EP-Puffer mit einer Flussrate von 15 µL/min bei RT.

Nach jeder einzelnen Messung wurde die Chipoberfläche mit 30 µL HBS-EP-Puffer bei einer Flussrate von 30 µL/min regeneriert, um die GST-WW-Fusionsproteine, die sich während des Messvorgangs an die Chipoberfläche angelagert hatten, quantitativ zu entfernen. Die SPR-Daten-Analyse wurde von der integrierten BIAcore 3000-Software übernommen.

HBS-EP-Puffer		
	10,0 mM	HEPES, pH 7,4
	150,0 mM	NaCl
	3,0 mM	EDTA
	0,005 %	Surfactant P20
		$H_2O_{demin.}$

Für die Kompetitions-Analysen wurden 0,38 µM GST-WW2 vor der Injektion mit verschiedenen Konzentrationen (98,0 nM – 50,1 µM) des nicht biotinylierten, phosphorylierten Peptids in $H_2O_{demin.}$ versetzt. Nach einer Inkubation für mindestens 15 min bei RT erfolgte die Injektion der Ansätze.

4.4 Immunologische Methoden

4.4.1 Western Blot Analyse

4.4.1.1 Transfer der Proteine auf eine Membran

Zur immunologischen Analyse wurden die in einer SDS-PAGE (4.3.4) aufgetrennten Proteine vom Polyacrylamidgel auf eine Polyvinylidene-Fluoride (PVDF) -Membran übertragen („geblottet“). Hierbei wurde das Halbtrockenblot-Verfahren nach Kyhse-Andersen (1984) angewandt.
Für den Transfer wurde die PVDF-Membran (0,45 µm, Immobilon™-P, Millipore, Eschborn) auf die Größe des Gels zugeschnitten, für 20 sec in Methanol, 2 min in $H_2O_{demin.}$ und mindestens 5 min in EMBL-Puffer getränkt. Das zugeschnittene Whatman® 3 MM-Papier und das Gel selbst wurden ebenfalls mindestens 5 min in EMBL-Puffer inkubiert.

EMBL-Puffer		
	40,0 mM	Tris
	39,0 mM	Glycin
	0,0375 %	SDS
	20,0 %	Methanol
		$H_2O_{demin.}$

Die Komponenten des Blots wurden auf der Anode des “semi-dry-electroblotters” (cti GmbH, Idstein) wie folgt aufgebaut:

Kathode
4 × 3 MM-Papier
Polyacrylamidgel
Membran
4 × 3 MM-Papier
Anode

Die Transferdauer richtete sich nach der Größe des jeweiligen Proteins. Bei großen Proteinen, wie z.B. Nedd4 (116 kD), wurde 1,5 h geblottet, bei kleineren Proteinen, wie Cx43 (43 kD) nur 1 h. Die angelegte Stromstärke in mA wurde aus der Membrangröße wie folgt berechnet: Membranhöhe × Membranbreite × 0,8

4.4.1.2 Unspezifisches Anfärben der Proteine durch Ponceau S

Um die Effizienz der Übertragung zu überprüfen, wurden die Proteine auf der Membran für 2 min mit Ponceau S (Sigma, Taufkirchen) rot angefärbt und durch mehrmaliges Waschen in PBS (4.3.2) wieder entfärbt.

4.4.1.3 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Nach erfolgtem Transfer der Proteine auf die Membran, wurde die Membran zur Absättigung freier Bindungskapazitäten für mindestens 1 h in 5 %-igem Magermilchpulver/PBS-T (0,1 % Tween®20) bei RT oder über Nacht bei 4 °C geblockt. Für den immunologischen Nachweis von bestimmten Proteinen wurde ein spezifischer Erstantikörper für mehrere Stunden bei RT oder über Nacht bei 4 °C mit der Membran inkubiert. Dabei wurde der Antikörper nach den Herstellerangaben in 5 %-igem Magermilchpulver/PBS-T verdünnt und zur Konservierung mit 0,02 % NaN_3 versetzt. Um die Membran von nicht gebundenem Erstantikörper zu befreien, wurde der Blot 4 × 5 min mit PBS-T gewaschen. Es folgte die Inkubation mit einem in 5 %-igem Magermilchpulver/PBS-T verdünnten Meerrettich-Peroxidase (HRP) -gekoppelten Zweitantikörper (je nach Herkunft des Erstantikörpers entweder α-Kaninchen oder α-Maus) für 1 h bei RT. Durch

viermaliges Waschen in PBS-T für je 5 min wurde ungebundener bzw. unspezifisch gebundener Zweitantikörper entfernt.

Durch eine Chemilumineszenz Reaktion (Western Lightning™, Perkin Elmer, Überlingen oder ECL+Plus™, Amersham, Braunschweig) lassen sich die membrangebundenen Proteine über ihre Erst- und Zweitantikörper nachweisen.
Die Darstellung der spezifischen Banden erfolgte dabei durch eine Oxidation von Luminogen PS-3 Acridan durch HRP in Acridiniumester Intermediate, wobei die Intermediate mit H_2O_2 unter alkalischen Bedingungen reagieren und dabei Licht der Wellenlänge 430 nm emittieren. Dieses Licht kann nun von einem geeigneten Autoradiographie-Film (Hyperfilm ECL, Amersham, Braunschweig) aufgefangen werden.

4.4.1.4 Entfernen von Antikörpern von einer Membran durch Strippen

Um nach erfolgter Detektion eines spezifischen Proteins die Präsenz eines zweiten Proteins nachzuweisen, kann die Membran von bereits gebundenen Antikörpern befreit („gestrippt“) werden:

2 × 5 min	$H_2O_{demin.}$
15 min	1 × strip strong Lösung (Chemicon)
2 × 5 min	5 %-iges Magermilchpulver/PBS-T

Der Blot wurde anschließend erneut mit 5 %-igem Magermilchpulver/PBS-T geblockt und wie oben beschrieben mit Antikörpern behandelt.

4.4.2 Indirekte Immunfluoreszenz

Die auf Deckgläschen kultivierten und dem Versuchsaufbau entsprechend behandelten Zellen wurden vor der Inkubation mit den Antikörpern einer Methanol-Aceton-Fixierung unterzogen. Dafür wurden die bewachsenen Deckgläschen zunächst 3 × mit PBS gewaschen und anschließend für 5 min mit absolutem Methanol (-20 °C) und 30 sec mit absolutem Aceton (-20 °C) fixiert und permeabilisiert. Die fixierten Zellen wurden in einer feuchten Kammer mit den

entsprechenden Erstantikörpern für 45 min inkubiert. Verdünnt wurden die Erstantikörper nach den Herstellerangaben in PBS mit 0,3 % Rinderserumalbumin (BSA). Um ungebundene Erstantikörper zu entfernen, wurden die Zellen 3 × in PBS gewaschen. Die Behandlung mit einem Alexa 488- bzw. Alexa 594-gekoppelten Zweitantikörper (1:300 verdünnt in 0,3 % BSA) erfolgte in der feuchten Kammer für 45 min im Dunkeln. Dreimaliges Waschen der Präparate mit PBS und ein einmaliges Waschen mit $H_2O_{demin.}$ verhinderte die Anlagerung von Salzkristallen. Die gefärbten Zellen auf den Deckgläschen wurden anschließend auf einem Objektträger in Fluoprep™ eingedeckt und über Nacht getrocknet. Zum Schutz vor weiterer Austrocknung wurden die Präparate mit Nagellack abgedichtet und im Dunkeln bei 4 °C gelagert. Die Auswertung erfolgte mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (Leica TCS SP).

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung des Antikörpers SA226P

In maligne transformierten Zellen oder in Zellen, die mit verschiedenen Kanzerogenen behandelt wurden, weisen Connexine im Vergleich zu normalen Zellen ein sehr differenzielles Phosphorylierungsmuster auf. Sehr häufig sind diese Unterschiede im Phosphorylierungsmuster der Connexine mit einer verminderten Zell-Zell-Kommunikation assoziiert (Oh *et al.*, 1991; Lau *et al.*, 1992; Hossain *et al.*, 1998). Zudem wurde in Tumorgewebe eine verminderte Anzahl an Connexinen nachgewiesen (Shinoura *et al.*, 1996; Tsai *et al.*, 1996; Hanna *et al.*, 1999; King *et al.*, 2000). Die Menge an Connexin und das Phosphorylierungsmuster des Proteins scheinen demnach im Rahmen der Tumorprogression eine bedeutende Rolle zu spielen.

Für Connexin 43 (Cx43) konnte gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung der Serinreste S279 und S282 ausreicht, um die Zell-Zell-Kommunikation über Gap Junctions zu unterbinden (Warn-Cramer *et al.*, 1996, 1998). Folglich müsste sich mit einem Antikörper, der speziell diese Serinreste in phosphorylierter Form erkennt, die Verteilung und die Funktion der S279/S282-phosphorylierten Cx43-Formen in der Zelle untersuchen lassen.

Spezifische Antikörper gegen die S279/S282-phosphorylierte Form von Cx43 wurden in unserem Auftrag von der Firma Eurogentec hergestellt. Dazu wurde zunächst ein Peptid, das der Sequenz des humanen Cx43 zwischen den Aminosäureresten 271 und 288 entspricht, synthetisch mit der Fmoc-Methode hergestellt. Um eine möglichst naturgetreue Struktur und Ladung zu imitieren, wurde das Peptid als Amid synthetisiert. Die Reinheit des Peptids wurde über eine „high performance liquid chromatography“ (HPLC) ermittelt und die Peptid-Sequenz mittels Massenspektrometrie überprüft. Als Trägerprotein diente das Protein „keyhole limpet hemocyanin“ (KLH), das kovalent an das Peptid gekoppelt wurde. Antikörper gegen das Peptid wurden schließlich in Pathogen-freien Kaninchen erzeugt. Booster-Injektionen erfolgten 14, 28 und 42 Tage nach der Immunisierung. 14 Tage nach der letzten Booster-Injektion erfolgte die finale Blutung der Kaninchen. Die gewonnenen Antikörper wurden durch eine doppelte

Affinitätschromatographie aufgereinigt, wobei die erste Säule mit unphosphoryliertem Peptid beladen war, während in der zweiten Säule die phosphorylierten Peptide an „epoxy-coupled 1,6-Diaminohexane“ (EAH)-Sepharose gekoppelt waren. Als Qualitätskontrolle der aufgereinigten Peptid-spezifischen Antikörper wurde ein „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) und eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) eingesetzt. Der aufgereinigte Antikörper wurde mit der Abkürzung SA226P bezeichnet.

5.1.1 Spezifische Erkennung einer phosphorylierten Form von Cx43 durch den Antikörper SA226P

Um zu überprüfen, ob der SA226P-Antikörper spezifisch die S279/S282-phosphorylierten Formen von Cx43 in unserem System erkennt, wurde der Antikörper zunächst im Western Blot getestet.

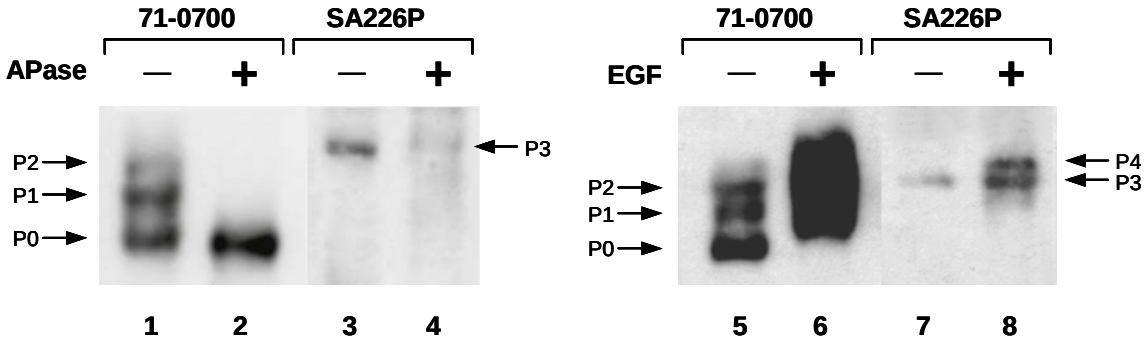


Abb. 5.1: Antikörper SA226P detektiert bestimmte stark phosphorylierte Formen von Cx43.
Links: Je 20 µg Proteinextrakt von konfluenten und ausgehungerten WB-F344 Zellen wurden mit 40 Units (U) alkalischer Phosphatase (APase) für 60 min bei 37°C behandelt (Spur 2 und 4).
Rechts: WB-F344 Zellen wurden ausgehungert und 15 min mit 100 ng/mL epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) behandelt (Spur 6 und 8). Als Kontrolle dienten unbehandelte Proteinextrakte (Spur 1, 3, 5 und 7). Je 20 µg der unbehandelten oder behandelten Proteinextrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und Cx43 im Western Blot mit dem anti-Cx43 Antikörper 71-0700 (Spur 1, 2, 5 und 6) beziehungsweise (bzw.) dem Antikörper SA226P (Spur 3, 4, 7 und 8) nachgewiesen. P0–P4 zeigen die unterschiedlichen Hauptphosphorylierungsformen von Cx43 in WB-F344 Zellen.

In Western Blots von unbehandelten WB-F344 Zellextrakten, die mit dem kommerziell erhältlichen anti-Cx43 Antikörper 71-0700 inkubiert wurden, waren

stets drei Hauptformen von Cx43 zu detektieren (Abbildung (Abb.) 5.1, Spur 1). Die am schnellsten laufende Bande entsprach dabei dem unphosphorylierten Cx43 (P0-Form), während die beiden langsamer laufenden Banden die Phosphorylierungsformen 1 (P1-Form) und 2 (P2-Form) von Cx43 präsentierten (Musil and Goodenough, 1991). Im Unterschied zu Antikörper 71-0700 erkannte Antikörper SA226P nur eine spezifische Form von Cx43 (Abb. 5.1, Spur 3). Da diese Cx43-Form noch etwas langsamer zu laufen schien als die P2-Form, wurde sie Phosphorylierungsform 3 (P3-Form) benannt. Den Beweis, dass es sich bei der detektierten Bande um phosphoryliertes Cx43 handelte, lieferte eine Behandlung des Zellextrakts mit alkalischer Phosphatase, wobei alle Aminosäurereste eines Proteins dephosphoryliert wurden, indem die Phosphatreste abgespalten wurden. Wurde die Membran mit Antikörper 71-0700 inkubiert, war in Western Blots mit behandeltem Zellextrakt ausschließlich die am schnellsten laufende Bande sichtbar. Sämtliche phosphorylierte Formen von Cx43 wurden durch die Abspaltung der Phosphatreste in die unphosphorylierte Form überführt (Abb. 5.1, Spur 2). Nach Inkubation des gleichen Ansatzes mit Antikörper SA226P war lediglich eine sehr geringe Menge von der am langsamsten laufenden Bande zu erkennen (Abb. 5.1, Spur 4). Dieses deutet darauf hin, dass Antikörper SA226P spezifisch eine phosphorylierte Form von Cx43 in unbehandelten WB-F344 Zellextrakten erkannte.

Um diese Ergebnisse zu untermauern, wurden WB-F344 Zellen mit dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) behandelt und ein Western Blot mit den extrahierten Proteinen durchgeführt. Es ist bekannt, dass in EGF-behandelten Zellen die Serine S255, S279 und S282 direkt von aktivierten „mitogen-activated protein kinases“ (MAP Kinasen) phosphoryliert werden (Warn-Cramer *et al.*, 1996, 1998). Da die zur Immunisierung der Kaninchen ausgewählte Peptidsequenz die beiden Serinreste S279 und S282 enthält, wurde mit Antikörper SA226P ein verstärktes Signal in EGF-behandelten Zellen gegenüber unbehandelten Zellen erwartet.

Tatsächlich führte die EGF-Behandlung zu einer drastischen Zunahme der phosphorylierten Formen von Cx43, wohingegen die unphosphorylierte Form nicht mehr zu detektieren war, wie die Inkubation der Membran mit dem anti-Cx43 Antikörper 71-0700 zeigte (Abb. 5.1, Spur 6). Die Inkubation der Membran mit Antikörper SA226P lieferte verglichen mit Kontrollzellen ein signifikant stärkeres

Signal in EGF-behandelten WB-F344 Zellen. Zusätzlich erschien nach der EGF-Behandlung eine noch langsamer laufende Bande (Abb. 5.1, Spur 8; P4), die die Existenz einer Phosphorylierungsform 4 (P4-Form) von Cx43 andeutete.

5.1.2 Immunlokalisation von Cx43 in WB-F344 Zellen

Die Lokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 in der Zelle wurde vor und nach einer EGF-Behandlung mittels indirekter Immunfluoreszenzen analysiert und mit der Lokalisation der anderen Phosphorylierungsformen des Proteins verglichen.

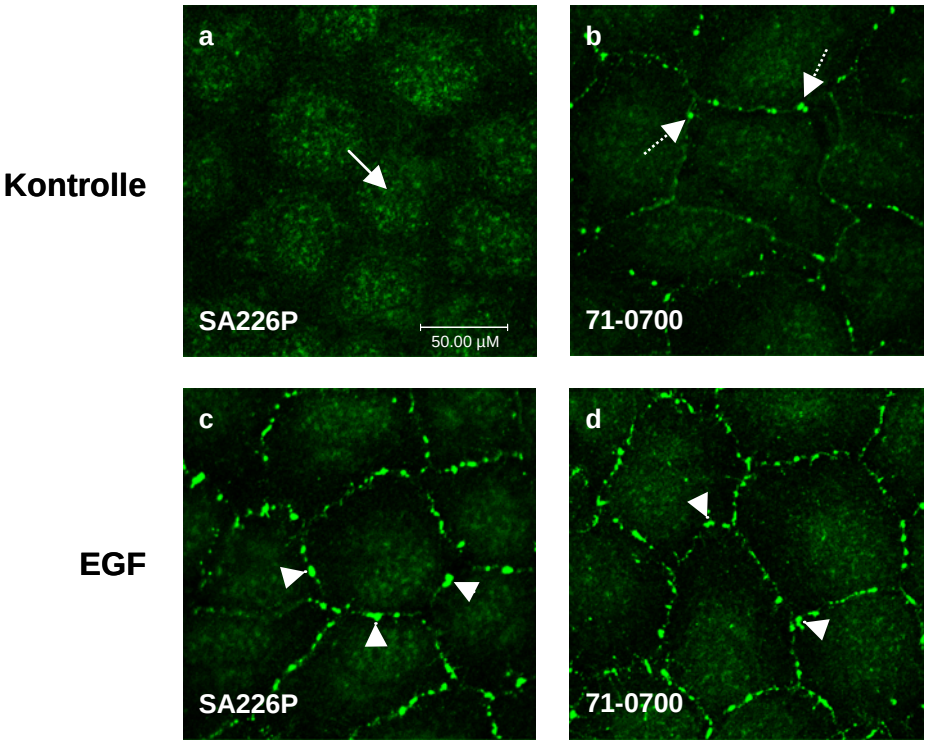


Abb. 5.2: Lokalisation von Cx43 in WB-F344 Zellen. Die Lokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 und anderen Formen dieses Proteins wurde durch eine indirekte Immunfluoreszenz mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop dargestellt. Neben unbehandelten Zellen wurden konfluente und ausgehungerte Zellen für 10 min mit 100 ng/mL EGF behandelt. Die fixierten Zellen wurden mit Antikörper SA226P oder dem anti-Cx43 Antikörper 71-0700 gefärbt. Als sekundärer Antikörper wurde jeweils ein Alexa 488-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen Antikörper eingesetzt. Die Immunfluoreszenz mit Antikörper SA226P ergab in unbehandelten Zellen eine punktuelle Färbung in den Zellkernen (Pfeil). Der anti-Cx43 Antikörper 71-0700 lieferte in unbehandelten Zellen Fluoreszenz-Signale an der Plasmamembran, die typische Gap Junction Plaques darstellen (gestrichelte Pfeile). Nach einer EGF-Behandlung zeigten sich sowohl mit Antikörper SA226P als auch mit Antikörper 71-0700 starke Fluoreszenz-Signale an der Plasmamembran, die eine Lokalisation von phosphoryliertem Cx43 in Gap Junction Plaques vermuten lassen (Pfeilköpfe).

In unbehandelten WB-F344 Zellen zeigte sich eine punktuelle Färbung von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 vor allem in den Zellkernen (Abb. 5.2 a). Das Vorhandensein von Cx43 im Zellkern wurde bereits von de Feijter *et al.* (de Feijter *et al.*, 1996) beschrieben, bislang konnten allerdings keine überzeugenden Beweise dafür erbracht werden. Eine geringe Menge an S279/S282-phosphoryliertem Cx43 war auch im Zytoplasma lokalisiert, während an den Plasmamembranen kein Signal zu detektieren war.

Dagegen lieferte die indirekte Immunfluoreszenz mit dem anti-Cx43 Antikörper 71-0700 hauptsächlich Signale an der Plasmamembran (Abb. 5.2 b). Sehr kleine, schwach fluoreszierende punktähnliche Strukturen und starke Fluoreszenz-Signale, die typische Gap Junction Plaques darstellen, waren in unbehandelten Zellen relativ regelmäßig auf den Plasmamembranen verteilt. Im Zytoplasma zeigte sich eine schwache und gleichmäßige Färbung, die jedoch nicht der Hintergrund-Färbung des Zweitantikörpers entsprach und daher spezifisch sein musste.

Nach einer EGF-Behandlung der Zellen konnten mit dem Antikörper SA226P extrem starke Fluoreszenz-Signale an der Plasmamembran nachgewiesen werden (Abb. 5.2 c). Dieses lässt auf eine Lokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 in den Gap Junction Plaques schließen. Wurden EGF-behandelte Zellen mit dem Antikörper 71-0700 gefärbt, zeigte sich auch hier eine erhöhte Menge an Gap Junction Plaques im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abb. 5.2 d). Ob es sich bei dieser Färbung vorwiegend um S279/S282-phosphorylierte Formen oder andere Phosphorylierungsformen von Cx43 handelte, ließ sich mit diesem Experiment nicht beantworten.

5.1.3 Immunlokalisation von phosphoryliertem Cx43 in EGF-behandelten WB-F344 Zellen

Um die Frage zu beantworten, ob Gap Junction Plaques nach einer EGF-Behandlung hauptsächlich aus S279/S282-phosphoryliertem Cx43 oder aus Cx43-Formen zusammengesetzt sind, die unphosphoryliert beziehungsweise (bzw.) an anderen Aminosäureresten phosphoryliert sind, wurden indirekte Doppelimmunfluoreszenzen durchgeführt. Die Doppelfärbung von Cx43 erfolgte in

WB-F344 Zellen mit dem polyklonalen Antikörper SA226P und dem kommerziell erhältlichen monoklonalen anti-Cx43 Antikörper C13720, der verschiedene Formen von Cx43 erkennt. Der anti-Cx43 Antikörper 71-0700 konnte in diesem Experiment nicht verwendet werden, da es sich um einen polyklonalen Antikörper handelt und damit eine Doppelfärbung mit SA226P nur schwer möglich gewesen wäre.

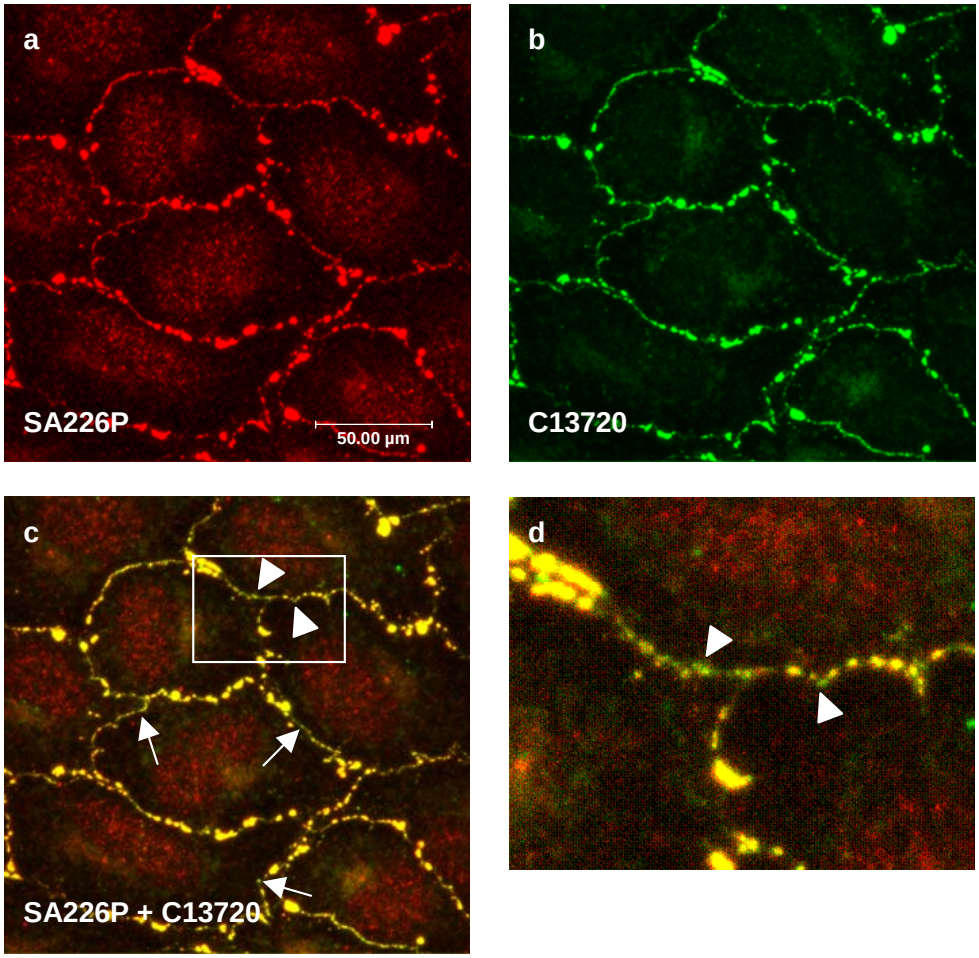


Abb. 5.3: Lokalisation von verschiedenen Cx43-Formen in EGF-behandelten WB-F344 Zellen. Die Lokalisation von Cx43 in WB-F344 Zellen wurde durch eine indirekte Doppelimmunfluoreszenz mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop dargestellt. Konfluente und ausgehungerte Zellen wurden für 10 min mit 100 ng/mL EGF behandelt. Die fixierten Zellen wurden mit Antikörper SA226P und dem kommerziell erhältlichen monoklonalen Antikörper C13720 gefärbt. Als sekundäre Antikörper wurden ein Alexa 594-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen und ein Alexa 488-gekoppelter Ziege-anti-Maus Antikörper eingesetzt. Eine Überlagerung der beiden Färbungen ergab eine gelbe Fluoreszenz. Zwischen der gelben Fluoreszenz an der Plasmamembran blieben kleine grüne Punkte (Pfeile und Pfeilköpfe) erhalten, die auf unphosphoryliertes Cx43 oder auf Formen deuteten, die an anderen Aminosäureresten als S279/S282 phosphoryliert sind. Die genaue Lokalisation dieser Formen wird in dem vergrößerten Ausschnitt deutlicher (Pfeilköpfe). Eine punktuelle rote Färbung wurde innerhalb der Zellen gefunden, scheinbar ohne an Membranen assoziiert zu sein.

Wie bereits unter 5.1.2 gezeigt, konnte mit Antikörper SA226P eine punktuelle Färbung von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 im Zellkern nachgewiesen werden. Zudem wurde nach der EGF-Behandlung eine starke Fluoreszenz an den Plasmamembranen detektiert (Abb. 5.3 a). Ein optisch sehr ähnliches Fluoreszenz-Muster an den Plasmamembranen zeigte sich mit dem anti-Cx43 Antikörper C13720 (Abb. 5.3 b). Um eine Kolokalisation beider Proteine nachweisen zu können, mussten beide Bilder überlagert werden. Befindet sich bei einer Überlagerung das rote und das grüne Signal in unmittelbarer Nähe zueinander, ergibt sich eine gelbe Mischfärbung. Die Überlagerung der beiden Bilder zeigte eindeutig, dass die Gap Junction Plaque Strukturen in EGF-behandelten Zellen hauptsächlich aus S279/S282-phosphorylierten Cx43-Formen zusammengesetzt waren (Abb. 5.3 c). Neben der gelben Färbung waren vereinzelte grüne Fluoreszenz-Signale zu erkennen, die auf unphosphoryliertes Cx43 oder Cx43, welches an anderen Aminosäureresten phosphoryliert war, deuten. Die Lokalisation dieser Formen an der Plasmamembran wird im vergrößerten Teilausschnitt sichtbar (Abb. 5.3 d).

5.1.4 Inhibierung der Phosphorylierung von Cx43 in EGF-stimulierten WB-F344 Zellen durch AG1478 und PD98059

Es stellte sich nun die Frage, ob die Aktivierung des EGF-Rezeptors die S279/S282-Phosphorylierung von Cx43 ausschließlich durch die MAP Kinase „extracellular signal-regulated kinase ½“ (ERK1/2) hervorruft, oder ob auch andere Kinasen dafür verantwortlich sein können.

Ein schematisches Modell der heute gültigen Lehrmeinung ist in Abb. 5.4 dargestellt. Die Bindung eines Liganden an den EGF-Rezeptor führt zu einer Autophosphorylierung des Rezeptors. Das Adaptorprotein „growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2) bindet über seine „Src-Homologie 2“ (SH2) -Domäne an die Tyrosin-phosphorylierten Autophosphorylierungsstellen des EGF-Rezeptors. Der mit den „Src-Homologie 3“ (SH3) -Domänen von Grb2 komplexierte Guanosin-Nukleotid Austauschfaktor „Son of sevenless“ (SOS) gelangt somit an die Plasmamembran und kann durch einen Austausch des Ras-gebundenen Guanosin-Diphosphats (GDP) gegen Guanosin-Triphosphat (GTP) das dort

verankerte Ras aktivieren (Margolis und Skolnik, 1994). GTP-bindendes Ras aktiviert indirekt die Serin/Threonin-Kinase Raf und bewirkt weiter eine kaskadenartige Aktivierung der „mitogen-activated protein kinase/ERK1/2 kinase“ (MEK1) und der MAP Kinase ERK1/2 (Schlessinger, 2000). Cx43 ist ein zelluläres Zielprotein der aktivierten MAP Kinase ERK1/2 und wird von dieser an den beiden Serinresten S279 und S282 phosphoryliert (Warn-Cramer *et al.*, 1996, 1998; Cameron *et al.*, 2003).

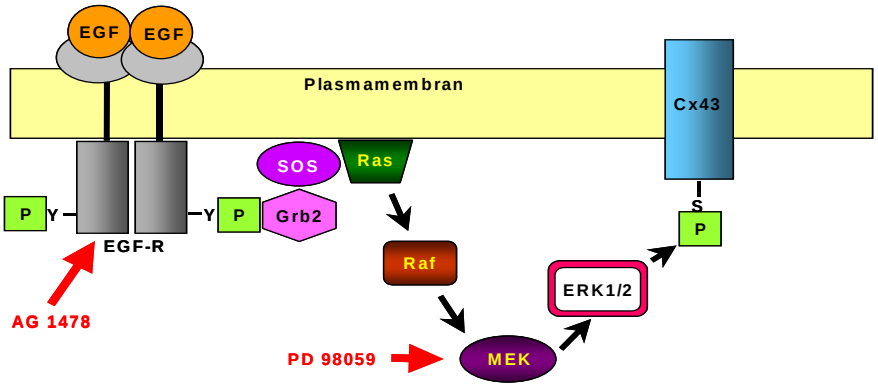


Abb. 5.4: Modell des derzeit bekannten Signaltransduktionswegs zwischen EGF-Rezeptor und Cx43. Die Liganden-abhängige Aktivierung des EGF-Rezeptors führt zur Autophosphorylierung des Rezeptors. Damit bilden sich Phosphotyrosin-Bindestellen für Adaptor-Proteine wie Grb2/SOS. Eine Bindung von Grb2/SOS an den EGF-Rezeptor resultiert in der Aktivierung des Ras/Raf/MEK1/ERK1/2-Signaltransduktionsweges und führt zu einer Serin-Phosphorylierung von Cx43. AG1478 und PD98059 sind Inhibitoren, die an verschiedenen Stellen des Ras/Raf/MEK1/ERK1/2-Signaltransduktionsweges angreifen. AG1478 inhibiert die Tyrosinkinase des EGF-Rezeptors, PD98059 inhibiert MEK1. (modifiziert nach Warn-Cramer und Lau, 2004)

Um eine Beziehung zwischen dem aktivierten EGF-Rezeptor und der Phosphorylierung von Cx43 in unserem System zu analysieren, wurden Versuche mit den Inhibitoren AG1478 und PD98059 durchgeführt, die an verschiedenen Stellen des Signaltransduktionsweges angreifen. Während AG1478 einen selektiven Inhibitor der EGF-Rezeptor Tyrosinkinase darstellt (Osherov und Levitzki, 1994), handelt es sich bei PD98059 um eine synthetische Verbindung, die spezifisch MEK1, eine ERK1/2-aktivierende MAP Kinase Kinase, inhibiert (Alessi *et al.*, 1995; Dudley *et al.*, 1995). Nach der Behandlung von konfluenten und ausgehungerten WB-F344 Zellen mit den Inhibitoren sowie EGF wurden Western Blots mit den anti-Cx43 Antikörpern SA226P und 71-0700 durchgeführt.

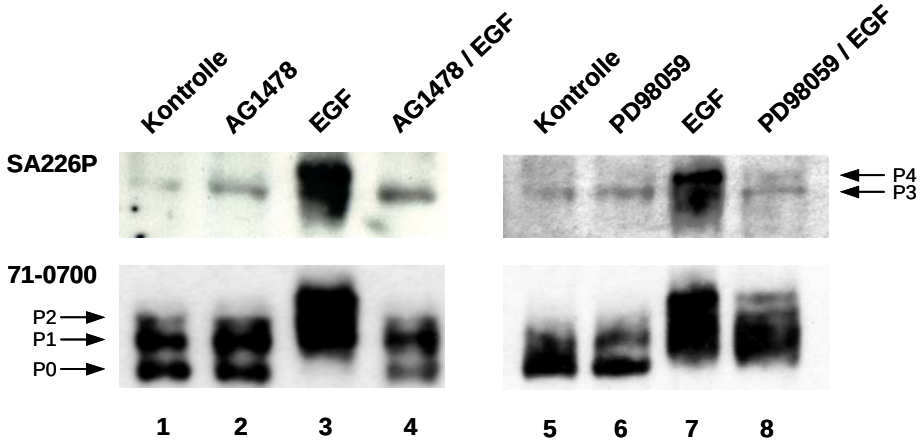


Abb. 5.5: Inhibierung der EGF-vermittelten Cx43-Phosphorylierung durch AG1478 und PD98059. Konfluente WB-F344 Zellen wurden ausgehungert und für 10 min mit 100 ng/mL EGF behandelt (Spur 3, 4, 7 und 8). 20 min vor Zugabe von EGF wurde dem Medium AG1478 mit einer Endkonzentration von 20 µM zugeführt (Spur 4). PD98059 wurde mit einer Endkonzentration von 50 µM 50 min vor der EGF-Behandlung zugesetzt (Spur 8). Unbehandelte Zellen (Spur 1 und 5), AG1478- (Spur 2) und PD98059-behandelte Zellen (Spur 6) wurden als Kontrollen verwendet. Je 20 µg der Proteinextrakte der Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Cx43 wurde mit den Antikörpern SA226P (oben) bzw. 71-0700 (unten) im Western Blot nachgewiesen. Während AG1478 eine durch EGF verursachte Phosphorylierung von Cx43 vollständig verhinderte, zeigte PD98059 nur eine partielle Inhibierung der EGF-vermittelten Phosphorylierung. P0–P4 zeigen die unterschiedlichen Hauptphosphorylierungsformen von Cx43 in WB-F344 Zellen.

Wurden die Zellen mit einem der Inhibitoren behandelt, zeigte sich kein Unterschied im Phosphorylierungsmuster von Cx43 im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abb. 5.5, Spur 2 und 6). Eine EGF-Behandlung der Zellen verursachte einen Wechsel von unphosphoryliertem Cx43 zur P1-Form oder noch langsamer laufenden Formen (Abb. 5.5, Spur 3 und 7, unten). Wie bereits unter 5.1.1 beschrieben, erzeugte die Inkubation der WB-F344 Zellen mit EGF eine neue, sehr langsam im Gel laufende Bande, die von Antikörper SA226P erkannt und die als P4-Form bezeichnet wurde (Abb. 5.5, Spur 3 und 7, oben). Die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit EGF und AG1478 lieferte ein mit unbehandelten Zellen vergleichbares Cx43-Phosphorylierungsmuster (Abb. 5.5, Spur 4). Der Inhibitor AG1478 verhinderte damit vollständig die durch EGF verursachte Phosphorylierung von Cx43.

Die Hemmung der Kinase MEK1 durch PD98059 inhibierte nur teilweise die EGF-vermittelte Phosphorylierung von Cx43 (Abb. 5.5, Spur 8). Die Signalstärke der S279/S282-phosphorylierten P3-Form von Cx43 nach gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit EGF und PD98059 entsprach der Bande der Kontrollzellen. Dagegen ließ sich das EGF-bedingte Auftreten der P4-Form von

Cx43 nicht vollständig durch PD98059 verhindern (Abb. 5.5, Spur 8, oben). Auch das Phosphorylierungsmuster der unbehandelten Zellen, das durch den anti-Cx43 Antikörper 71-0700 detektiert wurde, konnte durch eine EGF/PD98059-Behandlung nicht wieder hergestellt werden. Es war keine unphosphorylierte Form von Cx43 nachzuweisen. Zudem existierten noch mehrere phosphorylierte Cx43-Formen, die nicht eindeutig der P1- oder P2-Form zugeordnet werden konnten (Abb. 5.5, Spur 8, unten). Man kann daher davon ausgehen, dass neben MEK1 auch weitere Kinasen über andere Signaltransduktionswege zu einer EGF-vermittelten Phosphorylierung von Cx43 führen.

Um den Effekt von AG1478 und PD98059 auf die Lokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 in der Zelle zu untersuchen, wurden indirekte Immunfluoreszenz-Experimente mit den anti-Cx43 Antikörpern SA226P und 71-0700 durchgeführt. Hierfür wurden konfluente und Serum-deprivierte WB-F344 Zellen mit EGF (Abb. 5.6, b, b'), AG1478 (Abb. 5.6, c, c'), PD98059 (Abb. 5.6, e, e') oder einer Kombination von EGF und AG1478 (Abb. 5.6, d, d') bzw. EGF und PD98059 (Abb. 5.6, f, f') behandelt.

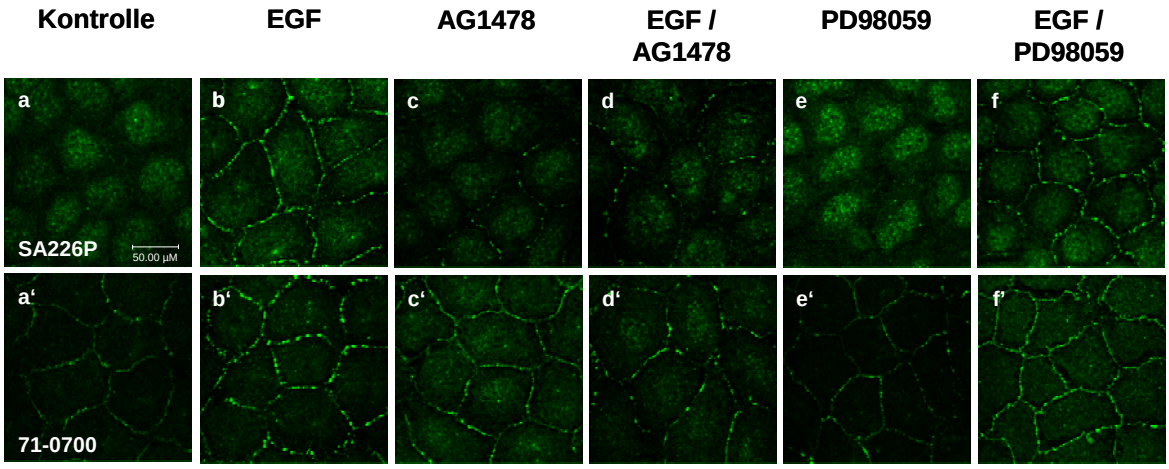


Abb. 5.6: Auswirkungen von AG1478 und PD98059 auf die Lokalisation von Cx43 in WB-F344 Zellen. Die Lokalisation von Cx43 in WB-F344 Zellen wurde durch indirekte Immunfluoreszenz mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop dargestellt. Konfluente und ausgehungerte Zellen wurden mit 100 ng/mL EGF für 10 min (b und b'), mit 20 µM AG1478 für 30 min (c und c'), mit 50 µM PD98059 für 1 h (e und e'), oder einer Kombination aus EGF und AG1478 (d und d') oder EGF und PD98059 (f und f') behandelt. In a und a' sind unbehandelte Kontrollzellen gezeigt. a-f: Inkubation mit Antikörper SA226P. a'-f': Inkubation mit anti-Cx43 Antikörper 71-0700, der sowohl unphosphoryliertes wie auch phosphoryliertes Cx43 erkennt. Als sekundärer Antikörper wurde jeweils ein mit Alexa 488-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen Antikörper eingesetzt. AG1478 verhinderte nahezu vollständig die Bildung von Gap Junction Plaques aus S279/S282-phosphoryliertem Cx43. PD98059 wirkte sich dagegen kaum inhibierend auf die Gap Junction Strukturen aus.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen des Western Blots ergaben auch die indirekten Immunfluoreszenzen, dass EGF zu einem verstärkten Auftreten von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 an den Plasmamembranen führte (Abb. 5.6 b). Die Inhibitoren AG1478 bzw. PD98059 hatten keinen signifikanten Effekt auf das Phosphorylierungsmuster und die Lokalisation von Cx43 (Abb. 5.6 c und e). Eine EGF-bedingte S279/S282-Phosphorylierung von Cx43 an den Plasmamembranen konnte nahezu vollständig durch AG1478 verhindert werden (Abb. 5.6 d). PD98059 wirkte sich dagegen kaum inhibierend auf die durch EGF verursachte S279/S282-Phosphorylierung von Cx43 und die Lokalisation dieser Formen in den Gap Junction Strukturen aus (Abb. 5.6 f).

Damit bestätigten die Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenz sowie die Ergebnisse des Western Blots die Annahme, dass das Signal zur S279/S282-Phosphorylierung von Cx43 nicht ausschließlich über den klassischen Ras/Raf/MEK1/ERK1/2-Signaltransduktionsweg übertragen wird. Neben der Aktivierung von ERK1/2 durch MEK1 scheint es zudem eine Interaktion von weiteren Kinasen mit ERK1/2 oder anderen MAP Kinasen zu geben, die ebenfalls Cx43 phosphorylieren können.

Da der anti-Cx43 Antikörper 71-0700 verschiedene Formen von Cx43 erkennt, konnten Unterschiede in der Lokalisation von unphosphoryliertem und phosphoryliertem Cx43 vor und nach der Behandlung nicht verglichen werden. Einzig eine „Verschiebung“ der Lokalisation des Proteins vom Zytoplasma an die Plasmamembran wurde beobachtet. Diese Verschiebung äußerte sich dadurch, dass im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abb. 5.6 a’) nach der Behandlung mit EGF wesentlich mehr Gap Junction Plaques an den Plasmamembranen sichtbar waren (Abb. 5.6 b’).

5.2 Identifikation und Charakterisierung der Interaktion zwischen Cx43 und der Ubiquitin-Protein-Ligase Nedd4

Einschließlich der Kinasen, die Cx43 an den verschiedenen Serin- und Tyrosinresten phosphorylieren, wurden bislang 22 Proteine beschrieben, die direkt mit dem zytoplasmatischen Carboxy-Terminus (C-Terminus) von Cx43 interagieren (Hervé *et al.*, 2004). Dass die Phosphorylierung von Cx43 an bestimmten Aminosäureresten eine wichtige Rolle bei der Interaktion von Cx43 mit anderen zellulären Proteine spielt, wurde am Beispiel des Proteins Zonula occludens 1 (ZO-1) gezeigt. ZO-1 bindet an den C-Terminus von Cx43. Sobald jedoch der Tyrosinrest Y265 phosphoryliert vorliegt, führt das zu einem Verlust der Bindung (Toyofuku *et al.*, 2001).
Um zu überprüfen, ob sich möglicherweise die S279/S282-Phosphorylierung regulierend auf bestehende Interaktionen zwischen Cx43 und anderen zellulären Proteinen auswirkt, wurden zunächst neue Bindungspartner von Cx43 gesucht.

5.2.1 Bindung des C-Terminus von Cx43 an Nedd4

Um neue zelluläre Interaktionspartner von Cx43 zu finden, wurden Pulldown-Experimente mit Glutathion-S-Transferase (GST) -Fusionsproteinen des zytoplasmatischen Amino-Terminus (N-Terminus) bzw. C-Terminus von Cx43 durchgeführt. Zur Herstellung der beiden GST-Fusionsproteine GST-Cx43 NT und GST-Cx43 CT wurde die DNA-Sequenz des N- bzw. C-Terminus von Cx43 zunächst mittels einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden schließlich über die Schnittstellen *Bam*HI und *Eco*RI in den bakteriellen Vektor pGEX-4T-3 kloniert, so dass der GST-Anteil des Fusionsproteins N-terminal exprimiert wird. In Abb. 5.7 ist eine schematische Darstellung von Cx43 und den verwendeten GST-Fusionsproteinen GST-Cx43 NT und GST-Cx43 CT gezeigt.

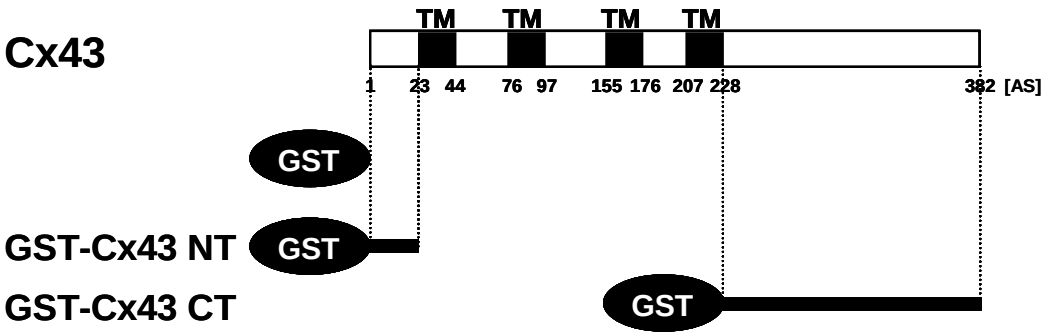


Abb. 5.7: Schematische Darstellung von Cx43 und den verwendeten GST-Fusionsproteinen. Die vier Transmembrandomänen sind als schwarze Kästchen abgebildet. Während das GST-Fusionsprotein GST-Cx43 NT die ersten 22 Aminosäuren von Cx43 umfasst, wurden bei GST-Cx43 CT die letzten 154 Aminosäuren an den GST-Anteil gekoppelt.

Die beiden GST-Fusionsproteine wurden in *E. coli* exprimiert und nach der Aufreinigung an Glutathion-Sepharose gebunden. Die anschließenden Pulldown-Analysen wurden mit einem Zellextrakt aus WB-F344 Zellen im Batch-Verfahren durchgeführt. Entstandene Komplexe aus Sepharose, GST-Fusionsproteinen und Interaktionspartnern wurden auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und die aufgetrennten Proteine mit Coomassie gefärbt.

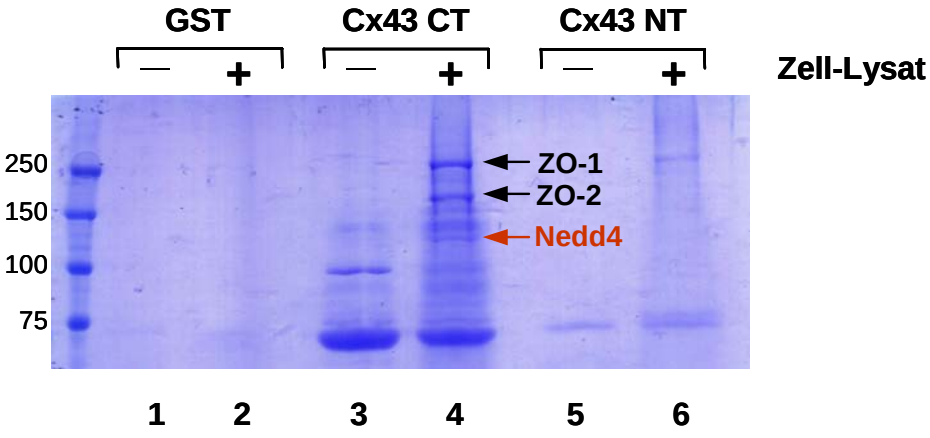


Abb. 5.8: Interaktion der Proteine ZO-1, ZO-2 und Nedd4 mit dem C-Terminus von Cx43. GST-Fusionsproteine des N- und des C-Terminus von Cx43 wurden mit Proteinextrakten aus WB-F344 Zellen inkubiert. Gebundene Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Als Negativkontrolle diente rekombinantes GST (Spur 1 und 2). Ansätze, die mit Puffer statt mit Proteinextrakten inkubiert wurden, waren weitere Kontrollen (Spur 1, 3 und 5). Über „nanoelectrospray ionization mass spectrometry“ wurden die Proteine Zonula occludens 1 (ZO-1), Zonula occludens 2 (ZO-2) und das Protein „neural precursor cell expressed, developmentally downregulated 4“ (Nedd4) als Bindepartner des C-Terminus von Cx43 identifiziert.

Als Negativkontrolle wurde GST ohne Fusionsproteinanteil eingesetzt (Abb. 5.8, Spur 1 und 2). Weitere Kontrollen stellten die Ansätze dar, die mit Puffer anstelle von Zell-Lysat inkubiert wurden (Abb. 5.8, Spur 1, 3 und 5).

Für eine genaue Identifikation der mit Cx43 interagierenden Proteine wurden diejenigen Banden ausgewählt, die ausschließlich nach der Inkubation mit dem Zell-Lysat detektiert wurden. Um die gebundenen Proteine zu identifizieren, wurden die Banden aus dem Gel ausgeschnitten und die daraus eluierten Proteine anhand einer „nanoelectrospray ionization mass spectrometry“ (nanoESI-MS) bestimmt. Durch eine anschließende Computeranalyse mit der Suchmaschine Mascot (Matrix Science, London, England) konnten drei der analysierten Proteine eindeutig identifiziert werden. Alle drei detektierten Proteine banden an den C-Terminus von Cx43. Bei den zwei größeren Proteinen handelte es sich um die Tight Junction Proteine ZO-1 und ZO-2, von denen bereits bekannt war, dass sie in GST-Pulldown-Experimenten an den C-Terminus von Cx43 binden (Toyofuku *et al.*, 1998; Giepmans *et al.*, 2001a; Singh und Lampe, 2003). Das dritte Protein wurde eindeutig als das Protein „neural precursor cell expressed, developmentally downregulated 4“ (Nedd4) identifiziert. Von der Ubiquitin-Protein-Ligase Nedd4 ist bekannt, dass sie einen Ubiquitin-abhängigen Abbau von Membranproteinen verursacht (Staub *et al.*, 1996, 1997; Abriel *et al.*, 2000; Schwake *et al.*, 2001).

Um den Befund zu bestätigen, dass Nedd4 an das C-terminale Ende von Cx43 bindet, wurden erneut Pulldown-Analysen mit den GST-Fusionsproteinen GST-Cx43 NT und GST-Cx43 CT durchgeführt, wobei Nedd4 im anschließenden Western Blot mit einem anti-Nedd4 Antikörper detektiert wurde.

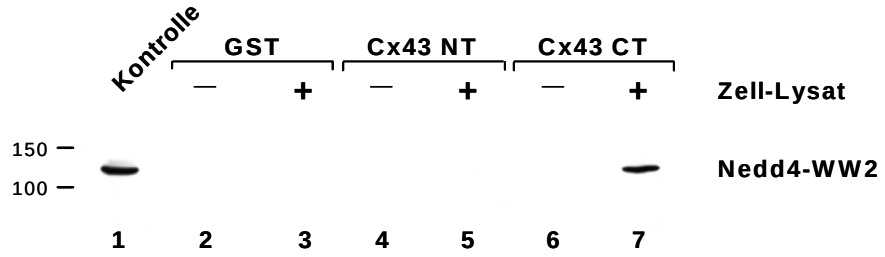


Abb. 5.9: Nedd4 bindet *in vitro* an den C-Terminus von Cx43. GST-Fusionsproteine des N- und des C-Terminus von Cx43 wurden mit Proteinextrakten aus WB-F344 Zellen inkubiert. Gebundene Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und Nedd4 im Western Blot mit einem polyklonalen anti-Nedd4 Antikörper nachgewiesen. Als Größenkontrolle für Nedd4 wurden 50 µg Proteinextrakt aus unbehandelten WB-F344 Zellen aufgetragen. Rekombinantes GST diente als Negativkontrolle (Spur 2 und 3). Ansätze, die mit Puffer statt mit Proteinextrakten inkubiert wurden, waren weitere Kontrollen (Spur 2, 4 und 6). Nedd4 band ausschließlich an den C-Terminus von Cx43.

Wie in Abb. 5 .9 gezeigt, band der C-Terminus von Cx43 an ein Protein, das mit dem anti-Nedd4 Antikörper reagierte (Abb. 5.9, Spur 7). Dagegen konnte keine Bande beobachtet werden, wenn der Cx43 N-Terminus (Abb. 5.9, Spur 5) oder GST allein (Abb. 5.9, Spur 3) in die Pulldown-Analysen eingesetzt wurden.
Das Ergebnis des Western Blots bestätigte damit die nanoESI-MS Analyse und zeigte, dass der C-Terminus von Cx43 *in vitro* mit Nedd4 interagiert.

5.2.2 Bindung der Nedd4 Domänen WW2 und WW3 an Cx43

Alle Proteine der Nedd4-Familie zeichnen sich durch einen variablen N-Terminus, eine C2-Domäne, zwei bis vier WW-Domänen und eine carboxyterminale „homolog zum E6-AP C-Terminus“ (HECT) -Domäne aus. Während die C2-Domäne in einer Ca^{2+}-abhängigen Weise an Membranstrukturen bindet, stellt die HECT-Domäne die katalytische Region des Proteins dar. WW-Domänen sind Protein-Protein-Interaktions-Domänen mit einer Länge von 38-40 Aminosäuren, die neben einem konservierten Prolinrest stets zwei konservierte Tryptophanreste aufweisen. WW-Domänen setzen sich aus drei antiparallelen ß-Faltblatt-Strukturen zusammen und bilden damit eine hydrophobe Bindeoberfläche, die hauptsächlich an Prolin-reiche Sequenzen des Zielproteins binden (Chen und Sudol, 1995; Jung *et al.*, 1995; Staub *et al.*, 1996).

Um zu untersuchen, welche der WW-Domänen von Nedd4 in der Lage waren, an Cx43 zu binden, wurden GST-Fusionsproteine der einzelnen WW-Domänen hergestellt. Die eingesetzten Domänen WW1, WW2 und WW3 entsprachen den WW-Domänen von Nedd4 der Ratte (rNedd4), da die Pulldown-Experimente mit Lysaten von Rattenleber-Zellen (WB-F344 Zellen) durchgeführt wurden.
Nach Expression der Fusionsproteine in *E. coli* und anschließender Aufreinigung, wurden die drei verschiedenen WW-Domänen über den GST-Anteil des Fusionsproteins an Glutathion-Sepharose gebunden und mit einem Zell-Lysat aus WB-F344 Zellen inkubiert. Nach der Auftrennung der an die einzelnen WW-Domänen gebundenen Proteine auf einem SDS-Gel wurde ein Western Blot durchgeführt. Um eine Bindung der einzelnen WW-Domänen speziell an Cx43 zu detektieren, wurde Cx43 mit dem anti-Cx43 Antikörper 71-0700 nachgewiesen.

Als Größenkontrolle für Cx43 diente ein Zellextrakt von unbehandelten WB-F344 Zellen. Als Negativkontrolle wurde erneut GST ohne Fusionsproteinanteil eingesetzt (Abb. 5.10, Spur 8 und 9). Ansätze, die mit Puffer anstelle von Zell-Lysat inkubiert wurden, bildeten weitere Kontrollen (Abb. 5.10, Spur 2, 4, 6 und 8). Wie in Abb. 5.10 A dargestellt, banden die WW-Domänen 2 und 3 an Cx43. Die WW1-Domäne von Nedd4 zeigte dagegen keine signifikante Bindung an Cx43 (Abb. 5.10 A, Spur 3). Während die WW2-Domäne hauptsächlich mit unphosphoryliertem Cx43 interagierte (Abb. 5.10 A, Spur 5), band die WW3-Domäne etwa zu gleichen Teilen unphosphoryliertes und phosphoryliertes Cx43 (Abb. 5.10 A, Spur 7). Diese Ergebnisse bestätigten die direkte Interaktion von Nedd4 mit Cx43 (Abb. 5.8 und 5.9) und ließen WW2 und WW3 als verantwortliche Domänen für eine Bindung von rNedd4 an rCx43 erkennen.

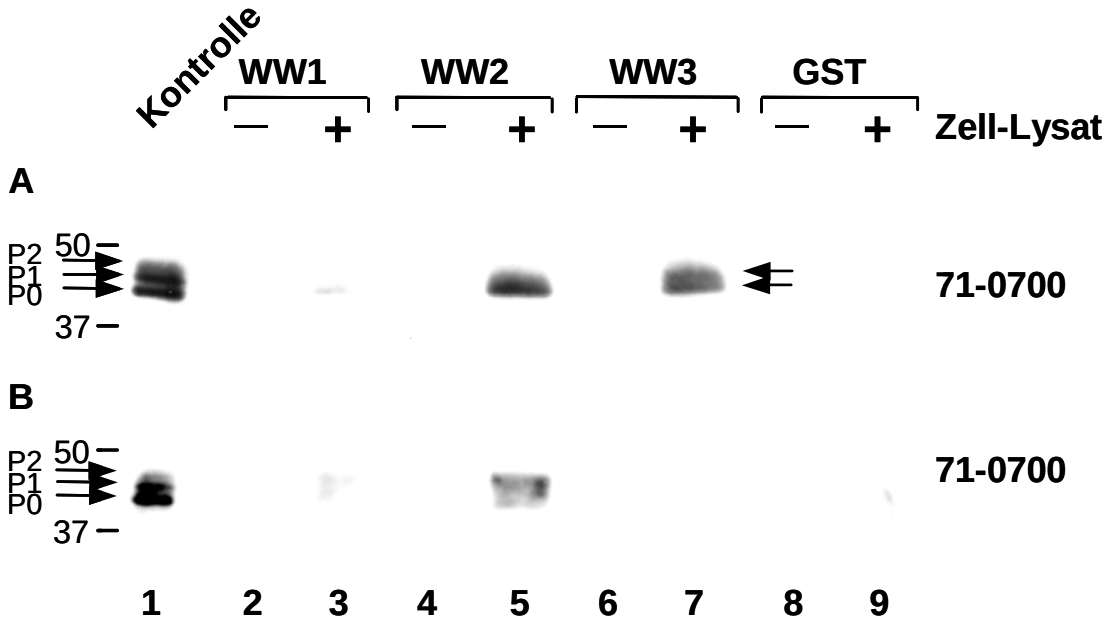


Abb. 5.10: Cx43 bindet *in vitro* die Domänen WW2 und WW3 von Nedd4. GST-Fusionsproteine der Nedd4-Domänen WW1, WW2 und WW3 wurden mit Proteinextrakten aus unbehandelten WB-F344 Zellen (A) oder ausgehungerten WB-F344 Zellen (B) inkubiert. Gebundene Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und Cx43 im Western Blot mit dem anti-Cx43 Antikörper 71-0700 nachgewiesen. In Spur 1 wurde 20 µg Proteinextrakt aus WB-F344 Zellen als Größenkontrolle für Cx43 aufgetragen. Als Negativkontrolle diente GST ohne eine WW-Domäne (Spur 8 und 9). Ansätze, die mit Puffer statt mit Proteinextrakten inkubiert wurden, stellten weitere Kontrollen dar (Spur 2, 4, 6 und 8). P0–P2 zeigen die unterschiedlichen Hauptphosphorylierungsformen von Cx43 in WB-F344 Zellen. Sowohl Domäne WW2 wie auch WW3 binden an Cx43, wobei die WW3-Domäne in einer Serum-abhängigen Weise zu binden scheint.

Aus den Ergebnissen ergab sich nun die Frage, ob die Interaktionen zwischen Cx43 und den rNedd4-Domänen WW2 bzw. WW3 durch Bestandteile des fötalen Kälberserums beeinflusst werden konnten. Um dies zu überprüfen, wurden Extrakte von Serum-ausgehungerten WB-F344 Zellen in den Pulldown-Analysen verwendet.
Wie in Abb. 5.10 B zu sehen, war neben der Domäne WW1 in ausgehungerten WB-F344 Zellen auch Domäne WW3 nicht mehr in der Lage, an Cx43 zu binden (Abb. 5.10 B, Spur 7). Einzig die Domäne WW2 von rNedd4 behielt unter diesen Bedingungen die Fähigkeit, an Cx43 zu binden (Abb. 5.10 B, Spur 5). Während die WW2-Domäne in Zellen, die in serumhaltigem Medium kultiviert wurden, hauptsächlich an die unphosphorylierten Formen von Cx43 band (Abb. 5.10 A, Spur 5), schien WW2 in ausgehungerten Zellen überraschenderweise eine Bindung zur P2-Form von Cx43 zu favorisieren (Abb. 5.10 B, Spur 5).

Die Behandlung ausgehungerter WB-F344 Zellen mit EGF, die eine durch MAP Kinasen vermittelte Phosphorylierung von Cx43 u.a. an den Serinresten S279 und S282 hervorruft, führte zu einer Wiederherstellung der Bindung zwischen der WW3-Domäne von rNedd4 und Cx43 (Abb. 5.11 A, Spur 10). Zudem zeigte sich, dass die WW3-Domäne in EGF-behandelten WB-F344 Zellen in einem größeren Ausmaß an Cx43 band als die WW2-Domäne (Abb. 5.11 A, Spur 8).
Inkubierte man einen vergleichbaren Western Blot mit Antikörper SA226P, der, wie unter 5.1. beschrieben, spezifisch die S279/S282-phosphorylierten Formen von Cx43 erkennt, zeigte sich eine Bindung von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 sowohl an WW2 als auch an WW3 (Abb. 5.11 B, Spur 8 und 10). Da beide Antikörper unterschiedliche Affinitäten zu ihren Zielproteinen besitzen, ließen sich die Signale der beiden Western Blots nicht miteinander vergleichen. Demnach war keine Aussage darüber möglich, welche der phosphorylierten Formen von Cx43 am effizientesten an die WW-Domänen von rNedd4 band.
Diese Ergebnisse weisen aber darauf hin, dass eine Bindung von rNedd4 an Cx43 über die WW-Domänen 2 und 3 erfolgt. Ferner scheint eine Bindung zwischen der WW3-Domäne von rNedd4 und Cx43 in einer bisher nicht geklärten Weise vom Phosphorylierungsstatus von Cx43 abzuhängen.

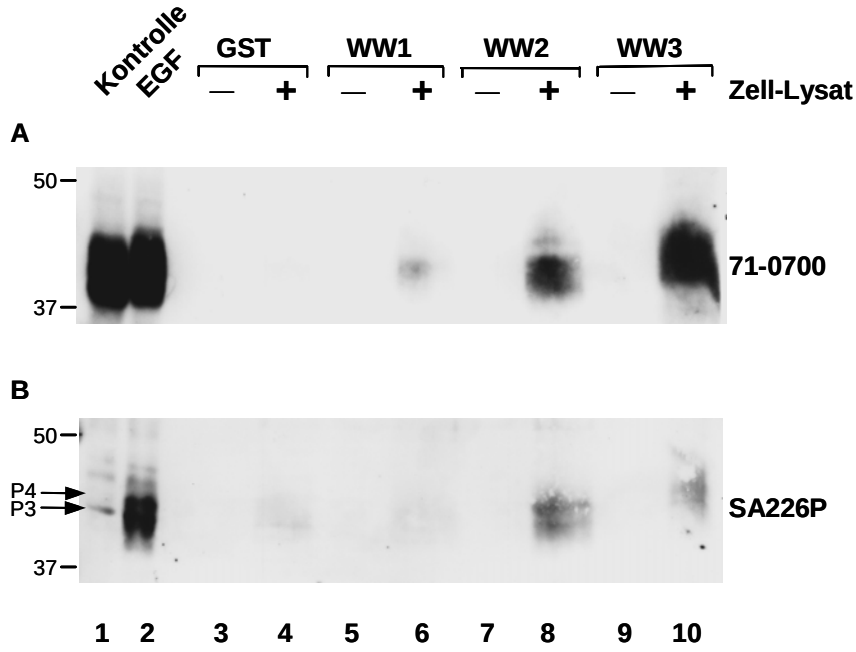


Abb. 5.11: Nedd4-Domänen WW2 und WW3 binden an verschiedene phosphorylierte Formen von Cx43. Konfluente und ausgehungerte WB-F344 Zellen wurden mit 100 ng/mL EGF für 15 min behandelt, bevor ihre Proteinextrakte mit GST-Fusionsproteinen der Domänen WW1, WW2 und WW3 von Nedd4 inkubiert wurden. Gebundene Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und Cx43 im Western Blot mit den anti-Cx43 Antikörpern 71-0700 (A) und SA226P (B) nachgewiesen. Als Größenkontrolle für Cx43 wurden jeweils 20 µg Proteinextrakt aus unbehandelten (Spur 1) und EGF-behandelten (Spur 2) WB-F344 Zellen aufgetragen. GST ohne eine WW-Domäne (Spur 3 und 4) diente als Negativkontrolle. Ansätze, die mit Puffer statt mit Proteinextrakten inkubiert wurden, waren weitere Kontrollen (Spur 3, 5, 7 und 9). P3 und P4 zeigen die beiden hyperphosphorylierten Formen von Cx43, die ausschließlich von Antikörper SA226P erkannt werden. Die rNedd4-Domänen WW2 und WW3 binden neben den S279/S282-phosphorylierten Formen von Cx43, die vom Antikörper SA226P erkannt werden, auch andere Phosphorylierungsformen von Cx43.

5.2.3 Bindung der WW2-Domäne von Nedd4 an das PY-Motiv von Cx43

Weiterhin sollte geklärt werden, ob sich auf Seiten von Cx43 eine Peptidsequenz bestimmen lässt, die ihrerseits zu der Interaktion von Cx43 mit rNedd4 beiträgt.

Abhängig von den Bindemotiven, die von den WW-Domänen in den Interaktionspartnern erkannt und gebunden werden, wurden alle WW-Domänen in insgesamt vier Gruppen eingeteilt (Kay *et al.*, 2000). Die WW-Domänen von Nedd4 wurden in die Klasse I der WW-Domänen eingeordnet, da sie spezifisch an Proteine binden, die ein xPPxY-Motiv (PY-Motiv) enthalten (Kasanov *et al.*, 2001).

Wie in Abb. 5.12 gezeigt, umschließen die Aminosäuren 282 bis 286 im zytoplasmatischen C-Terminus von Cx43 eine Sequenz, die ein mögliches PY-Motiv darstellen könnte (gelb unterlegt). Zudem befinden sich N-terminal anschließend an das PY-Motiv zwei Serinreste an Position 279 und 282, von denen bekannt ist, dass sie durch MAP Kinasen phosphoryliert werden können (rot markiert). Wie bereits erwähnt, führt die gleichzeitige Phosphorylierung der beiden Serinreste S279 und S282 zu einer schnellen und transienten Unterbrechung der Gap Junction Kommunikation (Warn-Cramer *et al.*, 1998).

```
GDWSALGKLL DKVQAYSTAG GKVWLSVLFI FRILLLGTAV ESAWGDEQSA FRCNTQQPGC        60
ENVCYDKSFP ISHVRFWVLQ IIFVSVPTLL YLAHVFYVMR KEEKLNKKEE ELKVAQTDGV       120
NVDMHLKQIE IKKFKYGIEE HGKVKMRGGL LRTYIISILF KSIFEVAFLL IQWYIYGFSL       180
SAVYTCKRDP CPHQVDCFLS RPTEKTIFII FMLVVSLVSL ALNIIELFYV FFKGVKDRVK       240
GKSDPYHATS GALSPAKDCG SQKYAYFNGC SSPTAPLSPM SPPGYKLVTG DRNNSSCRNY       300
NKQASEQNWA NYSAEQNRMG QAGSTISNSH AQPFDFPDDN QNSKKLAAGH ELQPLAIVDQ       360
RPSSRASSRA SSRPRPDDLE I                                                 381
```

Abb. 5.12: Cx43 enthält ein PY-Motiv im zytoplasmatischen C-Terminus. Peptidsequenz von Cx43 ohne das Start-Methionin. Das PY-Motiv ist gelb unterlegt. Die beiden Serinreste, die durch die MAP Kinase ERK1/2 phosphoryliert werden und deren Phosphorylierung mit einem Verlust der Gap Junction Kommunikation einhergehen, sind rot und unterstrichen dargestellt.

Interessanterweise wurde bereits beschrieben, dass phosphorylierte Serinreste eine zusätzliche Rolle in der Bindung an WW-Domänen von Nedd4 spielen können, wenn sie in unmittelbarer Nähe zu oder direkt in einem PY-Motiv liegen (Shimkets *et al.*, 1998; Chigaev *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2002).

Um die Frage zu beantworten, ob seitens des Cx43-Proteins tatsächlich das PY-Motiv für die Bindung an Nedd4 verantwortlich ist, wurden die Bindungsaffinitäten des PY-Motivs zu den einzelnen WW-Domänen von rNedd4 mit Hilfe der Surface Plasmon Resonance (SPR) -Methode gemessen. Des Weiteren sollte mit dieser Methode überprüft werden, ob sich eine Phosphorylierung der beiden Serinreste an Position 279 und 282 auf die Bindung auswirkt. Anwendung fanden hierbei zwei Peptide von 18 Aminosäuren Länge, die das PY-Motiv von Cx43 beinhalten (Abb. 5.13). Während das eine Peptid die zwei Serinreste in einem unphosphorylierten Zustand enthielt (Cx43 CT), lagen im zweiten Peptid beide Serinreste phosphoryliert vor (Cx43 CT_{phosph}). Ein Peptid, das dem N-Terminus von Cx43 entsprach und weder ein PY-Motiv noch Serinreste enthielt, wurde als Kontrolle für eine unspezifische Bindung eingesetzt

(Cx43 NT; Abb. 5.13). Als Referenz wurde ein Peptid verwendet, das sich von humanem Serumalbumin ableitete (Albumin; Abb. 5.13).

Cx43 CT	**Biotin-C_{271}SSPTAPLSPMSPPGYKL_{288}-**
Cx43 $CT_{phosph.}$	**Biotin-C_{271}SSPTAPL$_p$SPM$_p$SPPGYKL_{288}-**
Cx43 NT	**Biotin-S_5ALGKLLDKVQAYSTAGG$_{22}$-**
Albumin	**Biotin-A_{86}MLSLGTKADTHDEILEG$_{103}$-**

Abb. 5.13: In den SPR-Messungen eingesetzte Peptide. Peptidsequenzen des C-Terminus (Cx43 CT und Cx43 $CT_{phosph.}$) und des N-Terminus (Cx43 NT) von Cx43. Cx43 NT diente als Negativkontrolle. Als Referenz wurde ein vom humanen Albumin abgeleitetes Peptid verwendet (Albumin). Alle vier Peptide sind N-terminal biotinyliert. Das postulierte PY-Motiv ist durch eine rote Farbe gekennzeichnet. Die phosphorylierten Serinreste S279 und S282 innerhalb des Peptids Cx43 $CT_{phosph.}$ werden als $_pS$ dargestellt.

Alle vier Peptide waren N-terminal biotinyliert, um über eine Biotin-Streptavidin-Bindung stabil auf der Streptavidin-Oberfläche eines SA-Sensorchips immobilisiert werden zu können. Der quadratische Streptavidin-beschichtete Sensorchip ist in vier kleinere Quadrate unterteilt. Da jedes Quadrat unabhängig voneinander beladen werden kann, war es möglich, die beiden Peptide des C-Terminus von Cx43 und die zwei Kontrollen auf einem einzigen Sensorchip zu immobilisieren. Dies vereinfachte die Messungen und ließ einen direkten Vergleich der Bindeaffinitäten zu. Die für eine Immobilisierung eingesetzte Menge an Peptid wurde empirisch ermittelt. Ein Maß für die nach abgeschlossener Immobilisierung an die Chipoberfläche gebundene Masse des immobilisierten Peptids ist das Basissignal, das in „Resonanz Einheiten“ (RU) angegeben wird. In nachstehender Tabelle sind die wichtigsten Charakteristika zur Kopplung der vier verschiedenen Peptide an den SA-Sensorchip zusammengefasst.

Tab. 5.1: Immobilisierungs-Parameter.

Immobilisiertes Peptid	Menge	Basissignal nach der Immobilisierung [RU]
Cx43 CT	2ng	200
Cx43 $CT_{phosph.}$	2ng	150
Cx43 NT	2ng	150
Serumalbumin	2ng	200

Nachdem die Peptide auf der Oberfläche des SA-Sensorchips immobilisiert waren, konnten die Messungen mit den Analyten erfolgen.

Als Analyten wurden die drei in *E. coli* exprimierten und über Affinitäts-chromatographie-Säulen aufgereinigten GST-Fusionsproteine der WW-Domänen von rNedd4 bezeichnet. Zunächst wurde der Analyt GST-WW1 mit verschiedenen Konzentrationen in einem Intervall von 48,0 nM bis 3,0 µM im Flusssystem über die an die Chipoberfläche immobilisierten Peptide geleitet. Die dabei resultierenden Bindungen wurden mit Hilfe des BIAcore 3000-Gerätes gemessen. In gleicher Weise wurden nacheinander die anderen beiden Fusionsproteine, GST-WW2 und GST-WW3 bzw. GST allein gemessen.

Der zeitliche Verlauf der Bindung von den GST-Fusionsproteinen an die vier immobilisierten Peptide ist am Beispiel von GST-WW2 in den nachfolgenden Sensorgrammen gezeigt (Abb. 5.14).

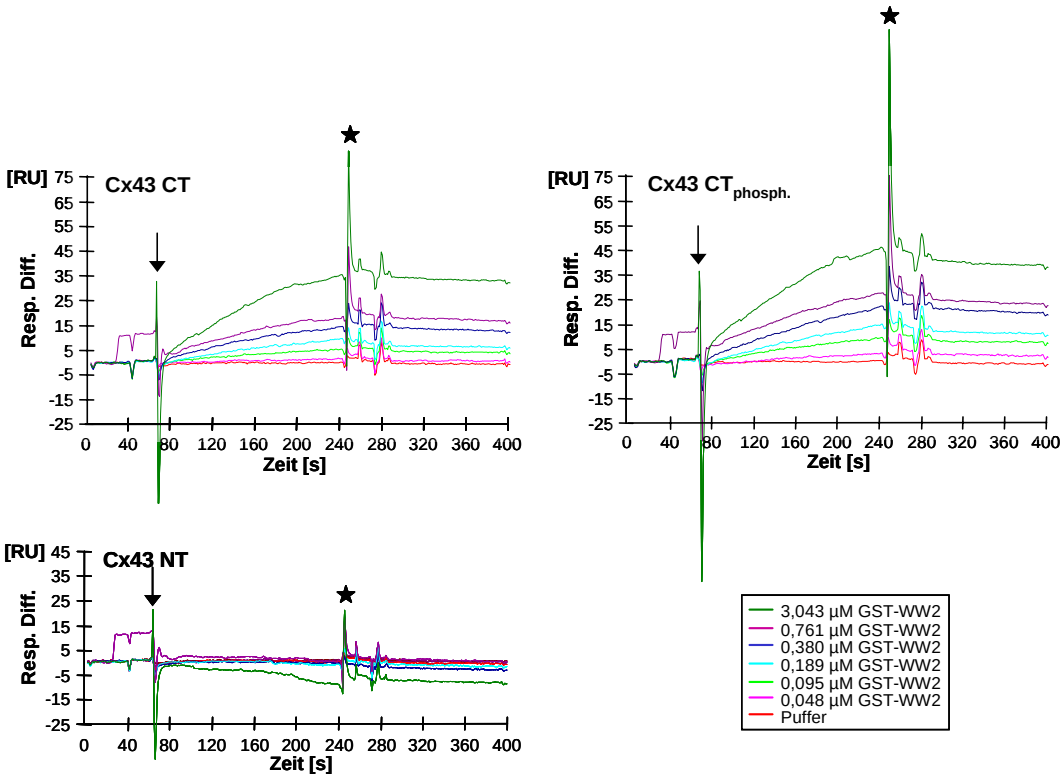
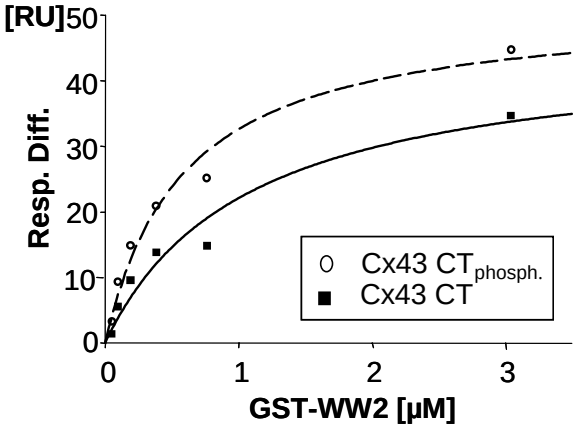


Abb. 5.14: Interaktion zwischen der Nedd4-Domäne WW2 und den C-terminalen Peptiden von Cx43. Sensorgramme, die durch die Injektion von steigenden Konzentrationen des aufgereinigten GST-WW2-Fusionsproteins über die immobilisierten Peptide Cx43 CT, Cx43 $CT_{phosph.}$ bzw. Cx43 NT enstanden. Auf der X-Achse ist die Zeit, auf der Y-Achse das Signal als „Resonanz Einheiten“ (RU) aufgetragen. Der Pfeil deutet auf den Beginn der Probeninjektion hin. Der Stern symbolisiert das Ende der Bindungsphase bzw. den Beginn der Waschphase mit HBS-EP-Puffer. Die verschiedenen eingesetzten Konzentrationen von GST-WW2 sind durch unterschiedliche Farben gekennzeichnet.

Die Auswertung der SPR-Messungen ergab, dass sich weder mit GST-WW1 noch mit GST-WW3 oder GST allein eine spezifische Bindung an eines der vier immobilisierten Peptide nachweisen ließ (Daten nicht gezeigt). Dagegen band GST-WW2 an das unphosphorylierte (Abb. 5.14, Cx43 CT), aber auch an das phosphorylierte Peptid des C-Terminus von Cx43 (Abb. 5.14, Cx43 $CT_{phosph.}$). Ein Vergleich der Sensorgramme in Abb. 5.14 zeigte, dass GST-WW2 offensichtlich eine um ca. 10 RU höhere Bindeaffinität zum phosphorylierten Peptid (Abb. 5.14, Cx43 $CT_{phosph.}$) als zum unphosphorylierten Peptid aufwies (Abb. 5.14, Cx43 CT).
Die erhöhten Messwerte des 0,761 µM Analyten GST-WW2 vor Beginn der Injektionsphase wurden durch eine fehlerhafte Messung des Referenzkanals hervorgerufen, konnten aber durch eine Angleichung der Basissignale normalisiert werden. Der zu Beginn der Injektionsphase aufgetretene negative Ausschlag (Pfeil) war auf den Pufferwechsel nach der Waschphase zurückzuführen. Während der Bindungsphase erfolgte ein deutlicher, konzentrationsabhängiger Anstieg des Signals bis zum Ende der Probeninjektion (Stern). In der Waschphase mit HBS-EP-Puffer fiel das Signal nur sehr langsam ab, was auf eine stabile Bindung hindeutet. Nach der Regenerierung war das Signal wieder im Bereich des Ausgangsniveaus. Der beschriebene Kurvenverlauf deutet auf eine spezifische und hoch affine Interaktion hin.
Wie erwartet konnte keine spezifische Bindung von GST-WW2 an das N-terminale Peptid von Cx43 (Cx43 NT), das als Negativkontrolle diente, nachgewiesen werden. Alle Signale glichen dem Signal der Basislinie.

Um eine Aussage über die genaue Affinität der Bindungen treffen zu können, wurden die Dissoziationskonstanten (K_D) der Peptidbindungen über das Software Programm Simfit berechnet. Hierzu wurden jeweils die in die Messung eingesetzten Konzentrationen des Analyten GST-WW2 gegen die gemessenen maximalen RU-Werte aufgetragen. In Abb. 5.15 ist die Kinetik der Interaktionen zwischen GST-WW2 und dem phosphorylierten (Cx43 $CT_{phosph.}$) bzw. dem unphosphorylierten C-terminalen Peptid von Cx43 (Cx43 CT) dargestellt.
Die Linien repräsentieren die Ausgleichskurven zur Gleichung: $B=B_{max}/(1+K_D/S)$, wobei B und B_{max} gebundenes bzw. maximal gebundes GST-WW2 darstellen, S für die freie Konzentration von GST-WW2 steht und K_D die

Dissoziationskonstante in einem Gleichgewicht ist. Für die Bindung von GST-WW2 an das phosphorylierte Peptid des Cx43-C-Terminus (Cx43 $CT_{phosph.}$) ergab sich daraus ein K_D-Wert von ca. $0{,}6 \times 10^{-6}$ M. Für die Bindung von GST-WW2 an das unphosphorylierte Peptid des Cx43-C-Terminus (Cx43 CT) wurde ein K_D-Wert von ca. $1{,}1 \times 10^{-6}$ M ermittelt. Da niedrige K_D-Werte eine feste und hohe K_D-Werte eine schwache Bindung beschreiben, konnte auch rechnerisch gezeigt werden, dass das phosphorylierte Peptid des C-Terminus von Cx43 (Cx43 $CT_{phosph.}$) mit einer höheren Affinität an GST-WW2 bindet als das unphosphorylierte Peptid (Cx43 CT). Verglichen mit dem unphosphorylierten Peptid bewirkte die Phosphorylierung der beiden Serinreste an Position 279 und 282 allerdings nur einen leichten Anstieg der Bindeaffinität zu GST-WW2. Der Effekt einer knapp zweifach erhöhten Bindeaffinität erreichte damit nicht den Wert einer statistischen Signifikanz.



Peptid	K_D [µM]
Cx43 $CT_{phosph.}$	0,585 ± 0,131
Cx43 CT	1,064 ± 0,376
Cx43 NT	keine Bindung

Abb. 5.15: Kinetik der Interaktion zwischen Nedd4-WW2 und dem phosphorylierten bzw. unphosphorylierten PY-Motiv von Cx43. In der Grafik sind die maximalen RU-Werte von Cx43 $CT_{phosph.}$ (Ringe) und Cx43 CT (Quadrate) gegen die in die Messung eingesetzten Konzentrationen von GST-WW2 aufgetragen. In der Tabelle sind die K_D-Werte (in µM) der Peptide Cx43 $CT_{phosph.}$ und Cx43 CT als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben. Peptid Cx43 NT zeigte keine Bindung zu GST-WW2.

Um zu beweisen, dass die detektierten Bindungen spezifisch sind, wurden Kompetitionsexperimente durchgeführt. Hierzu wurde das GST-WW2 Fusionsprotein vor der Injektion für 15 min mit ansteigenden Konzentrationen an nicht-biotinyliertem Phospho-Peptid inkubiert. Da die Sequenz des Phospho-Peptids exakt der Sequenz des Peptids Cx43 $CT_{phosph.}$ entsprach, wurde erwartet,

dass sich bei steigender Konzentration des Phospho-Peptids immer mehr gebundenes GST-WW2-Fusionsprotein anreicherte, welches für eine Bindung an das Chip-gekoppelte Cx43 $CT_{phosph.}$-Peptid nicht mehr zur Verfügung stand.
Wurden jeweils die in die Messung eingesetzten Konzentrationen des kompetitierenden Phospho-Peptids gegen die erhaltenen maximalen RU-Werte der Bindung von Cx43 $CT_{phosph.}$ an GST-WW2 aufgetragen, ergab sich die in Abb. 5.16 dargestellte Grafik.
Die steigende Konzentration an Phospho-Peptid korrelierte eindeutig mit einer sinkenden Bindefähigkeit von GST-WW2 an das immobilisierte Cx43 $CT_{phosph.}$-Peptid. Durch die konzentrationsabhängige Abnahme der Bindefähigkeit wurde eine spezifische Bindung zwischen GST-WW2 und dem das PY-Motiv enthaltenden Cx43 $CT_{phosph.}$-Peptid von Cx43 bestätigt.

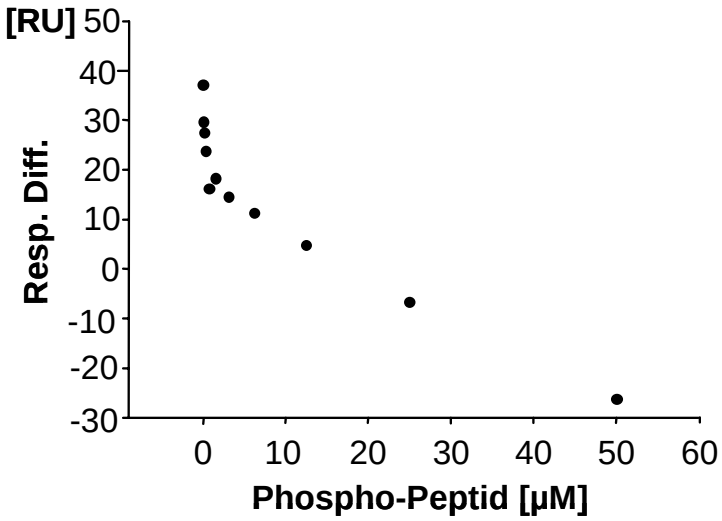


Abb. 5.16: Abnahme der Bindefähigkeit von GST-WW2 an Cx43 $CT_{phosph.}$ durch die Inkubation von GST-WW2 mit einem kompetitierenden Peptid. In der Grafik sind die in die Messung eingesetzten Konzentrationen des kompetitierenden Phospho-Peptids gegen die maximalen RU-Werte der Bindung von Cx43 $CT_{phosph.}$ an GST-WW2 aufgetragen. Die steigende Konzentration an kompetitierendem Phospho-Protein korrelierte direkt mit einer sinkenden Bindefähigkeit von GST-WW2 an das immobilisierte Cx43 $CT_{phosph.}$-Peptid.

5.2.4 Kolokalisation von Cx43 und Nedd4 in der Säugerzelllinie Hepa1c1c7 WT

Die beschriebenen biochemischen Befunde zeigten, dass die Ubiquitin-Protein-Ligase Nedd4 *in vitro* an Cx43 bindet. In diesem Zusammenhang stellte sich nun die Frage, ob eine Interaktion von Cx43 mit Nedd4 auch unter *in vivo* Bedingungen in intakten Säugerzellen nachgewiesen werden kann. Daher wurde mittels Doppelimmunfluoreszenz die zelluläre Lokalisation von Cx43 und Nedd4 bestimmt und untersucht, ob es eine Kolokalisation der beiden Proteinen gibt.
Um die indirekten Doppelimmunfluoreszenzen mit den polyklonalen anti-Cx43 Antikörpern 71-0700 bzw. SA226P durchführen zu können, war ein monoklonaler anti-Nedd4 Antikörper erforderlich. Da jedoch die kommerziell erhältlichen monoklonalen anti-Nedd4 Antikörper entweder nicht in der Immunfluoreszenz und/oder nur in murinen Zellen einsetzbar waren, war es notwendig, zunächst eine Mauszelllinie zu finden, die große Mengen an Cx43 exprimiert. Die murine Hepatom-Zelllinie Hepa1c1c7 WT erfüllte diese Kriterien und wurde daher für die folgenden Immunfluoreszenzen eingesetzt. Um auch die P3- und P4-Formen von Cx43 mit dem Antikörper SA226P detektieren zu können, wurden die Hepa1c1c7 WT Zellen zunächst 24 h serumfrei kultiviert, bevor sie mit EGF behandelt wurden. In der indirekten Doppelimmunfluoreszenz wurden die verschiedenen Formen von Cx43 mit grünen Fluorochromen detektiert, während zur Darstellung von Nedd4 rote Fluorochrome eingesetzt wurden. Die Ergebnisse der indirekten Doppelimmunfluoreszenz sind in Abb. 5.17 dargestellt.

Im Vergleich zu WB-F344 Zellen zeigte sich in EGF-behandelten Hepa1c1c7 WT Zellen mit dem anti-Cx43 Antiköper 71-0700 nur eine sehr schwache Färbung der Gap Junction Plaques an den Plasmamembranen. Dagegen war eine starke Färbung von vesikulären Strukturen rund um den Zellkern zu beobachten. Ein geringer Anteil an Cx43 wurde zudem im Zytoplasma und im Zellkern dieser Zellen nachgewiesen (Abb. 5.17 1a). Nedd4 war in der gesamten Zelle mit Ausnahme des Zellkerns und der Plasmamembran lokalisiert, wobei die stärksten Signale ebenfalls in vesikulären Strukturen rund um den Zellkern zu beobachten waren (Abb. 5.17 1b). Eine Überlagerung der Bilder zeigte eine deutliche Kolokalisation beider Proteine in einer Reihe von vesikulären Strukturen um den

Zellkern (Abb. 5.17 1c). Dagegen konnte keine Kolokalisation von Nedd4 und Cx43 an den Plasmamembranen und im Zellkern von Hepa1c1c7 WT Zellen nachgewiesen werden (Abb. 5. 17 1c, d).

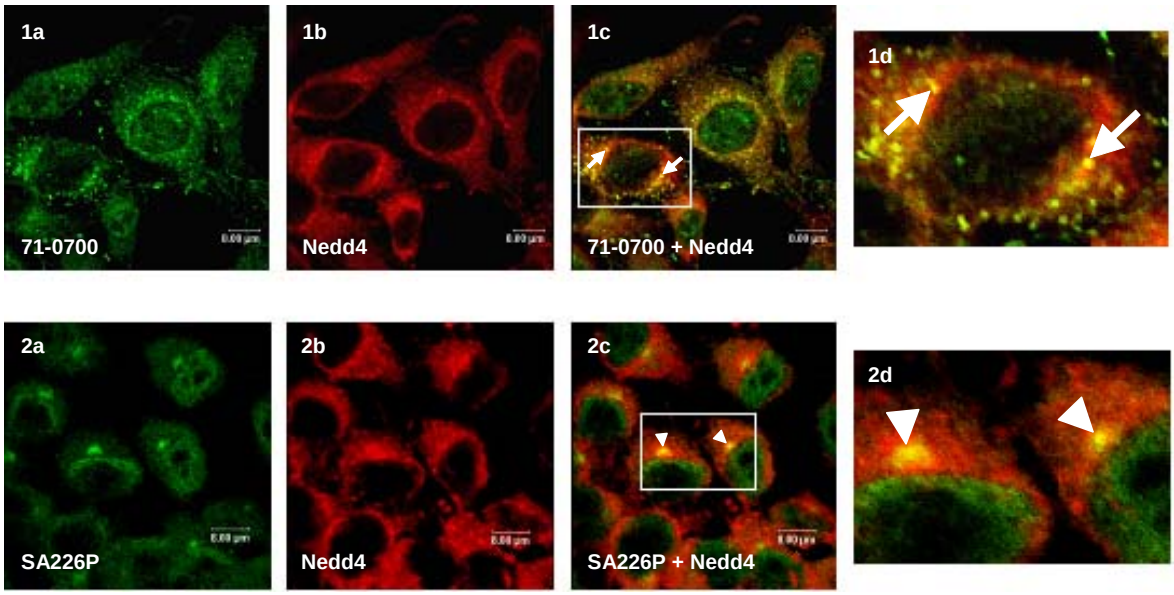


Abb. 5.17: Nachweis der Kolokalisation von endogenem Cx43 und Nedd4 in Hepa1c1c7 WT Zellen. Die Lokalisation von Cx43 und Nedd4 in Hepa1c1c7 WT Zellen wurde durch eine indirekte Doppelimmunfluoreszenz mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop dargestellt. Die für 15 min mit 100 ng/mL EGF behandelten Zellen wurden fixiert und mit dem polyklonalen anti-Cx43 Antikörper 71-0700 (1) bzw. SA226P (2) und dem monoklonalen anti-Nedd4 Antikörper (1 und 2) gefärbt. Als sekundäre Antikörper wurden ein Alexa 488-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen und ein Alexa 594-gekoppelter Ziege-anti-Maus Antikörper eingesetzt. Eine Überlagerung der beiden Färbungen ergibt eine gelbe Mischfärbung und deutet auf eine Kolokalisation der beiden Proteine hin (Pfeile und Pfeilköpfe). Während sich eine Kolokalisation von Nedd4 mit verschiedenen Formen von Cx43 in vesikulären Strukturen um den Zellkern zeigte (Pfeile), kolokalisierte S279/S282-phosphoryliertes Cx43 mit Nedd4 in den mutmaßlichen Centrosomen (Pfeilköpfe). Die genaue Lokalisation dieser Formen wird in den vergrößerten Ausschnitten deutlicher (Pfeile und Pfeilköpfe).

Wie in Abb. 5.17 2a gezeigt, konnte trotz einer EGF-Behandlung mit dem Antikörper SA226P keine Lokalisation der S279/S282-phosphorylierten Cx43-Formen an den Plasmamembranen von Hepa1c1c7 WT Zellen beobachtet werden. Stattdessen zeigte sich, wie in unbehandelten WB-F344 Zellen, eine grüne Fluoreszenz in den Zellkernen. Eine Ausnahme bildeten hier die Nucleoli. Direkt benachbart zu den Zellkernen fielen stark grün fluoreszierende Punkte auf, die aufgrund ihrer Lokalisation Centrosomen darstellen könnten. Die Überlagerung der SA226P-Färbung mit den Signalen von Nedd4 wies auf eine Kolokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 und Nedd4 in den mutmaßlichen Centrosomen hin (Abb. 5.17 2c, d).

Diese indirekten Doppelimmunfluoreszenzen lieferten den Nachweis, dass Nedd4 mit verschiedenen Formen von Cx43 unter *in vivo* Bedingungen kolokalisiert. Während Nedd4 mit unphosphoryliertem oder wenig phosphoryliertem Cx43 (P0-, P1- und P2-Formen) scheinbar in vesikulären Strukturen rund um den Zellkern kolokalisiert, zeigte sich eine Kolokalisation von Nedd4 und den S279/S282-phosphorylierten Cx43-Formen möglicherweise in den Centrosomen. Zusammenfassend mit den biochemischen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass Nedd4 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mit Cx43 interagiert.

5.2.5 Die Ubiquitinierung von Cx43 durch Nedd4 erfolgt nicht an der Plasmamembran

Nedd4, wie alle anderen Ubiquitin-Protein-Ligasen, übernimmt im Prozess der Ubiquitinierung die Aufgabe der Zielprotein-Erkennung. Es hängt somit von den Ubiquitin-Protein-Ligasen ab, welche Proteine für eine Internalisierung bzw. Degradation „markiert“ werden. Dabei gilt die Ubiquitinierung als Signal für eine schnelle Internalisierung bzw. Degradation von Membranproteinen (Bonifacino und Weissman, 1998; Hicke, 1999; Rotin *et al.*, 2000).
Cx43 ist im Vergleich zu anderen Membranproteinen ein Protein mit einer sehr kurzen Halbwertszeit. Dieses resultiert in einer schnellen Umsetzungsrate der Gap Junction Kanäle. Nach dem heutigen Wissensstand geht man davon aus, dass der Abbau der Kanäle zumindest zum Teil durch eine Ubiquitinierung reguliert wird (Laing und Beyer, 1995; Rutz und Hulser, 2001).

Nachdem bereits durch indirekte Doppelimmunfluoreszenzen die Kolokalisation von Cx43 mit Nedd4 *in vivo* gezeigt werden konnte, sollte geklärt werden, ob eine Ubiquitinierung von Cx43 nachweisbar ist. Um diese Frage zu beantworten, wurden indirekte Doppelimmunfluoreszenzen in konfluenten WB-F344 Zellen durchgeführt, wobei die verschiedenen Formen von Cx43 in grün und Ubiquitin in rot dargestellt wurden. Die Ergebnisse dieser indirekten Doppelimmunfluoreszenz sind in Abb. 5.18 dargestellt.

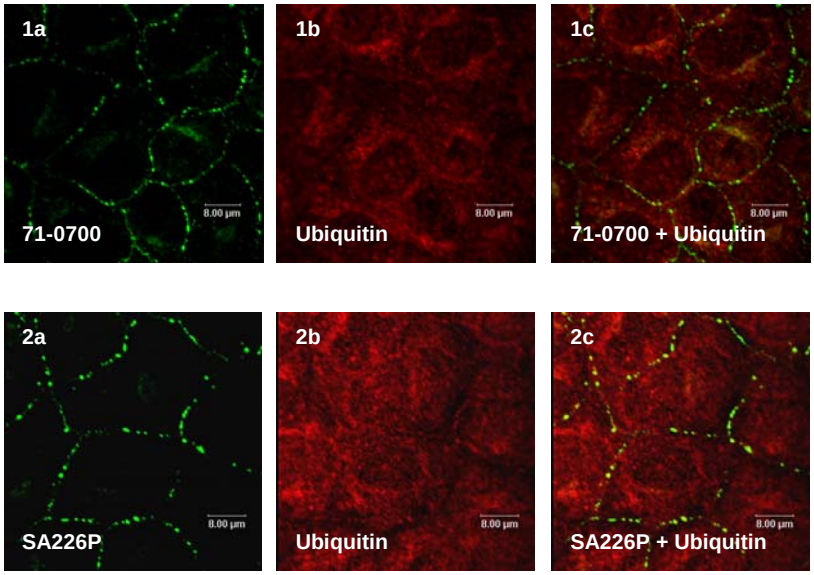


Abb. 5.18: Lokalisation von endogenem Cx43 und Ubiquitin in WB-F344 Zellen. Die Lokalisation von Cx43 und Ubiquitin in unbehandelten (1) und EGF-behandelten (2) WB-F344 Zellen wurde durch eine indirekte Doppelimmunfluoreszenz mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop dargestellt. Die fixierten Zellen wurden mit dem polyklonalen anti-Cx43 Antikörper 71-0700 (1) bzw. SA226P (2) und dem monoklonalen anti-Ubiquitin Antikörper (1 und 2) inkubiert. Als sekundäre Antikörper wurden ein Alexa 488-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen und ein Alexa 594-gekoppelter Ziege-anti-Maus Antikörper eingesetzt. Es ließ sich keine Kolokalisation der verschiedenen Cx43-Formen und Ubiquitin nachweisen.

In unbehandelten WB-F344 Zellen zeigte sich mit dem anti-Cx43 Antikörper 71-0700 keine Kolokalisation von verschiedenen Cx43-Formen und Ubiquitin. Ubiquitin existierte ubiquitär in den Zellen, wenngleich ein etwas stärkeres Signal um den Zellkern herum zu detektieren war (Abb. 5.18 1b). Die von dem anti-Cx43 Antikörper 71-0700 detektierten Cx43-Formen waren wie in allen bisherigen Kontrollen als Gap Junction Plaques an den Plasmamembranen lokalisiert (Abb. 5.18 1a). Keiner der Gap Junction Plaques zeigte aber eine gelbe Mischfärbung, die auf eine Kolokalisation mit Ubiquitin hinweisen würde (Abb. 5.18 1c).

Um zu überprüfen, ob eine EGF-vermittelte S279/S282-Phosphorylierung von Cx43 zu einer Kolokalisation mit Ubiquitin an den Plasmamembranen führt, wurden indirekte Doppelimmunfluoreszenzen in EGF-behandelten WB-F344 Zellen durchgeführt. Wie bereits unter 5.1.2 beschrieben, konnte durch eine Stimulierung der Zellen mit EGF eine Lokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 an der Plasmamembran hervorgerufen werden

Abb. 5.18 2a). Es zeigte sich jedoch keine Kolokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 mit Ubiquitin an den Plasmamembranen (Abb. 5.18 2c).
Da sowohl mit dem anti-Nedd4 wie auch mit dem anti-Ubiquitin Antikörper keine Kolokalisation mit Cx43 an der Plasmamembran nachgewiesen werden konnte, deuteten die Ergebnisse dieser Doppelimmunfluoreszenzen darauf hin, dass Cx43 durch Nedd4 vermutlich nicht an der Plasmamembran ubiquitiniert wird.

5.3 Immunlokalisation von S279/S282-phosphorylierten Cx43-Formen während der Mitose und mögliche Auswirkungen

Eine wesentliche Voraussetzung für einen ungestörten Ablauf des Zellzyklus ist die transiente Veränderung der Zell-Zell-Kommunikation über Gap Junctions. Vermutlich wird diese Veränderung über verschiedene Signalkaskaden reguliert. So bewirkt z.B. die Phosphorylierung von Cx43 durch die Protein Kinase C eine Abnahme der interzellulären Kommunikation beim Übergang der Zellen von der G_0- in die Synthese (S) -Phase (Koo *et al.*, 1997). Während der Mitose ist der Verlust der interzellulären Kommunikation dagegen auf die Cx43-Phosphorylierung zumindest durch die $p34^{cdc2}$/Cyclin B Kinase (p34) zurückzuführen. Neben den Serinresten S255 und S262 bedingt eine direkte oder indirekte Aktivierung von p34 auch die Phosphorylierung von Cx43 an anderen, noch undefinierten Aminosäureresten (Kanemitsu *et al.*, 1998; Lampe *et al.*, 1998). Ob speziell die S279/S282-phosphorylierten Formen von Cx43 während der Mitose eine Rolle spielen könnten, sollte anhand von indirekten Immunfluoreszenzen in mitotischen Zellen untersucht werden.

5.3.1 Kolokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 mit Nedd4 und Ubiquitin in mitotischen Zellen

Da in Interphase-Zellen eine Ubiquitinierung von Cx43 nicht nachweisbar war, sollte zunächst überprüft werden, ob eine Kolokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 mit Nedd4 und Ubiquitin in mitotischen Zellen detektiert werden kann.

Hierfür wurden erneut indirekte Doppelimmunfluoreszenzen in Hepa1c1c7 WT Zellen durchgeführt. Vor der Inkubation mit den Antikörpern SA226P und anti-Nedd4 wurden die Zellen 24 h ausgehungert und anschließend mit EGF behandelt. Die S279/S282-phosphorylierten Formen von Cx43 sind in grün, Nedd4 ist in rot gezeigt.

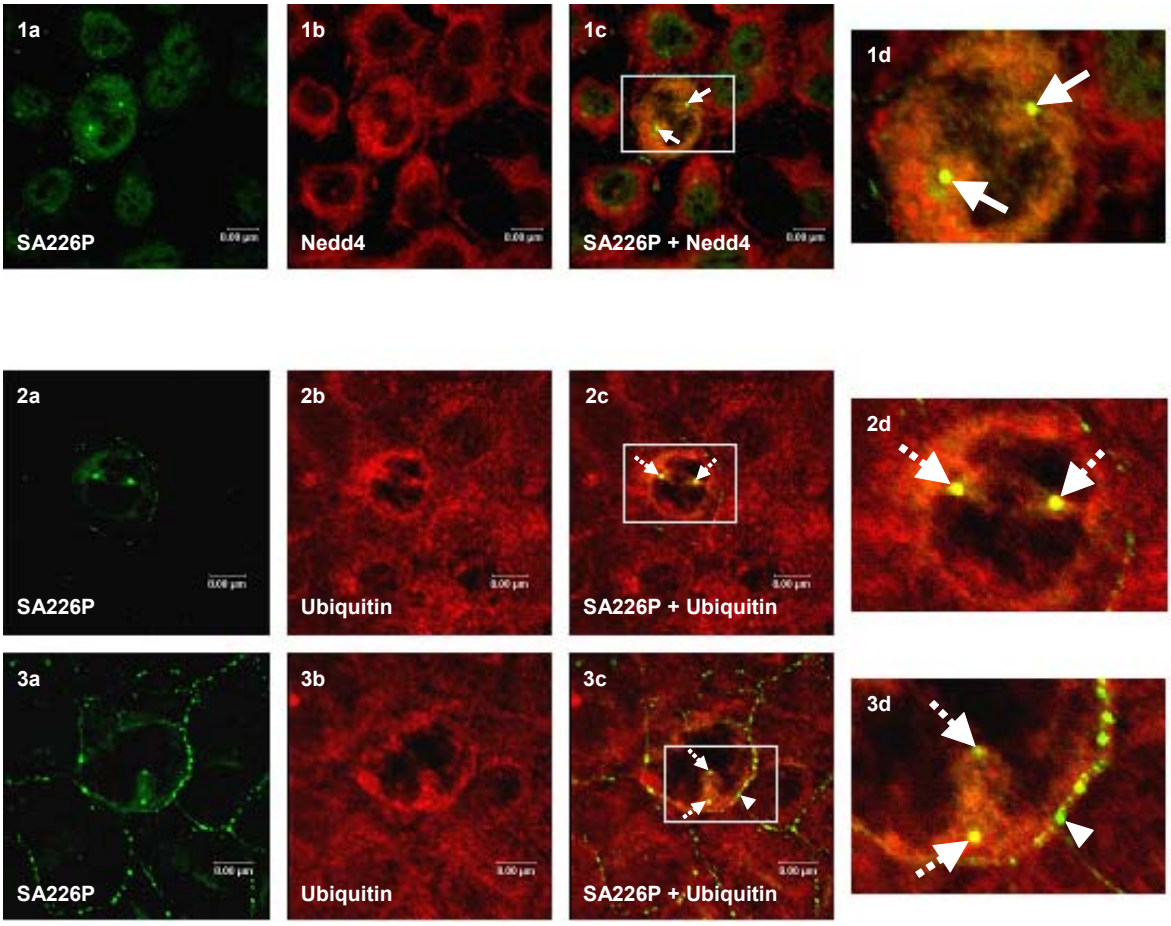


Abb. 5.19: Kolokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 und Nedd4 bzw. Ubiquitin in mitotischen Zellen. Die Lokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 und Nedd4 in EGF-behandelten Hepa1c1c7 WT Zellen (1) ebenso wie die Lokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 und Ubiquitin in unbehandelten (2) und EGF-behandelten (3) WB-F344 Zellen wurde durch indirekte Doppelimmunfluoreszenz mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop dargestellt. Die fixierten Zellen wurden mit dem polyklonalen Antikörper SA226P und dem monoklonalen anti-Nedd4 bzw. anti-Ubiquitin Antikörper gefärbt. Als sekundäre Antikörper wurden ein Alexa 488-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen und ein Alexa 594-gekoppelter Ziege-anti-Maus Antikörper eingesetzt. Eine Überlagerung der beiden Färbungen ergibt eine gelbe Mischfärbung und bedeutet die Kolokalisation der beiden Proteine. In mitotischen Zellen scheinen hauptsächlich die Centrosomen der Ort einer Kolokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 und Nedd4 zu sein (Pfeile). Zudem wurde eine eindeutige Kolokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 und Ubiquitin in den Centrosomen von mitotischen Zellen nachgewiesen (gestrichelte Pfeile). Dagegen konnte keine Kolokalisation von Ubiquitin mit an der Plasmamembran lokalisiertem S279/S282-phosphoryliertem Cx43 gefunden werden (Pfeilkopf). Die genaue Lokalisation dieser Formen wird in den vergrößerten Ausschnitten deutlicher (Pfeile, gestrichelte Pfeile, Pfeilköpfe).

Wie in Abb. 5.19 1a, 2a, 3a gezeigt, fielen in mitotischen Zellen zwei stark grün fluoreszierende punktähnliche Strukturen auf. Damit konnte eine Lokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 möglicherweise den während der Mitose auseinanderweichenden Centrosomen zugeordnet werden. Auch Nedd4 scheint in mitotischen Hepa1c1c7 WT Zellen verstärkt in der Region der mutmaßlichen Centrosomen lokalisiert zu sein (Abb. 5.19 1b). Dieses wirkt sich in einer Kolokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 und Nedd4 in den mutmaßlichen Centrosomen der mitotischen Hepa1c1c7 WT Zellen aus (Abb. 5.19 1c,d).

Für den Nachweis einer Kolokalisation von S279/S282-phosphorylierten Cx43-Formen und Ubiquitin in mitotischen Zellen wurden indirekte Doppelimmunfluoreszenzen in konfluenten und serumfrei kultivierten WB-F344 Zellen durchgeführt. Weiterhin sollte überprüft werden, ob eine EGF-bedingte Phosphorylierung der beiden Serinreste S279 und S282 eine Kolokalisation von Cx43 und Ubiquitin zur Folge hat. Dazu wurden die WB-F344 Zellen nach dem Aushungern mit EGF behandelt. In beiden Fällen wurden die S279/S282-phosphorylierten Cx43-Formen mit grünen Fluorochromen und Ubiquitin mit roten Fluorochromen detektiert.
Wie schon in den Hepa1c1c7 WT Zellen fielen mit Antikörper SA226P auch in unbehandelten WB-F344 Zellen mitotische Zellen auf (Abb. 5.19 2a). Dabei unterschied sich die Lokalisation der S279/S282-phosphorylierten Formen von Cx43 in mitotischen WB-F344 Zellen vollkommen von Zellen, die sich in der Interphase befanden. WB-F344 Zellen in der Mitose zeichneten sich durch Gap Junction Plaque Signale an der Plasmamembran und stets durch zwei sehr stark fluoreszierende punktähnliche Strukturen aus, die erneut auf Centrosomen hinweisen (Abb. 5.19 2a). Das Fortschreiten der Mitose führte ebenfalls zu einer Umstrukturierung der Lokalisation von Ubiquitin. In mitotischen Zellen zeigten sich neben einem verstärkten Ubiquitin-Signal um den Zellkern herum auch die mutmaßlichen Centrosomen gefärbt (Abb. 5.19 2b). Eine Kolokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 und Ubiquitin ist demnach in den vermeintlichen Centrosomen der mitotischen WB-F344 Zellen nachzuweisen (Abb. 5.19 2c).

Auch bei EGF-behandelten WB-F344 Zellen wurden Zellen gefunden, die sich zum Zeitpunkt des Fixierens in der Mitose befunden hatten. Die Behandlung der Zellen mit EGF führte zu einer Lokalisation der S279/S282-phosphorylierten Cx43-Formen an der Plasmamembran (Abb. 5.19 3a). Wie bereits unter 5.2.5 beschrieben, konnte aber keine Kolokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 mit Ubiquitin an den Plasmamembranen nachgewiesen werden (Abb. 5.19 3c, d). Dass die Lokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 in den Gap Junction Plaques an der Plasmamembran von mitotischen Zellen nicht EGF-abhängig ist, kann durch den Vergleich von Abb. 5.19 2a und Abb. 5.19 3a verdeutlicht werden. Wie schon in den unbehandelten mitotischen WB-F344 Zellen, so zeigte sich auch in den EGF-behandelten mitotischen Zellen ein verstärktes Ubiquitin-Signal um den Zellkern herum und in den mutmaßlichen Centrosomen (Abb. 5.19 3b). Während der Mitose lässt sich daher in den mutmaßlichen Centrosomen eine Kolokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 und Ubiquitin nachweisen (Abb. 5.19 3c, d).

Eine Kolokalisation von Cx43 und Ubiquitin scheint ausschließlich in den mutmaßlichen Centrosomen von mitotischen WB-F344 Zellen stattzufinden. Zudem sind die S279/S282-phosphorylierten Formen von Cx43 vermutlich die einzigen Formen des Proteins, die in den Centrosomen anzutreffen sind. Zusammenfassend für die Ergebnisse der Abb. 5.19 ist demnach vorstellbar, dass während der Mitose gezielt S279/S282-phosphoryliertes Cx43 durch Nedd4 in den mutmaßlichen Centrosomen ubiquitiniert wird.

5.3.2 Immunlokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 in den Centrosomen von mitotischen WB-F344 Zellen

Nachdem vieles darauf hindeutete, dass es sich bei den beobachteten Strukturen in mitotischen Zellen um Centrosomen handeln könnte, sollte geklärt werden, ob das mit Antikörper SA226P erhaltene Signal spezifisch den Centrosomen zugeordnet werden kann.

Durch indirekte Doppelimmunfluoreszenzen wurde überprüft, ob die stark fluoreszierenden punktähnlichen Strukturen, die stets bei einer Färbung der Zellen mit dem Antikörper SA226P in mitotischen Zellen auftraten, Centrosomen sein

könnten. Hierfür wurden unbehandelte WB-F344 Zellen mit dem Antikörper SA226P und einem anti-γ-Tubulin Antikörper gefärbt. γ-Tubulin ist ein Protein, das bei zahlreichen Organismen in den Centrosomen der Zellen vorkommt und deshalb als klassischer Marker für Centrosomen verwendet wird (Bornens, 2002). In Abb. 5.20 ist die S279/S282-phosphorylierte Form von Cx43 in einer grünen Fluoreszenz dargestellt, während γ-Tubulin durch eine rote Fluoreszenz gekennzeichnet ist.

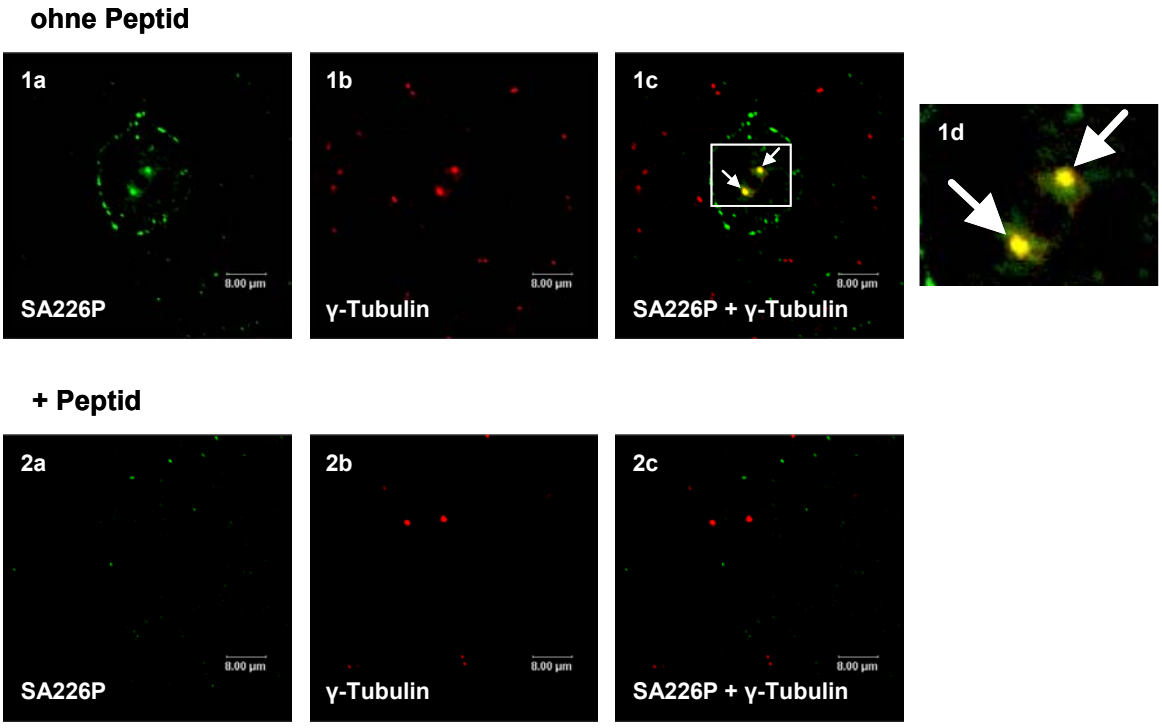


Abb. 5.20: Kolokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 und γ-Tubulin in den Centrosomen von mitotischen WB-F344 Zellen. Die Lokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 und γ-Tubulin wurde in WB-F344 Zellen durch indirekte Doppelimmunfluoreszenz mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop dargestellt. Die unbehandelten und fixierten Zellen wurden mit dem polyklonalen Antikörper SA226P und dem monoklonalen anti-γ-Tubulin Antikörper gefärbt. Als sekundäre Antikörper wurden ein Alexa 488-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen und ein Alexa 594-gekoppelter Ziege-anti-Maus Antikörper eingesetzt. Eine Überlagerung der beiden Färbungen ergibt eine gelbe Mischfärbung und deutet auf eine Kolokalisation der beiden Proteine hin (Pfeile). Die Kolokalisation beider Proteine wird im vergrößerten Ausschnitt deutlicher (Pfeile). Durch die Inkubation des SA226P-Antikörpers mit einem S279/S282-phosphorylierten Peptid vor dem Einsatz in der Immunfluoreszenz konnten die SA226P-Signale nahezu vollständig reduziert werden.

Wie bereits für Abb. 5.19 2a beschrieben, zeigte sich unter den unbehandelten WB-F344 Zellen ausschließlich in mitotischen Zellen eine Gap Junction Färbung an der Plasmamembran. Zudem waren zwei punktähnliche Strukturen in der Mitte

der mitotischen Zelle auffallend (Abb. 5.20 1a). Dass die beiden stark fluoreszierenden Strukturen tatsächlich Centrosomen während einer Mitose darstellen, konnte anhand der Kolokalisation mit γ-Tubulin nachgewiesen werden. Mit γ-Tubulin gefärbt, ließen sich die Centrosomen von Interphase-Zellen als ein Punkt bzw. zwei kleinere Punkte direkt nebeneinander darstellen. Während der Mitose traten die punktähnlichen Strukturen auseinander und erschienen größer (Abb. 5.20 1b). Eine Überlagerung der Bilder zeigte eine eindeutige Kolokalisation von γ-Tubulin mit den S279/S282-phosphorylierten Formen von Cx43 in den Centrosomen von mitotischen WB-F344 Zellen (Abb. 5.20 1c, d).
Um auszuschließen, dass es sich bei der Kolokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 und γ-Tubulin in den Centrosomen um ein Artefakt handelte, wurden die SA226P-Antikörper vor dem Einsatz in der Immunfluoreszenz 15 min mit einem 10 molaren Überschuß an S279/S282-phosphoryliertem Peptid inkubiert. Das S279/S282-phosphorylierte Peptid war zur Herstellung des Antikörpers SA226P eingesetzt worden und diente damit als kompetitierendes Peptid für die S279/S282-phosphorylierten endogenen Formen von Cx43 in der Immunfluoreszenz. Wie in Abb. 5.20 2a gezeigt, resultierte die Inkubation des Antikörpers SA226P mit diesem Peptid in einem Verlust des SA226P-Signals. Eine Kolokalisation von γ-Tubulin und S279/S282-phosphoryliertem Cx43 in den Centrosomen von mitotischen WB-F344 Zellen konnte folglich nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 5.20 2c).
Diese Ergebnisse bewiesen, dass es sich bei den beobachteten Strukturen tatsächlich um Centrosomen von mitotischen Zellen handelte. Ferner lässt sich die Aussage treffen, dass die centrosomale Färbung und die Färbung der Gap Junction Plaques an den Plasmamembranen von mitotischen Zellen mit Antikörper SA226P spezifisch sein muss.

Weitere Doppelimmunfluoreszenzen sollten die Spezifizität der Centrosomen-Lokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 im Vergleich zu anderen Cx43-Formen beweisen. Fixierte, EGF-behandelte WB-F344 Zellen wurden hierfür mit dem anti-Cx43 Antikörper 71-0700 und dem anti-γ-Tubulin Antikörper inkubiert. In Abb. 5.21 sind die mit Antikörper 71-0700 detektierbaren Formen von Cx43 in grün dargestellt. γ-Tubulin lässt sich durch eine rote Fluoreszenz lokalisieren.

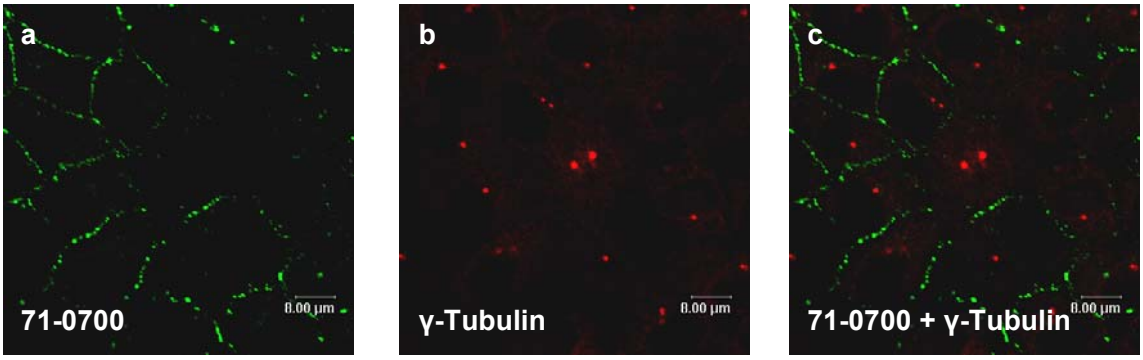


Abb. 5.21: Verlust der von Antikörper 71-0700 detektierbaren Cx43-Formen an den Plasmamembranen von mitotischen WB-F344 Zellen. Die Lokalisation von verschiedenen Cx43-Formen und γ-Tubulin wurde in WB-F344 Zellen durch indirekte Doppelimmunfluoreszenz mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop dargestellt. Konfluente und ausgehungerte Zellen wurden für 10 min mit 100 ng/mL EGF behandelt. Die fixierten Zellen wurden mit dem polyklonalen anti-Cx43 Antikörper 71-0700 und dem monoklonalen anti-γ-Tubulin Antikörper gefärbt. Als sekundäre Antikörper wurden ein Alexa 488-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen und ein Alexa 594-gekoppelter Ziege-anti-Maus Antikörper eingesetzt. Bei Zellen in Mitose zeigte sich eine starke Reduktion der Cx43-Formen, die vom anti-Cx43 Antikörper 71-0700 erkannt werden. Dieses läßt auf eine Hyperphosphorylierung von Cx43 in den Gap Junction Plaques von mitotischen Zellen schließen.

Immunfluoreszenzen mit dem anti-Cx43 Antikörper 71-0700 lieferten Signale an der Plasmamembran. Die typischen Gap Junction Plaques waren in Interphase-Zellen gut sichtbar und relativ regelmäßig auf den Plasmamembranen verteilt (Abb. 5.21 a). Mitotische WB-F344 Zellen, die durch die Centrosomen-Färbung von γ-Tubulin lokalisiert werden konnten (Abb. 5.21 b), zeichneten sich durch wesentlich weniger Gap Junction Plaques an der Plasmamembran aus. Dieses Phänomen schien zusätzlich die direkt benachbarten Zellen zu betreffen. Oft war ein kompletter Signalverlust an den Plasmamembranen von mitotischen Zellen festzustellen. Auch konnte keine Kolokalisation von Cx43 mit γ-Tubulin während einer Mitose in den Centrosomen nachgewiesen werden (Abb. 5.21 c). Die Tatsache, dass WB-F344 Zellen während der Mitose eine starke Färbung von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 an den Plasmamembranen aufwiesen, gleichzeitig die Formen des Proteins, die von Antikörper 71-0700 erkannt werden, jedoch nicht mehr an den Plasmamembranen zu detektieren waren, lässt darauf schließen, dass es während der Mitose zu einer Hyperphosphorylierung von Cx43 in den Gap Junctions kommt.

Obwohl γ-Tubulin als klassischer Marker für die Centrosomen verwendet wird, zählt γ-Tubulin zu den Nicht-Matrix-Proteinen der Centrosomen. Lediglich 10-20% des Proteins ist innerhalb der Centrosomen lokalisiert, während der Hauptanteil von γ-Tubulin nicht Centrosomen-assoziiert vorliegt (Moudjou *et al.*, 1996). Die Centrosomen-Lokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 in mitotischen Zellen sollte daher durch einen zweiten Centrosomen-Marker bestätigt werden. Da Pericentrin konzentriert in den Centrosomen vorliegt, zählt es zu den Matrix-Proteinen der Centrosomen und dient damit als guter Marker für eine Centrosomen-Lokalisation (Bornens, 2002). Für eine indirekte Doppelimmunfluoreszenz mit dem Antikörper SA226P und dem anti-Pericentrin Antikörper wurden EGF-behandelte WB-F344 Zellen eingesetzt. Die S279/S282-phosphorylierten Formen von Cx43 wurden erneut in grün, Pericentrin in rot dargestellt.

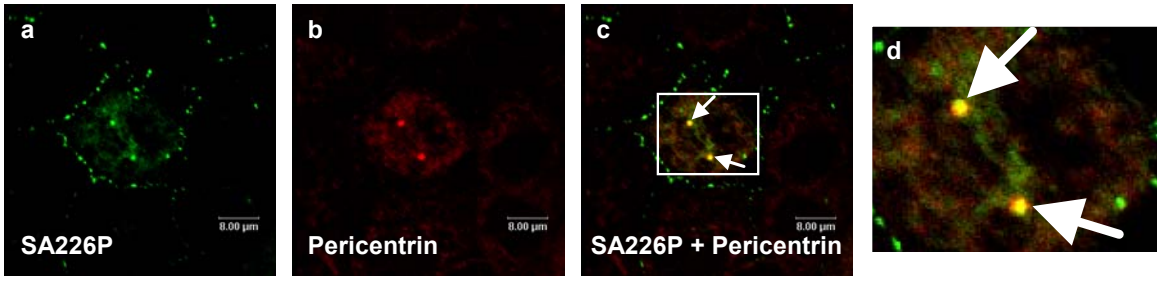


Abb. 5.22: Kolokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 und Pericentrin in den Centrosomen von mitotischen WB-F344 Zellen. Die Lokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 und Pericentrin wurde in WB-F344 Zellen durch indirekte Doppelimmunfluoreszenz mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop dargestellt. Konfluente und ausgehungerte Zellen wurden für 10 min mit 100 ng/mL EGF behandelt. Die fixierten Zellen wurden mit dem polyklonalen Antikörper SA226P und dem monoklonalen anti-Pericentrin Antikörper gefärbt. Als sekundäre Antikörper wurden ein Alexa 488-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen und ein Alexa 594-gekoppelter Ziege-anti-Maus Antikörper eingesetzt. Eine Überlagerung der beiden Färbungen ergibt eine gelbe Mischfärbung und deutet auf eine Kolokalisation der beiden Proteine hin (Pfeile). Die Kolokalisation beider Proteine wird im vergrößerten Ausschnitt deutlicher (Pfeile). Auch mit dem Centrosomen-Marker Pericentrin ließ sich eine Lokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 in den Centrosomen von mitotischen WB-F344 Zellen nachweisen.

Wie bereits beschrieben, führte die EGF-Behandlung der WB-F344 Zellen zu einer Lokalisation der S279/S282-phosphorylierten Cx43-Formen an den Plasmamembranen. WB-F344 Zellen, die sich in der Mitose befanden, zeichneten sich neben einer starken Fluoreszenz in den Centrosomen auch durch eine

wesentlich stärkere Fluoreszenz an den Gap Junction Plaques aus. Die Signale rund um eine mitotische Zelle waren nicht nur in der Intensität stärker, sondern die Gap Junction Plaques erschienen auch größer als in EGF-behandelten Interphase-Zellen (Abb. 5.22 a). Im Gegensatz zum anti-γ-Tubulin Antikörper markierte der anti-Pericentrin Antikörper ausschließlich Centrosomen von Zellen in der Mitose (Abb. 5.22 b). Die Überlagerung der beiden Signale ergab eindeutig eine Kolokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 und Pericentrin in den Centrosomen von mitotischen WB-F344 Zellen (Abb. 5.22 c).
Damit bestätigte die indirekte Doppelimmunfluoreszenz mit dem anti-Pericentrin Antikörper die Doppelimmunfluoreszenz-Ergebnisse mit dem anti-γ-Tubulin Antikörper. Eine Kolokalisation von γ-Tubulin bzw. Pericentrin mit den S279/S282-phosphorylierten Formen von Cx43 beweist damit das Vorkommen bestimmter Cx43-Phosphorylierungsformen in den Centrosomen von mitotischen Zellen.

5.3.3 Nachweis der Cx43-Formen P0 und P4 sowie von Nedd4 in den Centrosomen

Die Ergebnisse der unter 5.3.1 und 5.3.2 beschriebenen indirekten Doppelimmunfluoreszenzen wurden mit Western Blot Experimenten von aufgereinigten Centrosomen ergänzt. Vor der Centrosomen-Aufreinigung wurden zunächst überkonfluente WB-F344 Zellen gleichzeitig 1,5 h mit Nocodazol und Cytochalasin B behandelt. Nocodazol unterbindet die Polymerisation der Mikrotubuli, was zur Folge hat, dass die Mikrotubuli nicht mehr an die Centromere binden können und es zu einem Arrest des Zellzyklus in der G_2/M-Phase kommt (Rennison *et al.*, 1992; Thyberg und Moskalewski, 1992). Cytochalasin B verhindert ebenfalls die Zellteilung, indem es der Polymerisation der Aktinfilamente entgegenwirkt (Forscher und Smith, 1988; Theodoropoulos *et al.*, 1994; Cimini *et al.*, 1998). Den entscheidenden Schritt der Centrosomen-Aufreinigung umfasste jedoch die Zelllyse. Durch Puffer mit geringem Salzanteil konnten die Centrosomen von den Zellkernen getrennt und in Lösung gebracht werden. Die gewonnenen Centrosomen wurden durch eine anschließende Zentrifugation über ein Ficoll-Kissen aufgereinigt und in einem Saccharose-Gradienten ankonzentriert. Zur Verwendung der aufgereinigten Centrosomen in

einem Western Blot wurden die Centrosomen-enthaltenden Fraktionen zentrifugiert und die Pellets in einem SDS-Gelladepuffer resuspendiert. Als Größenkontrolle wurden Gesamtzell-Lysate von unbehandelten und EGF-behandelten WB-F344 Zellen eingesetzt. Die mittels einer SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden auf eine Membran geblottet, welche zunächst mit dem anti-Cx43 Antikörper 71-0700 inkubiert wurde. Durch ein wiederholtes Stripping der Membran konnte die Membran nacheinander mit den Antikörpern SA226P, anti-γ-Tubulin, anti-Nedd4 und anti-Histon H1 reinkubiert werden. In Abb. 5.23 ist das Ergebnis der Western Blot Analyse gezeigt.

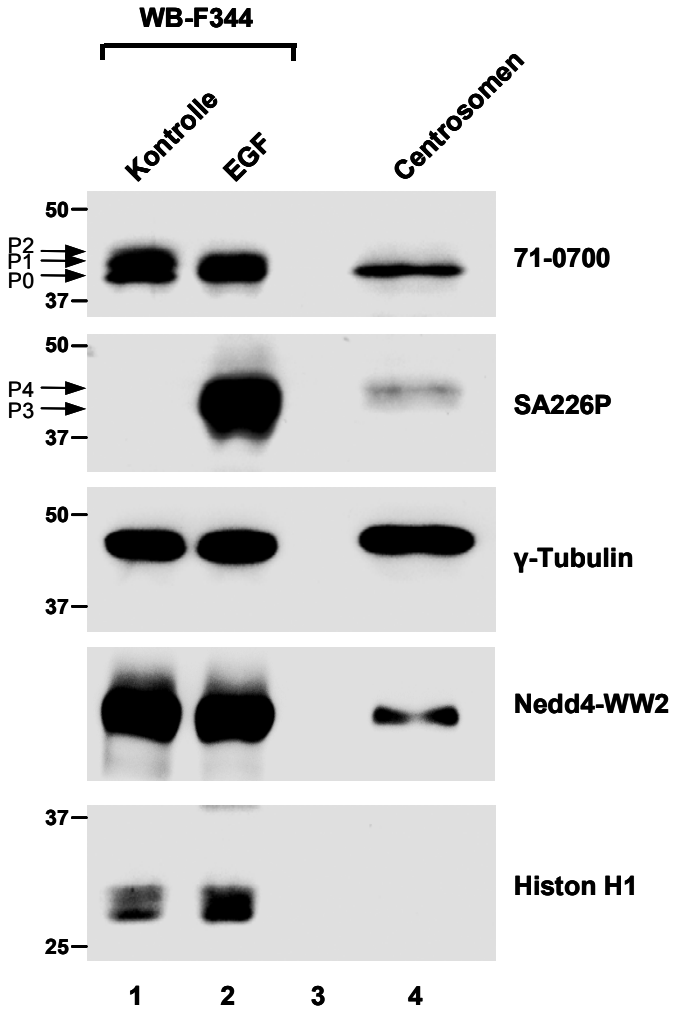


Abb. 5.23: Lokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43, unphosphoryliertem Cx43 und Nedd4 in den Centrosomen. In Spur 4 wurden die aufgereinigten Centrosomen aufgetragen. Als Größenkontrollen dienten je 20 µg ausgehungerte und unbehandelte bzw. EGF-behandelte Gesamtzell-Proteinextrakte (Spur 1 bzw. 2). Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und Cx43, Nedd4, γ-Tubulin und Histon H1 mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen. Die Inkubation der Membran mit anti-γ-Tubulin entsprach der Positivkontrolle, während die Inkubation mit anti-Histon H1 die Negativkontrolle darstellte. Sowohl unphosphoryliertes Cx43 wie auch S279/S282-phosphoryliertes Cx43 und Nedd4 war in den Centrosomen nachzuweisen. P0–P4 zeigen die unterschiedlichen Hauptphosphorylierungsformen von Cx43 in WB-F344 Zellen.

Wie aus Abb. 5.23 ersichtlich, wurde mit dem anti-Cx43 Antikörper 71-0700 die P0-Form in der Centrosomen-Fraktion detektiert, die auf das Vorhandensein von unphosphoryliertem Cx43 in den Centrosomen hinweist. Es wurden jedoch keine P1- und P2-Formen von Cx43 in den Centrosomen gefunden (Abb. 5.23, Spur 4).

Eine schwache aber eindeutige Bande konnte auch mit Antikörper SA226P nachgewiesen werden (Abb. 5.23, Spur 4). Der Vergleich mit EGF-induzierten S279/S282-phosphorylierten Cx43-Formen (Abb. 5.23, Spur 2) zeigte, dass die in den Centrosomen von Antikörper SA226P detektierte S279/S282-phosphorylierte Form vermutlich die P4-Form von Cx43 darstellt.

Durch die Inkubation der Membran mit dem anti-Nedd4 Antikörper konnte eine Lokalisation der Ubiquitin-Protein-Ligase in den Centrosomen gezeigt und die Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenz unter 5.3.1 bestätigt werden (Abb. 5.23, Spur 4). Wie erwartet lieferte der anti-γ-Tubulin Antikörper als Centrosomen-Marker ein starkes Signal in der Centrosomen-Fraktion (Abb. 5.23, Spur 4). Dagegen wurde kein Signal in der Centrosomen-Fraktion bei Verwendung des anti-Histon H1 Antikörpers detektiert (Abb. 5.23, Spur 4). Mit dieser Negativkontrolle konnte eine Kontamination der Centrosomen-Präparation mit Zellkernen oder Zellkernresten ausgeschlossen werden.

Im Gegensatz zu den indirekten Immunfluoreszenzen, die spezifisch eine Kolokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 und Nedd4 in den Centrosomen zeigten, ist in aufgereinigten Centrosomen von WB-F344 Zellen neben Nedd4 nicht nur S279/S282-phosphoryliertes, sondern auch unphosphoryliertes Cx43 nachweisbar.

5.4 Phosphorylierung und Proteasom-abhängiger Abbau von Cx43

Cx43 ist ein kurzlebiges Protein mit einer Halbwertszeit von etwa 1-5 h in Kulturzellen (Traub *et al.*, 1989; Musil *et al.*, 1990; Laird *et al.*, 1991). Damit wird Cx43 schneller umgesetzt als viele andere integrale Membranproteine. Sowohl das Lysosom (Larsen und Hai, 1978; Laing *et al.*, 1997; Musil *et al.*, 2000; Qin *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2003) wie auch das Ubiquitin-Proteasom-System (Laing und Beyer, 1995; Laing *et al.*, 1997; Musil *et al.*, 2000; Rutz und Hulser, 2001; Qin *et al.*, 2003; Leithe und Rivedal, 2004) werden für die Degradation von Cx43 diskutiert. In Übereinstimmung mit der erwiesenen Tatsache, dass die Ubiquitinierung ein Signal zur schnellen Degradation von Membranproteinen

darstellt, konnte für Cx43 die Regulation der Umsetzungsrate durch eine Ubiquitinierung gezeigt werden (Laing und Beyer, 1995; Rutz und Hulser, 2001). Neben einer Rolle in der Endozytose von vielen Membranproteinen, ist die Ubiquitinierung von Proteinen essenziell für einen Abbau dieser Proteine am Proteasom.

5.4.1 Abbau von Gap Junction Plaque-lokalisiertem, phosphoryliertem Cx43 durch das Proteasom

Ob das Proteasom tatsächlich einen regulatorischen Effekt auf Cx43 hat und ob dabei die Phosphorylierung von Cx43 eine Rolle spielt, wurde anhand von Western Blot Analysen (Abb. 5.24 A) und indirekten Immunfluoreszenzen (Abb. 5.24 B) geprüft. Konfluente WB-F344 Zellen wurden hierfür 24 h serumfrei kultiviert und mit EGF, Lactacystin oder einer Kombination aus beidem behandelt. Lactacystin stellt einen spezifischen und irreversiblen Inhibitor des Proteasoms dar (Fenteany *et al.*, 1995; Dick *et al.*, 1996, 1997; Corey und Li, 1999). Die Effekte auf Cx43 wurden im Western Blot mit dem anti-Cx43 Antikörper 71-0700 und in der indirekten Immunfluoreszenz mit dem anti-Cx43 Antikörper C13720 nachgewiesen. Um im Western Blot zu überprüfen, ob sich die Behandlungen speziell auf die S279/S282-phosphorylierten Formen von Cx43 auswirken, wurde die Membran gestrippt und mit dem Antikörper SA226P reinkubiert. Zur Ladekontrolle wurde die Membran erneut gestrippt und anschließend mit einem anti-Aktin Antikörper inkubiert. Mit Hilfe dieser Ladekontrolle sollte gezeigt werden, dass es sich bei den aufgetretenen Effekten nicht um Artefakte, sondern um tatsächliche Effekte handelte.

Wie unter 5.1.1 bereits beschrieben, führte eine EGF-Behandlung von WB-F344 Zellen zu einem Anstieg an phosphoryliertem Cx43 (Abb. 5.24 A, Spur 2, oben). Dabei ging das Auftreten der S279/S282-phosphorylierten P3-Form und in geringerem Ausmaß der P4-Form (Abb. 5.24 A, Spur 2, Mitte) direkt einher mit der Abnahme der unphosphorylierten Cx43-Form (Abb. 5.24 A, Spur 2, oben). In der Immunfluoreszenz wirkte sich eine EGF-Behandlung der WB-F344 Zellen durch eine Zunahme der Gap Junction Plaques an den Plasmamembranen aus (Abb. 5.24 Bb).

Um die durch Lactacystin hervorgerufenen Effekte sichtbar machen zu können, wurden die Zellen 6 h mit Lactacystin behandelt. Diese Inkubationszeit entspricht in etwa dreimal der Halbwertszeit von Cx43 in den verschiedenen Zellsystemen und sollte daher ausreichend sein, um eine Akkumulation bestimmter Cx43-Formen sowohl im Western Blot als auch in der Immunfluoreszenz zu detektieren.

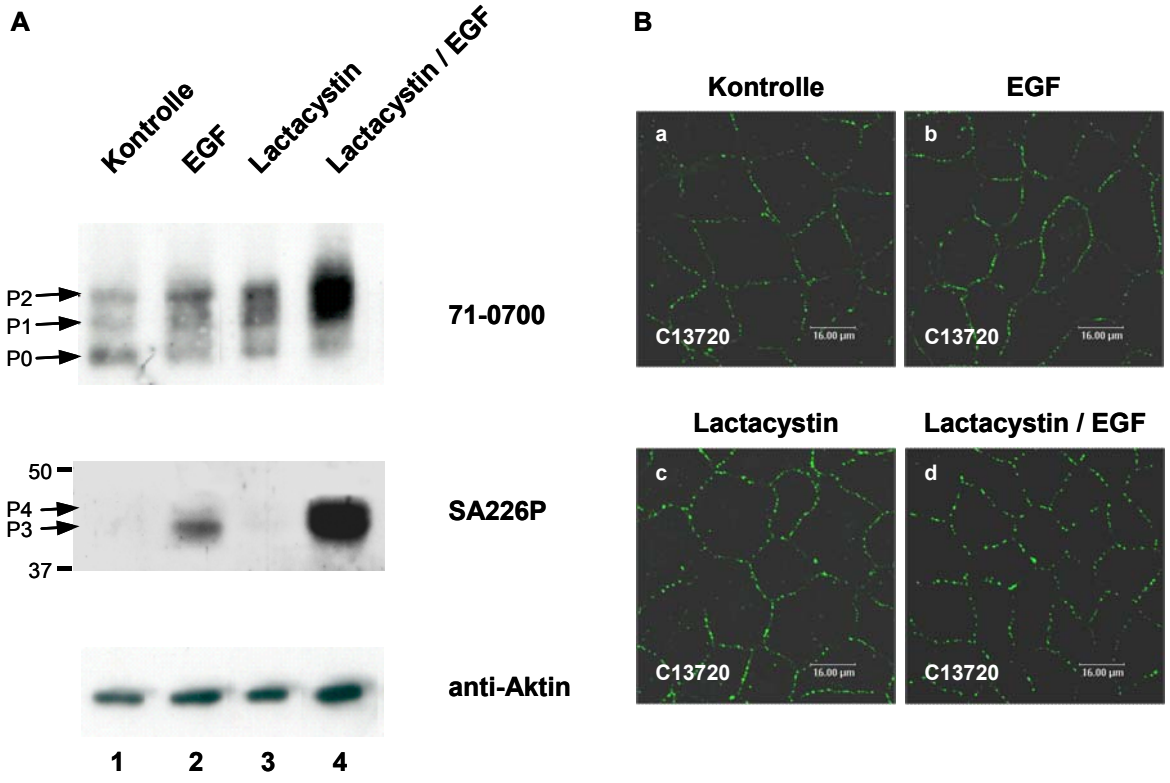


Abb. 5.24: Lactacystin verhindert den Abbau von phosphoryliertem Cx43. Konfluente und ausgehungerte WB-F344 Zellen wurden mit 100 ng/mL EGF für 15 min, mit 10 µM Lactacystin für 6 h oder einer Kombination aus EGF und Lactacystin behandelt. Unbehandelte Zellen wurden als Kontrolle verwendet.
(A) Je 20 µg der Proteinextrakte der Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die verschiedenen Formen von Cx43 wurden nacheinander mit den Antikörpern 71-0700 (oben) bzw. SA226P (Mitte) im Western Blot nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde die Membran erneut gestrippt und die Menge an Aktin detektiert. P0–P4 zeigen die unterschiedlichen Hauptphosphorylierungsformen von Cx43 in WB-F344 Zellen.
(B) Die Lokalisation von Cx43 in den behandelten WB-F344 Zellen wurde durch indirekte Immunfluoreszenz mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop dargestellt. Die fixierten Zellen wurden mit dem monoklonalen anti-Cx43 Antikörper C13720 gefärbt. Als sekundärer Antikörper wurde ein Alexa 488-gekoppelter Ziege-anti-Maus Antikörper eingesetzt. Sowohl im Western Blot wie auch in der Immunfluoreszenz wird deutlich, dass Lactacystin die EGF-abhängige Akkumulation der phosphorylierten Formen von Cx43 erhöht.

Wurde das Proteasom durch eine Behandlung der Zellen mit Lactacystin inhibiert, zeigte sich ein drastischer Anstieg der P1- und P2-Formen von Cx43, wohingegen die Menge an unphosphoryliertem Cx43 in etwa gleichem Maße abnahm (Abb. 5.24 A, Spur 3, oben). Die Inaktivierung des Proteasoms verschiebt damit das Verhältnis von phosphoryliertem zu unphosphoryliertem Cx43 zu Gunsten des phosphorylierten Proteins. Da eine Phosphorylierung von Cx43 zur P2-Form mit der Bildung von Gap Junction Plaques in Zusammenhang gebracht wird (Musil und Goodenough, 1991), war es interessant zu erfahren, ob eine Lactacystin-abhängige Anhäufung von phosphoryliertem Cx43 mit einer steigenden Anzahl an Gap Junction Plaques korreliert. Neben der erhöhten Menge an Gap Junction Plaques in Lactacystin-behandelten Zellen wirkten die Plaques zudem noch größer als Plaques in unbehandelten Zellen (Abb. 5.24 Bc).

Die gleichzeitige Behandlung von Lactacystin und EGF verstärkte die EGF-abhängige Anhäufung der P1- und P2-Formen von Cx43 (Abb. 5.24 A, Spur 4, oben). Auch in der indirekten Immunfluoreszenz ließ sich nach einer kombinierten Behandlung von Lactacystin und EGF eine noch größere Anzahl an Gap Junction Plaques nachweisen (Abb. 5.24 Bd).

Durch die Inkubation der Membran mit dem Antikörper SA226P wurde gezeigt, dass eine simultane Behandlung der Zellen mit EGF und dem Proteasom-Inhibitor Lactacystin vor allem die Menge an S279/S282-phosphorylierten Cx43-Formen in großem Maße erhöhte (Abb. 5.24 A, Spur 4, Mitte).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ausschließlich phosphorylierte Formen von Cx43, vor allem die S279/S282-phosphorylierten Cx43-Formen, Zielproteine des aktiven Proteasoms sind. Zudem kann aus den indirekten Immunfluoreszenzen geschlossen werden, dass hauptsächlich phosphoryliertes Cx43, welches in den Gap Junction Plaques lokalisiert ist, von dem Proteasom abgebaut wird.

6 Diskussion

6.1 Immunlokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 mit Antikörper SA226P

6.1.1 SA226P detektiert spezifisch S279/S282-phosphoryliertes Cx43

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, inwieweit sich die Phosphorylierung der beiden Serinreste S279 und S282 im zytoplasmatischen Carboxy-Terminus (C-Terminus) von Connexin 43 (Cx43) auf das Protein auswirkt. Schon lange ist bekannt, dass eine Phosphorylierung der Serinreste S279 und S282 ausreicht, um die Zell-Zell-Kommunikation über Gap Junctions zu zerstören (Warn-Cramer *et al.*, 1996). Obwohl der Signaltransduktionsweg vom aktivierten epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) -Rezeptor bis hin zur S279/S282-Phosphorylierung von Cx43 durch die „extracellular signal-regulated kinase ½“ (ERK1/2) ausführlich beschrieben ist, konnte bislang die genaue Funktion dieser Cx43-Phosphorylierung im Hinblick auf die Inhibierung der Gap Junction-vermittelten Zell-Zell-Kommunikation nicht geklärt werden. Ob sich die S279/S282-Phosphorylierung von Cx43 speziell auf den Transport der Connexone an die Plasmamembran oder auf den Auf- oder Abbau der Gap Junction Kanäle auswirkt, ob davon das Öffnen und das Schließen der Kanäle betroffen ist oder ob diese spezielle Phosphorylierung zu einer Degradation von Cx43 führt, sollte anhand dieser Arbeit untersucht werden.

Die Entwicklung und Charakterisierung eines Antikörpers, der spezifisch S279/S282-phosphorylierte Cx43-Formen von anderen Phosphorylierungsformen und dem unphosphorylierten Cx43 unterscheiden kann, war für die Analyse der S279/S282-Phosphorylierung von Cx43 und deren Funktionen eine entscheidende Voraussetzung.

Nach der Herstellung des Antikörpers SA226P, der spezifisch die S279/S282-phosphorylierten Formen von Cx43 erkennt, erfolgte die Charakterisierung von SA226P mittels Western Blot und Immunfluoreszenz in WB-F344 Zellen. WB-F344 Zellen sind epitheliale Rattenleberzellen, die große Mengen an Cx43 exprimieren und somit für die Analyse von Cx43 besonders geeignet sind. Die Detektion von

Cx43-Proteinen mit dem kommerziell erhältlichen anti-Cx43 Antikörper 71-0700 ergab in Western Blot Analysen stets drei Banden, die vermutlich drei unterschiedlich phosphorylierte Formen von Cx43 darstellen. Während die am schnellsten laufende Phosphorylierungsform 0 (P0-Form) dem unphosphorylierten Cx43 entspricht, beinhalten die beiden etwas langsamer laufenden Banden hauptsächlich serinphosphorylierte Formen von Cx43 (Musil und Goodenough, 1991; Matesic *et al.*, 1994). Mit dem anti-Cx43 Antikörper 71-0700 als Kontrolle konnte gezeigt werden, dass der Antikörper SA226P in Proteinextrakten aus unbehandelten WB-F344 Zellen spezifisch eine noch langsamer laufende Form von Cx43 erkennt. Diese „neue“ Bande wurde daher als Phosphorylierungsform 3 (P3-Form) bezeichnet. Wahrscheinlich handelt es sich bei dieser Form um eine noch stärker phosphorylierte Form von Cx43. Die Behandlung der Proteinextrakte mit alkalischer Phosphatase resultierte in einem Verlust der Antikörper-Reaktivität im Western Blot. Dieses beweist die Spezifität des Antikörpers SA226P für eine phosphorylierte Form von Cx43. Untermauert wird diese Beobachtung durch Ergebnisse, die mit dem anti-Cx43 Antikörper 71-0700 erzielt wurden. Nach einer alkalischen Phosphatase-Behandlung des Proteinextrakts wurde mit diesem Antikörper lediglich die am schnellsten laufende Bande, die bereits als unphosphoryliertes Cx43 identifiziert wurde, detektiert.

Anhand der vorliegenden Experimente ist es nicht möglich zu unterscheiden, ob die von Antikörper SA226P detektierte Form ausschließlich S279/S282-phosphoryliertes Cx43 erkennt oder auch Formen detektiert, die zusätzlich an anderen Aminosäureresten phosphoryliert sind. Es scheint jedoch recht unwahrscheinlich, dass die mit Antikörper SA226P identifizierte Bande nur Cx43 beinhaltet, das einzig an den beiden Serinresten S279 und S282 phosphoryliert ist. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse in 5.1.1 bestätigt. In EGF-behandelten Zellen erschien im Western Blot mit dem Antikörper SA226P zusätzlich zur P3-Form, die in unbehandelten Zellen detektiert wurde, eine noch langsamer laufende Form von Cx43, die Phosphorylierungsform 4 (P4-Form) benannt wurde. Dieses weist auf die Phosphorylierung von mindestens einer weiteren Aminosäure neben den bereits phosphorylierten Serinresten S279 und S282 hin. Nach heutigem Wissensstand werden zwölf der 21 Serinreste und zwei der sechs Tyrosinreste im C-Terminus von Cx43 durch verschiedene Kinasen phosphoryliert (Lampe und Lau, 2004). Die spezifische Kombination aus Serin- und Tyrosinresten,

die am C-Terminus von Cx43 phosphoryliert vorliegt, entscheidet, ob die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions positiv oder negativ beeinflusst wird. In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu erwähnen, dass weder die Phosphorylierungsform 1 (P1-Form) noch die Phosphorylierungsform 2 (P2-Form) von Cx43 mit dem Antikörper SA226P reagieren. Damit lässt sich möglicherweise eine S279/S282-Phosphorylierung in diesen Formen von Cx43 ausschließen. Zudem kann davon ausgegangen werden, dass der anti-Cx43 Antikörper 71-0700 keine S279/S282-phosphorylierten Formen von Cx43 erkennt. Die Tatsache, dass der Antikörper SA226P nur bestimmte Banden von Cx43 im Western Blot erkennt, deutet darauf hin, dass die Phosphorylierung von Cx43 einem strikten Muster folgt. Scheinbar werden verschiedene Aminosäurereste stets gleichzeitig phosphoryliert, während andere davon ausgeschlossen sind.

Es ist bekannt, dass Wachstumsfaktoren eine starke Cx43-Phosphorylierung hervorrufen (Lau *et al.*, 1992; Oh *et al.*, 1993; Hossain *et al.*, 1998; Suarez und Ballmer-Hofer, 2001). So führt die EGF-Behandlung von Zellen u.a. zu einer Phosphorylierung der Serinreste S279 und S282 im zytoplasmatischen C-Terminus von Cx43. Als Indiz dafür, dass der Antikörper SA226P spezifisch die S279/S282-phosphorylierten Formen von Cx43 erkennen kann, wurde ein verstärktes Phosphorylierungs-Signal in EGF-behandelten Zellen gegenüber unbehandelten Zellen erwartet. Die Behandlung von WB-F344 Zellen mit EGF bewirkte im Western Blot nach der Inkubation mit Antikörper SA226P tatsächlich ein verstärktes Signal der P3-Form von Cx43 und zeichnete sich zudem durch das Auftreten der neuen P4-Form aus. Anhand dieser Ergebnisse kann angenommen werden, dass der Antikörper SA226P spezifisch S279/S282-phosphorylierte Formen von Cx43 detektiert. Durch Versuche mit AG1478, einem selektiven Inhibitor der EGF-Rezeptor Tyrosinkinase, wurde gezeigt, dass die Zunahme der P3-Form, das Auftreten der P4-Form und die Lokalisation dieser beiden Cx43-Formen in Gap Junction Plaques an den Plasmamembranen von EGF-behandelten Zellen auf die Aktivität der EGF-Rezeptor Tyrosinkinase zurückzuführen war. Ferner scheint die Aktivierung der „mitogen-activated protein kinase/ERK1/2 kinase“ (MEK1) an der Phosphorylierung von Cx43 an den beiden Serinresten S279 und S282 beteiligt zu sein. Da jedoch die Behandlung der Zellen mit dem MEK1-Inhibitor PD98059 nicht zu einem vollständigen Verlust der EGF-vermittelten Phosphorylierung von Cx43 führte, liegt die Vermutung nahe, dass neben MEK1 weitere Kinasen über

andere Signaltransduktionswege Cx43 EGF-vermittelt phosphorylieren. In Übereinstimmung mit den hier beschriebenen Ergebnissen deuten bereits veröffentlichte Daten darauf hin, dass eine EGF-bedingte Aktivierung des EGF-Rezeptors zu einer Weiterleitung des Signals über Ras/Raf/MEK1/ERK1/2 führt und letztendlich in der Phosphorylierung von Cx43 an den Serinresten S255, S279 und S282 resultiert (Warn-Cramer *et al.*, 1996, 1998; Warn-Cramer und Lau, 2004). Dass sich der MEK1-Inhibitor PD98059 nicht auf alle Phosphorylierungsvorgänge inhibierend auswirkt, lässt sich dadurch erklären, dass Cx43 durch EGF neben dem oben genannten Signaltransduktionsweg auch über andere Wege wie z.B. über den EGF-Rezeptor/c-Src/MEKK2/MEK5/ERK5-Weg (Warn-Cramer und Lau, 2004) phosphoryliert werden kann.

6.1.2 Immunlokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43

Die indirekte Doppelimmunfluoreszenz mit dem kommerziell erhältlichen monoklonalen anti-Cx43 Antikörper C13720 und dem Antikörper SA226P verdeutlichte, dass die Gap Junction Plaque Strukturen in EGF-behandelten WB-F344 Zellen hauptsächlich aus S279/S282-phosphorylierten Cx43-Formen bestanden. Neben den S279/S282-phosphorylierten Formen existierten an den Plasmamembranen jedoch auch andere Cx43-Formen, die statt an den Serinresten S279 und S282 an anderen Aminosäureresten phosphoryliert waren. Eventuell war auch unphosphoryliertes Cx43 an den Plasmamembranen lokalisiert. Dieses erscheint allerdings eher unwahrscheinlich, da die P0-Form von Cx43 mit der Lokalisation im Golgi-Apparat in Verbindung gebracht wird (Musil und Goodenough, 1991). Nach heutigen Erkenntnissen geht man davon aus, dass die Phosphorylierung von mindestens fünf Serinresten erforderlich ist, um den Zusammenbau der Kanäle an der Plasmamembran und deren Funktion zu gewährleisten (Musil und Goodenough, 1991; Lampe, 1994; Laird *et al.*, 1995; Beardslee *et al.*, 1998; Cooper *et al.*, 2000).

Während der anti-Cx43 Antikörper 71-0700 Gap Junction Plaques in unbehandelten sowie in EGF-behandelten WB-F344 Zellen detektierte, ließen sich mit dem Antikörper SA226P in unbehandelten Zellen keine derartigen Strukturen an den Plasmamembranen nachweisen. Daraus kann geschlossen werden, dass eine

S279/S282-Phosphorylierung von Cx43 für eine Lokalisation des Proteins an der Plasmamembran nicht erforderlich ist. Diese Ergebnisse spiegeln bereits veröffentlichte Daten wider. So konnte mit Hilfe einer Dreifach-Mutante an den Serinresten S255, S279 und S282 (S255A, S279A, S282A) von Cx43 gezeigt werden, dass in Cx43-defizienten Zellen die Expression der Dreifach-Mutante zu voll funktionsfähigen Kanälen führt (Warn-Cramer *et al.*, 1998).

Die Detektion von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 im Zellkern von unbehandelten WB-F344 Zellen war überraschend. Allerdings war die Lokalisation von phosphoryliertem Cx43 im Zellkern bereits bekannt, da in epithelialen Rattenleberzellen, die mit dem src- oder dem neu-Onkogen transformiert worden waren, Cx43 ebenfalls im Zellkern nachgewiesen werden konnte (de Feijter *et al.*, 1996). Zudem konnte erst kürzlich eine Lokalisation des C-Terminus von Cx43 in den Zellkernen verschiedener Zelllinien gezeigt werden (Dang *et al.*, 2003). Beide Beobachtungen korrelierten scheinbar mit einer Phosphorylierung von Cx43.
Da der Antikörper SA226P gegen die Aminosäurereste 271-288 im C-Terminus von Cx43 gerichtet ist, kann in der Immunfluoreszenz nicht zwischen dem vollständigen Cx43-Protein und dessen C-Terminus unterschieden werden. Es scheint daher denkbar, dass eine gezielte Phosphorylierung von bestimmten Aminosäureresten ein Signal auslöst, das eine Spaltung von Cx43 zur Folge hat. Damit könnte ein Transport des C-Terminus von Cx43 in den Zellkern ermöglicht werden. Untermauert wird diese Hypothese durch die Analyse der Cx43-Aminosäuresequenz mit den Software-Programmen SubLoc v1.0 (http://www.bioinfo.tsinghua.edu.cu/SbLoc) und PSORTII (http://www.psort.nibb.ac.jp). Während die Programme für die Gesamtsequenz von Cx43 eine Membranlokalisation ermitteln, berechnen beide für den zytoplasmatischen C-Terminus eine nukleäre Lokalisation.

6.2 Nedd4 – die Ubiquitin-Protein-Ligase als neuartiger Interaktionspartner von Cx43

Bislang wurden 22 Interaktionspartner von Cx43 identifiziert, die alle an den zytoplasmatischen C-Terminus des Proteins binden (Hervé *et al.*, 2004). Die Bindung an die Interaktionspartner scheint dabei von der Phosphorylierung bestimmter Aminosäurereste von Cx43 abzuhängen. So bindet z.B. das Protein Zonula occludens 1 (ZO-1) nur an Cx43, wenn der Tyrosinrest Y265 in unphosphoryliertem Zustand vorliegt. Eine Phosphorylierung dieses Tyrosinrestes bedingt dagegen den Verlust der Bindung (Toyofuku *et al.*, 2001).
Um Auswirkungen einer S279/S282-Phosphorylierung auf bestehende Interaktionen zwischen Cx43 und anderen zellulären Proteinen zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit neue Bindungspartner von Cx43 gesucht.

6.2.1 *In vitro*-Bindung von Nedd4 an Cx43 über seine WW2- und WW3-Domänen

Mit der Ubiquitin-Protein-Ligase „neural precursor cell expressed, developmentally downregulated 4“ (Nedd4) konnte ein neuartiger und in Bezug auf die Gap Junction Degradation interessanter Interaktionspartner von Cx43 identifiziert werden.
Cx43 ist ein sehr kurzlebiges Protein mit einer Halbwertszeit von 1-5 h (Traub *et al.*, 1989; Musil *et al.*, 1990; Laird *et al.*, 1991; Beardslee *et al.*, 1998). Damit wird Cx43 schneller umgesetzt als die meisten anderen integralen Membranproteine. Man nimmt an, dass sowohl das Lysosom (Larsen und Hai, 1978; Laing *et al.*, 1997; Musil *et al.*, 2000; Qin *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2003) wie auch das Proteasom (Laing und Beyer, 1995; Laing *et al.*, 1997; Musil *et al.*, 2000; Rutz und Hulser, 2001; Qin *et al.*, 2003; Leithe und Rivedal, 2004) am Abbau von Cx43 beteiligt ist. In den meisten Fällen ist die Ubiquitinierung von Proteinen essenziell für ihren Abbau am Proteasom. In den letzten Jahren zeigte sich jedoch immer mehr, dass eine Ubiquitinierung auch eine wichtige Rolle in der Endozytose von vielen Transmembranproteinen spielt und dass dieses einen Abbau der Proteine durch

das lysosomale System zur Folge hat (Bonifacino und Weissmann, 1998; Rotin *et al.*, 2000). Über das Protein, welches Ubiquitin auf Cx43 überträgt, um damit Cx43 für das Lysosom oder das Proteasom zu markieren, wurde in der Literatur viel spekuliert.

Nachgewiesen wurde die Bindung von Nedd4 an den C-Terminus von Cx43 anhand von Pulldown-Analysen mit Proteinextrakten aus WB-F344 Zellen und anschließender „nanoelectrospray ionization mass spectrometry"-Analyse. Für unterschiedliche Ionenkanäle ist bereits bekannt, dass ihre Interaktion mit der Ubiquitin-Protein-Ligase Nedd4 zu einer Ubiquitinierung führt. Dieses hat eine Internalisierung der Kanäle von der Plasmamembran und deren Abbau durch das Lysosom zur Folge (Staub *et al.*, 1996, 1997; Abriel *et al.*, 1999, 2000; Schwake *et al.*, 2001). Gewährleistet wird die Interaktion durch die Bindung vom xPPxY-Motiv (PY-Motiv) der unterschiedlichen Ionenkanäle an die WW-Domänen von Nedd4. Interessanterweise konnte das PY-Motiv, ein Protein-Protein-Interaktionsmotiv (Chen und Sudol, 1995), im zytoplasmatischen C-Terminus von Cx43 lokalisiert werden. Es wird von den Aminosäureresten 282-286 umschlossen.

Mit Hilfe von Pulldown-Analysen wurde gezeigt, dass die Domänen WW2 und WW3 von Nedd4 der Ratte (rNedd4) an den C-Terminus von Cx43 binden. Dagegen war die WW1-Domäne nicht in der Lage, mit dem C-Terminus von Cx43 zu interagieren. In Übereinstimmung mit Cx43 konnten verschiedene andere Proteine wie der „p45 nuclear factor E2", die RNA-Polymerase II oder die Untereinheiten des epithelialen Natriumkanals ebenfalls nicht an die WW1-Domäne von Nedd4 binden, obwohl nachgewiesen wurde, dass diese Proteine über ihre PY-Motive mit Nedd4 interagieren (Gavva *et al.*, 1997; Harvey *et al.*, 1999). Für die Aktivität des epithelialen Natriumkanals war jedoch neben den WW-Domänen 2 und 3 auch eine intakte WW1-Domäne essenziell (Harvey *et al.*, 1999). Dieses lässt vermuten, dass die WW1-Domäne im Allgemeinen eher eine Rolle in der Regulation der Kanäle spielt, wobei diese Regulation unabhängig von einer direkten Bindung der WW1-Domäne an die Kanäle zu sein scheint.

Ein wichtiger Aspekt für die Bindung von Cx43 an die WW3-Domäne von Nedd4 ist der Phosphorylierungsstatus von Cx43. Während sich in unbehandelten WB-F344 Zellen eine Bindung von Cx43 an die WW3-Domäne zeigte, war in Serum-ausgehungerten Zellen keine Interaktion von Cx43 mit WW3 nachzuweisen. Durch

eine EGF-Behandlung der ausgehungerten WB-F344 Zellen ließ sich die Bindung von Cx43 zur Domäne WW3 wiederherstellen, was die Relevanz einer Cx43-Phosphorylierung für die Interaktion mit der WW3-Domäne von Nedd4 noch einmal verdeutlicht. Dass phosphorylierte Aminosäurereste in der Nähe von oder inmitten eines PY-Motivs einen zusätzlichen Effekt auf die Bindung an Nedd4 ausüben, konnte bereits für die Untereinheiten des Natriumkanals gezeigt werden (Shimkets *et al.*, 1998; Chigaev *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2002). Interessanterweise befinden sich die beiden Serinreste S279 und S282, die EGF-bedingt durch die MAP Kinasen phosphoryliert und vom Antikörper SA226P erkannt werden, im aminoterminal erweiterten PY-Motiv von Cx43. Entgegen den Erwartungen ergaben jedoch die Ergebnisse des Western Blots mit dem Antikörper SA226P im Anschluss an die Pulldown-Analyse, dass die S279/S282-Phosphorylierung lediglich einen geringen Effekt auf die Bindung von Cx43 an die WW3-Domäne von rNedd4 hat. Eine durch EGF hervorgerufene Phosphorylierung von anderen Aminosäureresten scheint für die Interaktion von Cx43 mit WW3 eine weitaus größere Rolle zu spielen. An welchen Aminosäureresten Cx43 phosphoryliert sein muss, um eine Bindung an WW3 zu erleichtern, ist bislang nicht bekannt.

In den Surface Plasmon Resonance (SPR) -Experimenten band die WW3-Domäne weder an das unphosphorylierte noch an das S279/S282-phosphorylierte PY-Motiv aus dem C-Terminus von Cx43. Zusammengefasst mit den Ergebnissen der Pulldown-Analysen deuten diese Befunde darauf hin, dass die WW3-Domäne von Nedd4 ein anderes Prolin-reiches Motiv im C-Terminus von Cx43 erkennt. Zudem ist nicht auszuschließen, dass das eigentliche PY-Motiv zwar von der WW3-Domäne erkannt wird, andere Aminosäurereste rund um das PY-Motiv aber von WW3 favorisiert werden und somit eine Bindung unterbunden wird. Zusätzlich zum PY-Motiv sind bislang zwei weitere WW-Bindemotive beschrieben worden: das PGM-Motiv (Lehman *et al.*, 1998) und das PPLP-Motiv (Bedfort *et al.*, 1996; Chan *et al.*, 1996). Ob eines dieser beiden Motive oder ein anderes Motiv im C-Terminus von Cx43 für die Interaktion von Cx43 mit der WW3-Domäne von Nedd4 verantwortlich ist, kann mit den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten nicht beantwortet werden. Auch die genaue Bedeutung der S279/S282-Phosphorylierung von Cx43 für die Regulation der Interaktion mit Nedd4 durch die WW3-Domäne ist bislang unklar und muss mit Hilfe weiterer Versuche untersucht werden.

6.2.2 *In vitro*-Bindung der WW2-Domäne von Nedd4 an das PY-Motiv von Cx43

Die Ergebnisse der SPR-Analysen zeigten eindeutig, dass die WW2-Domäne die einzige WW-Domäne von rNedd4 war, die in der Lage war, an das erweiterte PY-Motiv aus dem C-Terminus von Cx43 zu binden. Die berechneten Bindeaffinitäten hatten eine Größenordnung von 1 µM und stimmten damit mit den Bindeaffinitäten überein, die für die Interaktion von murinem Nedd4 mit dem epithelialen Natriumkanal gemessen worden waren (Asher *et al.*, 2001, 2003; Shi *et al.*, 2002). Lagen die beiden Serinreste S279 und S282 im erweiterten PY-Motiv in phosphoryliertem Zustand vor, erhöhte dieses die Bindeaffinität von Cx43 zur WW2-Domäne um etwa den Faktor 2. Dieser Effekt besaß jedoch keine statistische Signifikanz ($p<0,05$). Im Vergleich ergab die Bindeaffinität des erweiterten, S279/S282-phosphorylierten PY-Motivs von Cx43 zur WW2-Domäne von rNedd4 einen ähnlichen Wert wie die Bindeaffinität des Serin-phosphorylierten PY-Motivs aus der β-Untereinheit des epithelialen Natriumkanals zur WW4-Domäne von rNedd4-1 (Henry *et al.*, 2003). Dass die Bindung des S279/S282-phosphorylierten PY-Motivs an die WW2-Domäne von rNedd4 aber spezifisch ist, konnte anhand von Kompetitionsexperimenten mit einem S279/S282-phosphorylierten Peptid gezeigt werden. Die ansteigende Konzentration an kompetitierendem Peptid im Versuchsansatz korrelierte dabei mit einer sinkenden Bindefähigkeit von WW2 an das immobilisierte S279/S282-phosphorylierte Peptid.

Im Einklang mit den SPR-Ergebnissen unterstützten die Resultate der Pulldown-Analysen den Befund, dass die Phosphorylierungen von Cx43 nur einen geringen Effekt auf die Interaktion der WW2-Domäne mit Cx43 haben. Eine Bindung der WW2-Domäne an verschiedene Formen von Cx43, u.a. auch der S279/S282-phosphorylierten Form, konnte in unbehandelten sowie in ausgehungerten oder in EGF-behandelten Zellen beobachtet werden. Die biochemischen Analysen zeigten damit, dass die Interaktion zwischen Cx43 und Nedd4 zumindest durch eine Bindung des erweiterten PY-Motivs von Cx43 an die WW2-Domäne von Nedd4 gewährleistet wird, wobei die Phosphorylierung des Proteins für diese Bindung nur eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint.

6.2.3 Abhängigkeit der Kolokalisation von Cx43 und Nedd4 bzw. Ubiquitin von der Cx43-Phosphorylierung

Die kommerziell erhältlichen anti-Cx43 und anti-Nedd4 Antikörper waren nicht effizient genug, um eine Koimmunpräzipitation beider Proteine in verschiedenen Zelllinien durchführen zu können. Im Gegensatz zum Protein ZO-1, das mit Cx43 koimmunpräzipitiert werden konnte (Giepmans und Moolenaar, 1998; Toyofuku *et al.*, 1998; Giepmans *et al.*, 2001a; Barker *et al.*, 2002), schien die Menge von Nedd4, die in der Zelle *in vivo* an Cx43 band, wesentlich geringer. Der Unterschied wird deutlich, wenn man nach der Pulldown-Analyse von 5.2.1 die ZO-1-Bande mit der Nedd4-Bande vergleicht. Anzumerken ist, dass in diese Pulldown-Analyse nicht weniger als 6,7 mg Zell-Lysat eingesetzt worden waren.

Um dennoch eine Interaktion von Cx43 und Nedd4 *in vivo* nachzuweisen, wurden indirekte Doppelimmunfluoreszenzen mit dem polyklonalen anti-Cx43 Antikörper 71-0700 und einem monoklonalen anti-Nedd4 Antikörper durchgeführt. Da sämtliche kommerziell erhältliche, monoklonale anti-Nedd4 Antikörper nicht in der Rattenzelllinie WB-F344 einsetzbar waren, wurde für diese Versuche die murine Zelllinie Hepa1c1c7 WT eingesetzt.

Eine Kolokalisation von Nedd4 und der durch den Antikörper 71-0700 detektierten Formen von Cx43 konnte in einigen vesikulären Strukturen im Zytoplasma aufgezeigt werden. Vermutlich stellen diese Strukturen multivesikuläre Körper („multivesicular bodies“, MVB) dar. Für eine Vielzahl von Transmembranproteinen ist bekannt, dass Ubiquitin als Signal für eine Internalisierung der Proteine sowie für das „Sorting“ der Proteine zu den MVB dient, wobei eine Monoubiquitinierung ausreichend ist, um in die MVB einzudringen (Katzmann *et al.*, 2002). Zum Abbau der monoubiquitinierten Proteine verschmelzen schließlich die MVB mit dem Lysosom. Ob ein derartiger Mechanismus tatsächlich auf die Ubiquitinierung und die Degradation von Cx43 zutrifft, sollte sich durch Immunfluoreszenz-Experimente mit Markern des Endozytoseweges nachweisen lassen. Ferner sollte dadurch die Kolokalisation von Cx43 und Nedd4 exakt zu definieren sein.

Falls eine Ubiquitinierung von Cx43 durch Nedd4 neben dem „Sorting“ von Cx43 in die MVB tatsächlich als Signal zur Internalisierung der Gap Junction Kanäle dient, sollte eine Kolokalisation von Cx43 und Nedd4 beziehungsweise (bzw.) Ubiquitin an den Plasmamembranen nachweisbar sein. Eine Kolokalisation von Cx43 und

Nedd4 an den Plasmamembranen konnte jedoch nicht gezeigt werden. Und obwohl in einer Immungold-Doppelmarkierung gefriergebrochener Zellen bereits Ubiquitin-gebundenes Cx43 an der Plasmamembran beobachtet wurde (Rutz und Hulser, 2001), wiesen in dieser Arbeit unphosphoryliertes Cx43 und die P1- und P2-Formen des Proteins, die mit dem Antikörper 71-0700 detektiert wurden, weder in unbehandelten Zellen noch in EGF-behandelten Zellen eine Kolokalisation mit Ubiquitin auf. Auch in den indirekten Doppelimmunfluoreszenzen mit dem Antikörper SA226P zeigte sich keine Kolokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 und Nedd4 bzw. Ubiquitin an den Plasmamembranen von Hepa1c1c7 WT Zellen sowie EGF-behandelten WB-F344 Zellen.

Es sind verschiedene Möglichkeiten denkbar, diese Beobachtungen zu begründen. Zum einen wäre es möglich, dass in einem Gap Junction Plaque nur sehr wenige Cx43-Moleküle mit Nedd4 eine Bindung eingehen und ubiquitiniert werden. Da Gap Junction Plaques jeweils bis zu viele tausend Gap Junction Kanäle beinhalten und einen Durchmesser bis zu einigen Mikrometern erreichen (McNutt und Weinstein, 1970; Forge *et al.*, 2003), würde das starke Fluoreszenzsignal eines Gap Junction Plaques in der Immunfluoreszenz somit die schwachen Signale einzelner Nedd4- oder Ubiquitin-Moleküle überstrahlen. Des Weiteren ist es vorstellbar, dass die Interaktion von Nedd4 mit Cx43 an der Plasmamembran von so kurzer Dauer ist, dass die Detektion einer Kolokalisation beider Proteine in der indirekten Doppelimmunfluoreszenz sehr schwierig ist. Eine dritte Möglichkeit besteht darin, dass anstelle von Nedd4 ein anderes Protein für die Ubiquitinierung von Cx43 an den Plasmamembranen verantwortlich ist.

6.3 Die Bedeutung der phosphorylierten Serinreste S279 und S282 von Cx43 für die Zellzyklus-abhängige Steuerung der Gap Junctions

Transiente Veränderungen in der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions scheinen für einen normalen Zellzyklus essenziell zu sein. So wird z.B. der Cx43-Phosphorylierung durch die Protein Kinase C eine verminderte Zell-Zell-Kommunikation während des Fortschreitens der Zellen von der G_0 in die Synthese (S) -Phase zugeschrieben (Koo *et al.*, 1997). Mit dem Durchlaufen des Zellzyklus von der Mitose über die G_1- bis hin zur S-Phase nimmt die Phosphorylierung von Cx43 stetig zu (Kanemitsu *et al.*, 1998; Bittman und LoTurco, 1999). Zudem ist bereits bekannt, dass eine Zellzyklus-abhängige Phosphorylierung verschiedener Serinreste zu einem Verlust der Zell-Zell-Kommunikation während der Mitose führt (Kanemitsu *et al.*, 1998; Lampe *et al.*, 1998; Solan *et al.*, 2003). Während der verschiedenen Phasen des Zellzyklus scheint daher die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions durch die Phosphorylierung von Cx43 reguliert zu werden.

6.3.1 Immunlokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 in mitotischen Zellen

Bei den Auswertungen der indirekten Immunfluoreszenzen mit dem Antikörper SA226P, der spezifisch die S279/S282-phosphorylierten Formen von Cx43 erkennt, fielen stets vereinzelte, in der Mitose befindliche Zellen auf, die im Vergleich zu nicht mitotischen Zellen ein anderes Fluoreszenzmuster aufwiesen.

Während in unbehandelten, nicht-mitotischen Zellen die S279/S282-phosphorylierten Formen von Cx43 nur schwach im Zellkern zu beobachten waren, zeigte sich mit dem Antikörper SA226P in mitotischen Zellen eine auffallend starke Fluoreszenz in den Centrosomen. Ein zellspezifischer Effekt kann jedoch ausgeschlossen werden, da die Lokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 nicht auf die Centrosomen von mitotischen WB-F344 Zellen beschränkt war, sondern auch in mitotischen Hepa1c1c7 WT Zellen nachgewiesen werden konnte.

Dass es sich bei den gefärbten Strukturen tatsächlich um Centrosomen handelte, wurde durch indirekte Doppelimmunfluoreszenzen mit dem Antikörper SA226P und den Antikörpern gegen die Centrosomen-Marker γ-Tubulin bzw. Pericentrin nachgewiesen.

Die Vorbehandlung des in die indirekte Doppelimmunfluoreszenz eingesetzten Antikörpers SA226P mit einem S279/S282-phosphorylierten Peptid resultierte in einem Verlust des Signals und damit auch im Verlust der Kolokalisation mit γ-Tubulin. Dieses verdeutlichte noch einmal die Spezifität des Antikörpers SA226P für die S279/S282-phosphorylierten Cx43-Formen und demonstrierte gleichzeitig die Lokalisation von S279/S282-phosphorylierten Cx43-Formen in den Centrosomen mitotischer Zellen.

Neben der Lokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 in den Centrosomen zeigte sich ein auffällig starkes Signal an S279/S282-phosphoryliertem Cx43 in den Gap Junction Plaques an den Plasmamembranen von mitotischen WB-F344 Zellen. Dagegen waren mit dem anti-Cx43 Antikörper 71-0700 wesentlich weniger Gap Junction Plaques an den Plasmamembranen von mitotischen Zellen nachzuweisen als an den Plasmamembranen von nicht-mitotischen Zellen. Einige Zellen, die sich in der Mitose befanden, zeigten mit dem Antikörper 71-0700 keine Fluoreszenzsignale. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass während der Mitose eine Hyperphosphorylierung von Cx43 an den Plasmamembranen stattfindet, die offensichtlich eine Phosphorylierung der beiden Serinreste S279 und S282 einschließt.

Für verschiedene Zelltypen ist bereits bekannt, dass mitotische Zellen eine spezielle und nur in der Mitose vorkommende Cx43-Hyperphosphorylierung aufweisen (Xie *et al.*, 1997; Kanemitsu *et al.*, 1998; Lampe *et al.*, 1998). Je nach Arbeitsgruppe wurde diese spezielle Form von Cx43 mit $Cx43_m$ oder P3 benannt. Entsprechend der in dieser Arbeit charakterisierten S279/S282-phosphorylierten P3- und P4-Form von Cx43 läuft die $Cx43_m$-Form geringfügig langsamer als die P2-Form des Proteins. Das Laufverhalten ähnelt zudem Cx43-Proteinen, die aus EGF-behandelten Zellen extrahiert wurden. Wie bereits beschrieben, führt eine EGF-Behandlung der Zellen stets zur Phosphorylierung der Serinreste S279 und S282 (Warn-Cramer *et al.*, 1998; Cameron *et al.*, 2003). Beide Beobachtungen lassen somit vermuten, dass es sich bei der beschriebenen $Cx43_m$-Form um eine S279/S282-phosphorylierte Form von Cx43 handelt.

6.3.2 Mögliche Auswirkungen der S279/S282-Phosphorylierung auf Cx43 während der Mitose

Parallel zu einer Hyperphosphorylierung von Cx43 während der Mitose zeigte sich eine verminderte Zell-Zell-Kommunikation über die Gap Junction Kanäle zwischen mitotischen Zellen und nicht-mitotischen Zellen (Xie *et al.*, 1997; Kanemitsu *et al.*, 1998; Lampe *et al.*, 1998). Eine mögliche Konsequenz der S279/S282-Phosphorylierung von Cx43 im Allgemeinen oder speziell während der Mitose, könnte demnach die Internalisierung bzw. der Abbau der Gap Junction Kanäle sein. Befunde, die in mitotischen Zellen verschiedener Zelllinien beobachtet wurden, deuten darauf hin, dass ein Verlust der Zell-Zell-Kommunikation während der Mitose auf eine Internalisierung der Gap Junction Kanäle von der Plasmamembran bzw. deren Abbau zurückzuführen ist (Xie *et al.*, 1997; Lampe *et al.*, 1998). Vergleichbar mit mitotischen Zellen kam es auch in EGF-behandelten epithelialen Rattenleberzellen zu einer Verlagerung von Cx43 aus den Gap Junction Plaques in intrazelluläre, vesikuläre Kompartimente (Leithe und Rivedal, 2004). Die transiente EGF-bedingte Hyperphosphorylierung von Cx43, die die beiden Serinreste S279 und S282 einschloß, führte dabei zur Ubiquitinierung, Internalisierung und zum Abbau von Cx43 durch das Proteasom (Leithe und Rivedal, 2004). Es scheint daher möglich, dass eine „natürliche“ S279/S282-Phosphorylierung von Cx43 während der Mitose ebenfalls die Ubiquitinierung, Internalisierung und den Abbau der Gap Junction Kanäle am Proteasom bewirkt und damit eine verminderte Zell-Zell-Kommunikation zwischen der mitotischen Zelle und den benachbarten nicht-mitotischen Zellen bedingt.

Hinweise für eine Ubiquitinierung von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 durch Nedd4 ergaben sich aus den indirekten Doppelimmunfluoreszenzen mit dem Antikörper SA226P und dem anti-Nedd4 Antikörper. Eine Kolokalisation der S279/S282-phosphorylierten Formen von Cx43 und Nedd4 konnte dabei ausschließlich in den Centrosomen von mitotischen Hepa1c1c7 WT Zellen nachgewiesen werden.

Übereinstimmend mit dem Ergebnis der indirekten Doppelimmunfluoreszenz von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 und Nedd4 war die Kolokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 und Ubiquitin in den Centrosomen von mitotischen Zellen.

Ergänzend zu den indirekten Immunfluoreszenzen ließ sich mittels Western Blot Analysen aufgereinigter Centrosomen zeigen, dass spezifisch die P4-Form der S279/S282-phosphorylierten Cx43-Formen in den Centrosomen zu finden ist. Dagegen scheint die P3-Form, die ebenfalls vom Antikörper SA226P erkannt wird, von einer Centrosomen-Lokalisation ausgeschlossen zu sein. Auch dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die Phosphorylierung von Cx43 einem festgelegten Muster folgt. Es ist demnach denkbar, dass die Zellzyklus-assoziierte Feinregulierung des Abbaus der Gap Junction Kanäle sowie die der Degradation von Cx43 durch bestimmte Phosphorylierungskombinationen gewährleistet wird.
Unerwartet war das Ergebnis des Western Blots nach der Inkubation mit dem anti-Cx43 Antikörper 71-0700. Es zeigte sich eine eindeutige Bande in Höhe der unphosphorylierten Cx43-Form. Beim Vergleich beider Signale war nicht auszuschließen, dass in den Centrosomen mehr unphosphoryliertes als S279/S282-phosphoryliertes Cx43 vorlag. Eine Aussage darüber, welches der beiden Proteine in den Centrosomen quantitativ vorherrscht, lässt sich jedoch nicht treffen, da die eingesetzten Antikörper verschiedene Affinitäten zu ihren Zielproteinen besitzen. Die Kontamination der Centrosomen-Präparation mit Zellkernen konnte aber ausgeschlossen werden, da eine Inkubation des Western Blots mit dem anti-Histon H1 Antikörper kein Signal in der Centrosomen-Fraktion lieferte. Es kann daher angenommen werden, dass sowohl die P4- wie auch die P0-Form von Cx43 in den Centrosomen lokalisiert ist. Warum die Lokalisation der P0-Form in den Centrosomen nicht durch die indirekten Immunfluoreszenz-Experimente nachgewiesen werden konnte, muss an dieser Stelle offen bleiben.
Die gezielte Ubiquitinierung von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 durch Nedd4 in den Centrosomen scheint jedoch möglich, da die indirekte Doppelimmun-fluoreszenz und auch die Western Blot Analysen der aufgereinigten Centrosomen ausschließlich eine Kolokalisation von Nedd4 und S279/S282-phosphoryliertem Cx43 in den Centrosomen aufzeigen.

6.3.3 Transport des S279/S282-phosphorylierten Cx43 von der Plasmamembran zu den Centrosomen mitotischer Zellen

Da S279/S282-phosphoryliertes Cx43 während der Mitose in den Gap Junction Plaques an den Plasmamembranen sowie in den Centrosomen lokalisiert war, sich eine Kolokalisation mit Nedd4 jedoch nur in den Centrosomen nachweisen ließ, liegt die Vermutung nahe, dass S279/S282-phosphoryliertes Cx43 während der Mitose von der Plasmamembran zu den Centrosomen transportiert wird, um dort durch Nedd4 ubiquitiniert zu werden. In diesem Kontext stellt sich nun die Frage, welcher Mechanismus für den Transport der Gap Junction Kanäle von der Plasmamembran zu den Centrosomen verantwortlich sein könnte.
Da bekannt ist, dass Cx43 an die Mikrotubuli binden kann (Giepmans *et al.*, 2001b), könnte ein möglicher Transport der S279/S282-phosphorylierten Cx43-Moleküle von der Plasmamembran zu den Centrosomen in mitotischen Zellen entlang der Mikrotubuli erfolgen. Für NuMA, dem „nuclear mitotic apparatus protein“, wurde bereits ein Zellzyklus-abhängiger Transport beschrieben. Die Lokalisation und Funktion von NuMA wird über die Phosphorylierung und Dephosphorylierung des Proteins reguliert, wobei die Phosphorylierung von NuMA zu Beginn der Mitose den Proteintransport vom plus-Ende der Mikrotubuli zum minus-Ende und damit zu den Centrosomen bewirkt (Zeng, 2000).

6.4 Rolle des Proteasoms für den Abbau von Cx43

Die Centrosomen sind neben dem Zytoplasma, dem ER und dem Zellkern weitere Kompartimente, in denen ein funktionsfähiges, aktives Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) vorliegt (Wigley *et al.*, 1999; Fabunmi *et al.*, 2000). Um den Abbau von Proteinen am 26S-Proteasom zu gewährleisten, ist meist eine Polyubiquitinierung nötig, die ihrerseits eine posttranslationale Modifikation des Zielproteins voraussetzt. Dabei kann es sich um eine Phosphorylierung des Zielproteins und/oder eine Protein-Protein-Interaktion des Zielproteins mit einem anderen Protein handeln (Ciechanover *et al.*, 1995).

Es wäre daher vorstellbar, dass S279/S282-phosphoryliertes Cx43 gezielt zu den Centrosomen transportiert wird, um dort mit Hilfe von Nedd4 ubiquitiniert und durch das 26S-Proteasom abgebaut zu werden. Ob sich die Ubiquitinierung von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 in den Centrosomen ausschließlich auf Zellen in der Mitose beschränkt oder ob es sich dabei um einen allgemeingültigen Prozess handelt, lässt sich nicht beurteilen. In Hepa1c1c7 WT Zellen, deren Centrosomen relativ groß und damit auch in der Interphase deutlich zu sehen sind, lässt sich eine Kolokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 und Nedd4 auch in Centrosomen von nicht-mitotischen Zellen nachweisen. Diese Beobachtung würde für einen allgemeingültigen Prozess sprechen.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, bedingen Veränderungen der Funktion von Gap Junctions auch die Augenkrankheit „Grauer Star“. Zur Untersuchung der Entstehung dieser Linsentrübung werden epitheliale Zellen der Augenlinse als Modellsystem verwendet. Für diese Art von Zellen ist bereits bekannt, dass die Phosphorylierung von Cx43 zum Abbau des Proteins durch das Proteasom führt (Girão und Pereira, 2003). Inwieweit sich speziell die S279/S282-Phosphorylierung auf den Abbau von Cx43 durch das Proteasom auswirkt, wurde in Lactacystin-behandelten WB-F344 Zellen demonstriert. Die Western Blot Analysen mit dem anti-Cx43 Antikörper 71-0700 in 5.4.1 zeigten eindeutig, dass die Hemmung des Proteasoms mit dem spezifischen Inhibitor Lactacystin zu einem Anstieg der P1- und P2-Formen von Cx43 führte, während unphosphoryliertes Cx43 etwa in gleichem Maße abnahm. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass ausschließlich phosphorylierte Formen von Cx43 Zielproteine des aktiven 26S-Proteasoms sind. Wie bereits erwähnt, wird die P2-Form von Cx43 mit dem Aufbau von Gap Junction Plaques in Verbindung gebracht (Musil und Goodenough, 1991). Die Tatsache, dass in Lactacystin-behandelten Zellen mehr und größere Gap Junction Plaques an den Plasmamembranen nachzuweisen sind als in unbehandelten oder EGF-behandelten Zellen, bestätigt damit die Ergebnisse der Western Blot Analysen. Zudem kann aus diesem Ergebnis geschlossen werden, dass scheinbar nur phosphorylierte Cx43-Moleküle vom Proteasom abgebaut werden können, die in Gap Junction Plaques lokalisiert sind. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnte eine derartige Lactacystin-abhängige Akkumulation von phosphoryliertem Cx43 bereits in MDA-MB231 Zellen nachgewiesen werden (Qin *et al.*, 2003).

Dass vor allem die S279/S282-phosphorylierten Formen von Cx43 das Ziel des 26S-Proteasoms sind, wurde anhand der Inkubation des Western Blots mit dem Antikörper SA226P nachgewiesen. Hier verstärkte der Proteasom-Inhibitor Lactacystin das EGF-abhängige Auftreten von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 in großem Maße. Die biologische Funktion und die Degradation der Gap Junction Kanäle könnte somit über die phosphorylierungsabhängige Umsetzungsrate von Cx43 reguliert werden, wobei die S279/S282-Phosphorylierung von Cx43 eine entscheidende Rolle in diesem Prozess zu spielen scheint.

6.5 Abbau von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 in den Centrosomen

Abbildung 6.1 fasst die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse und die daraus resultierenden Hypothesen noch einmal schematisch zusammen und setzt sie mit den bereits veröffentlichten Daten in Beziehung.

Nach der Synthese von Cx43 im endoplasmatischen Retikulum findet eine Oligomerisierung von sechs Cx43-Molekülen zu Connexonen statt. Mit Hilfe von Transportvesikeln gelangen die Connexone vom trans-Golgi-Kompartiment über die Mikrotubuli zur Plasmamembran. Die Connexone wandern diese entlang, bis sie auf einen Gap Junction Plaque treffen. Hier können Connexone der einen Zelle mit Connexonen der benachbarten Zelle interagieren und dadurch vollständige Gap Junction Kanäle bilden.

Bei einer Mehrzahl der Gap Junction Plaques, die die P1- und P2-Formen von Cx43 enthalten, scheint die Internalisierung über „Annular Gap Junctions“ und MVB zu erfolgen. Da die von anti-Cx43 Antikörper 71-0700 erkannten Formen von Cx43 und Nedd4 scheinbar in den MVB kolokalisieren, lassen die Ergebnisse dieser Arbeit vermuten, dass Cx43 in den MVB durch die Ubiquitin-Protein-Ligase Nedd4 ubiquitiniert wird. Der endgültige Abbau von Cx43 würde in diesem Fall durch eine Verschmelzung der MVB mit den Lysosom gewährleistet werden.

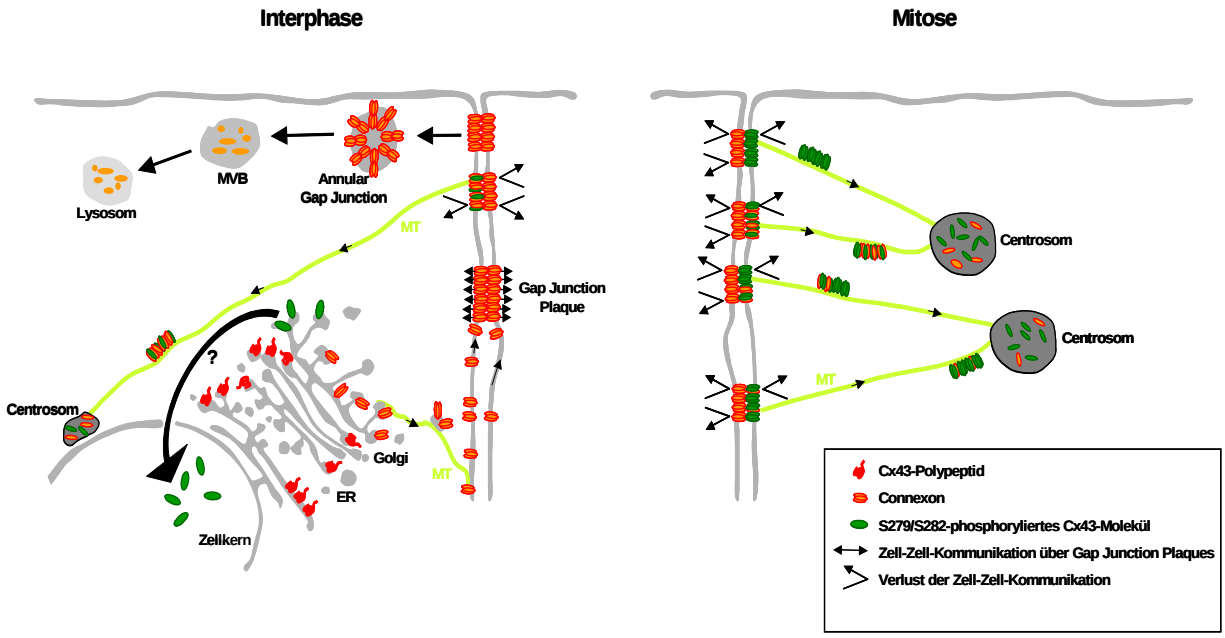


Abb. 6.1: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte, die zum Abbau der Cx43-Gap Junction Kanäle während der Interphase bzw. der Mitose führen könnten. Der Einfachheit halber sind die einzelnen Strukturen nicht in ihren relativen Größen zueinander dargestellt. (modifiziert nach Segretain und Falk, 2004)

Sobald eine Zelle in die Mitose eintritt, scheinen die Cx43-Moleküle in den meisten Gap Junction Plaques an der Plasmamembran hyperphosphoryliert zu werden, was sich in einem Verlust der Zell-Zell-Kommunikation auswirkt (Xie *et al.*, 1997; Kanemitsu *et al.*, 1998; Lampe *et al.*, 1998). Eine Hyperphosphorylierung von Cx43 schließt dabei die Phosphorylierung der beiden Serinreste S279 und S282 ein und wird vermutlich durch ein Zusammenspiel der aktivierten MAP Kinasen mit anderen Kinasen wie z.B. der $p34^{cdc2}$/Cyclin B Kinase gewährleistet. Die daraus resultierende Internalisierung der Gap Junction Plaques erfolgt vermutlich entlang der Mikrotubuli bis zu den Centrosomen. Ob dabei die kompletten Gap Junction Plaques oder einzelne Gap Junction Kanäle internalisiert werden, kann nicht beantwortet werden. In den Centrosomen treffen die S279/S282-phosphorylierten Cx43-Moleküle schließlich auf die Maschinerie des UPS. Dieses hat die Ubiquitinierung von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 durch die Ubiquitin-Protein-Ligase Nedd4 zur Folge und resultiert letztendlich in der Degradation von Cx43 durch das 26S-Proteasom, welches im Zellkern, im ER, im Zytoplasma, aber auch in den Centrosomen lokalisiert ist.

7 Literatur

Abriel, H., Loffing, J., Rebhun, J. F., Pratt, J. H., Schild, L., Horisberger, J. D., und Rotin, D. (1999) *J. Clin. Invest.* **103,** 667-673

Abriel, H., Kamynina, E., Horisberger, J. D., und Staub, O. (2000) *FEBS Lett.* **466,** 377-380

Ahmad, S., Diez, J. A., George, C. H., und Evans, W. H. (1999) *Biochem. J.* **339,** 247-253

Alessi, D. R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D. T., und Saltiel, A. R. (1995) *J. Biol. Chem.* **27,** 27489-27494

Asher, C., Chigaev, A., und Garty, H. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **286,** 1228-1231

Asher, C., Sinha, I., und Garty, H. (2003) *Biochim. Biophys. Acta* **1612,** 59-64

Axline, S. G. (1970) *Semin. Hematol.* **7,** 142-160

Barker, R. J., Price, R. L., und Gourdie, R. G. (2002) *Circ. Res.* **22,** 317-324

Beardslee, M., Laing, J., Beyer, E., und Saffitz, J. (1998) *Circ. Res.* **83,** 629-635

Bedfort, M. T., Chan, D., und Leder, P. (1996) *EMBO J.* **16,** 2376-2383

Bergoffen, J., Scherer, S. S., Wang, S., Scott, M. O., Bone, L. J., Paul, D. L., Chen, K., Lensch, M. W., Chance, P. F., und Fischbeck, K. H. (1993) *Science* **262,** 2039-2042

Berthoud, V. M., Ledbetter, M. L. S., Hertzberg, E. L., und Saez, J. C. (1992) *Eur. J. Cell Biol.* **57,** 40-50

Bittman, K. S., und LoTurco, J. J. (1999) *Cereb. Cortex* **9,** 188-195

Bonifacino, J. S., und Weissman, A. M. (1998) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14,** 19-57

Bornens, M. (2002) *Curr. Opin. Cell Biol.* **14,** 25-34

Breitschopf, K., Bengal, E., Ziv, T., Admon, A., und Ciechanover, A. (1998) *EMBO J.* **17,** 5964-5973

Britz-Cunningham, S. H., Shah, M. M., Zuppan, C. W., und Fletcher, W. H. (1995) *N. Engl. J. Med.* **332,** 1323-1329

Bruzzone, R., White, T. W., und Paul, D. L. (1996) *Eur. J. Biochem.* **238,** 1-27

Cameron, S. J., Malik, S., Akaike, M., Lee, D. J., Lerner-Marmorosh, N., Yan, C., Abe, J. L., und Yang, J. (2003) *J. Biol. Chem.* **278,** 18682-18688

Carpenter, G., und Wahl, M. (1990) *Handbook of Experimental Pharmacology* **95,** 69-171

Cascio, M., Kumar, N. M., Safarik, R., und Gilula, N. B. (1995) *J. Biol. Chem.* **270,** 18643-18648

Chan, D., Bedfort, M. T., und Leder, P. (1996) *EMBO J.* **15,** 1045-1054

Chen, H. I., und Sudol, M. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92,** 7819-7823

Chigaev, A., Lu, G., Shi, H., Asher, C., Xu, R., Latter, H., Seger, R., Garty, H., und Reuveny, E. (2001) *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **280,** 1030-1036

Ciechanover, A., Laszlo, A., Bercovich, B., Stancovski, I., Alkalay, I., Ben-Neriah, Y., und Orian, A. (1995) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **60,** 491-501

Ciechanover, A. (1998) *EMBO J.* **17,** 7151-7160

Cimini, D., Fioravanti, D., Tanzarella, C., und Degrassi, F. (1998) *Chromosoma* **107,** 479-485

Cole, N. B., Smith, C. L., Sciaky, N., Terasaki, M., Edidin, M., und Lippincott-Schwartz, J. (1996) *Science* **273,** 797-801

Coleman, W. B., McCullough, K. D., Esch, G. L., Faris, R. A., Hixson, D. C., Smith, G. J., und Grisham, J. W. (1997) *Am. J. Pathol.* **151,** 353-359

Conkright, M. D., Wani, M. A., und Lingrel, J. B. (2001) *J. Biol. Chem.* **276,** 29299-29306

Cooper, C. D., Solan, J. L., Dolejsi, K. K., und Lampe, P. D. (2000) *Methods* **20,** 196-204

Cooper, C. D., und Lampe, P. D. (2002) *J. Biol. Chem.* **277,** 44962-44968

Corey, E. J., und Li, W. D. (1999) *Chem. Pharm. Bull.* **47,** 1-10

Coscoy, L., und Ganem, D. (2003) *Trends Cell Biol.* **13,** 7-12

Dang, X., Doble, B. W., und Kardami, E. (2003) *Mol. Cell. Biochem.* **242,** 35-38

de Feijter, A. W., Matesic, D. F., Ruch, R. J., Guan, X., Chang, C. C., und Trosko, J. E. (1996) *Mol. Carcinog.* **16,** 203-212

de Mello, W. C. (1994) *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **61,** 1-35

Dick, L. R., Cruikshank, A. A., Grenier, L., Melandri, F. D., Nunes, S. L. und Stein, R. L. (1996) *J. Biol. Chem.* **271,** 7273-7276

Dick, L. R., Cruikshank, A. A., Destree, A. T., Grenier, L., McCormack, T. A., Melandri, F. D., Nunes, S. L., Palombella, V. J., Parent, L. A., Plamondon, L., und Stein, R. L. (1997) *J. Biol. Chem.* **272,** 182-188

Dudley, D. T., Pang, L., Decker, S. J., Bridges, A. J., und Saltiel, A. R. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92,** 7686-7689

Eiberger, J., Degen, J., Romualdi, A., Deutsch, U., Willecke, K., und Sohl, G. (2001) *Cell Commun. Adhes.* **8,** 163-165

Ellenberg, J., Siggia, E. D., Moreira, J. E., Smith, C. L., Presley, J. F., Worman, H. J., und Lippincott-Schwartz, J. (1997) *J. Cell Biol.* **138,** 1193-1206

Enenkel, C., Lehmann, A., und Kloetzel, P.-M. (1998) *EMBO J.* **17,** 6144-6154

Evans, W. H., Ahmad, S., Diez, J., George, C. H., Kendall, J. M., und Martin, P. E. (2000) *Novartis Found. Symp.* **219,** 44-59

Fabunmi, R. P., Wigley, W. C., Thomas, P. J., und DeMartino, G. N. (2000) *J. Biol. Chem.* **275,** 409-413

Falk, M. M., Buehler, L. K., Kumar, N. M., und Gilula, N. B. (1997) *EMBO J.* **16,** 2703-2716

Fallon, R. F., und Goodenough, D. A. (1981) *J. Cell. Biol.* **90,** 521-526

Fenteany, G., Standaert, R. F., Lane, W. S., Choi, S., Corey, E. J., und Schreiber, S. L. (1995) *Science* **286,** 726-731

Feretti, L., und Sgaramella, V. (1981) *Nucl. Acids Res.* **9,** 85-93

Forge, A., Becker, D., Casalotti, S., Edwards, J., Marziano, N., und Nevill, G. (2003) *J. Comp. Neurol.* **467,** 207-231

Forscher, P., und Smith, S. J. (1988) *J. Cell Biol.* **107,** 1505-1516

Freemont, P. S., Hanson, I. M., und Trowsdale, J. (1991) *Cell* **64,** 483-484

Futter, C. E., Pearse, A., Hewlett, L. J., und Hopkins, C. R. (1996) *J. Cell Biol.* **132,** 1011-1023

Gaietta, G., Deerinck, T. J., Adams, S. R., Bouwer, J., Tour, O., Laird, D. W., Sosinsky, G. E., Tsien, R. Y., und Ellisman, M. H. (2002) *Science* **296,** 503-507

Gajewska, B., Kaminska, J., Jesionowska, A., Martin, A., Hopper, A. K., und Zoladek, T. (2001) *Genetics* **157,** 91-101

Gavva, N. R., Gavva, R., Ermekova, K., Sudol, M., und Shen, C.-K. J. (1997) *J. Biol. Chem.* **272,** 24105-24108

Giepmans, B. N., und Moolenaar, W. H. (1998) *Curr. Biol.* **8,** 931-934

Giepmans, B. N., Verlaan, I., und Moolenaar, W. H. (2001) *Cell Commun. Adhes.* **8,** 219-223

Giepmans, B. N., Verlaan, I., Hengeveld, T., Janssen, H., Calafat, J., Falk, M. M., und Moolenaar, W. H. (2001) *Curr. Biol.* **11,** 1364-1368

Girão, H., und Pereira, P. (2003) *Mol. Vis.* **9,** 24-30

Glickman, M. H., und Ciechanover, A. (2002) *Physiol. Rev.* **82,** 373-428

Goodenough, D. A., Goliger, J. A., und Paul, D. L. (1996) *Annu. Rev. Biochem.* **65,** 475-502

Goshroy, S., Goodenough, D. A., und Sosinsky, G. E. (1995) *J. Membr. Biol.* **146,** 15-28

Guthrie, S. C., und Gilula, N. B. (1989) *Trends Neurosci.* **12,** 12-16

Hanna, E. A., Umhauer, S., Roshong, S. L., Piechocki, M. P., Fernstrom, M. J., Fanning, J. D., und Ruch, R. J. (1999) *Carcinogenesis* **20,** 1369-1373

Harris, A. L. (2001) *Q. Rev. Biophys.* **34,** 325-472

Harvey, K. F., Dinudom, A., Komwatana, P., Jolliffe, C. N., Day, M. L., Parasivam, G., Cook, D. I., und Kumar, S. (1999) *J. Biol. Chem.* **274,** 12525-12530

Hein, C., Springael, J., Volland, C., Haguenauer-Tsapis, R., und Andre B. (1995) *Mol. Micro. Biol.* **18,** 77-87

Heinemeyer, W., Simeon, A., Hirsch, H. H., Schiffer, H. H., Teichert, U., und Wolf, D. H. (1991) *Biochem. Soc. Trans.* **19,** 724-725

Helliwell, S. B., Losko, S., und Kaiser, C. A. (2001) *J. Cell Biol.* **153,** 649-662

Henry, P. C., Kanelis, V., O'Brien, M. C., Kim, B., Gautschi, I., Forman-Kay, J., Schild, L., und Rotin, D. (2003) *J. Biol. Chem.* **278,** 20019-20028

Hervé, J.-C-., Bourmeyster, N., und Sarrouilhe, D. (2004) *Biochim. Biophys. Acta* **1662,** 22-41

Hicke, L. (1999) *Trends Cell Biol.* **9,** 107-112

Holtz-Wagenblatt, A., und Shalloway, D. (1993) *Crit. Rev. Oncog.* **4,** 541-548

Honegger, A. M., Dull, T. J., Bellot, F., Van Obberghen, E., Szapary, D., Schmidt, A., Ullrich, A., und Schlessinger, J. (1988) *EMBO J.* **7,** 3045-3052

Hossain, M. Z., Ao, P., und Boyton, A. L. (1998) *J. Cell Physiol.* **176,** 332-341

Huang, X., Poy, F., Zhang, R., Joachimiak, A., Sudol, M., und Eck, M. J. (2000) *Nat. Struct. Biol.* **7,** 634-638

Huibregtse, J. M., Scheffner, M., Beaudenon, S., und Howley, P. M. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92,** 2563-2567

Hunzicker, W., und Geuze, H. J. (1996) *Bioessays* **18,** 379-389

Jackson, P. K., Eldridge, A. G., Freed, E., Furstenthal, L., Hsu, J. Y., Kaiser, B. K., und Reimann, J. D. (2000) *Trends Cell Biol.* **10,** 429-439

Jamakosmanovic, A., und Loewenstein, W. R. (1968) *Nature* **218,** 775

Joazeiro, C. A., und Weissman, A. M. (2000) *Cell* **102,** 549-552

Johnsson, B., Lofas, S., und Lindquist, G. (1991) *Anal. Biochem.* **198,** 268-277

Johnsson, B., und Malmqvist, G. (1992) Advances in biosensors. JAI Press Ltd., London, United Kingdom, 291-336

Jordan, K., Chodock, R., Hand, A. R., und Laird, D. W. (2001) *J. Cell. Sci.* **114,** 763-773

Jung, D., Yang, B., Meyer, J., Chamberlain, J. S., und Campell, K. P. (1995) *J. Biol. Chem.* **270,** 27305-27310

Kanelis, V., Rotin, D., und Forman-Kay, J. D. (2001) *Nat. Struct. Biol.* **8,** 407-412

Kanemitsu, M. Y., Jiang, W., und Eckhart, W. (1998) *Cell Growth Differ.* **9,** 13-21

Kanno, Y., und Matsui, Y. (1968) *Nature* **218,** 775-776

Kasanov, J., Pirozzi, G., Uveges, A. J., und Kay, B. K. (2001) *Chem. Biol. (Lond.)* **8,** 231-241

Katzmann, D. J., Babst, M., und Emr, S. D. (2001) *Cell* **106,** 145-155

Katzmann, D. J., Odorizzi, G., und Emr, S. D. (2002) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3,** 893-905

Kay, B. K., Williamson, M. P., und Sudol, M. (2000) *FASEB J.* **14,** 231-241

Kelsell, D. P., Dunlop, J., Stevens, H. P., Lench, N. J., Liang, J. N., Parry, G., Mueller, R. F., und Leigh, I. M. (1997) *Nature* **387,** 80-83

Kikonyogo, A., Bouamr, F., Vana, M. L., Xiang, Y., Aiyar, A., Carter, C., und Leis, J. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98,** 11199-11204

King, T. J., Fukushima, L. H., Hieber, A. D., Shimabukuro, K. A., Sakr, W., und Bertram, J. S. (2000) *Carcinogenesis* **21,** 1097-1109

Knop, M., Schiffer, H. H., Rupp, S., und Wolf, D. H. (1993) *Curr. Opin. Cell Biol.* **5,** 990-996

Koo, S. K., Kim, D. Y., Park, S. D., Kang, K. W., und Joe, C. O. (1997) *Mol. Cell. Biochem.* **167,** 41-49

Kumar, S., Tomooka, Y., und Noda, M. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **185,** 1155-1161

Kumar, N. M., und Gilula, N. B. (1996) *Cell* **84,** 381-388

Kumar, S., Harvey, K. F., Kinoshita, M., Copeland, N. G., Noda, M., und Jenkins, N. A. (1997) *Genomics* **40,** 435-443

Kurata, W. E., und Lau, A. F. (1994) *Oncogene* **9,** 329-335

Kyhse-Andersen, J. (1984) *J. Biochem. Biophys. Methods* **10,** 203-209

Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227,** 680-685

Laing, J. G., und Beyer, E. C. (1995) *J. Biol. Chem.* **270,** 26399-26403

Laing, J. G., Tadros, P. N., Westphale, E. M., und Beyer, E. C.(1997) *Exp. Cell Res.* **236,** 482-492

Laird, D. W., Puranam, K. L., und Revel, J. P. (1991) *Biochem. J.* **273,** 67-72

Laird, D. W., Castillo, M., und Kasprzak, L. (1995) *J. Cell Biol.* **131,** 1193-1203

Laird, D. W. (1996) *J. Bioenerg. Biomembr.* **28,** 311-318

Lampe, P. D. (1994) *J. Cell Biol.* **127,** 1895-1905

Lampe, P. D., Kurata, W. E., Warn-Cramer, B. J., und Lau, A. F. (1998) *J. Cell Sci.* **111,** 833-841

Lampe, P. D., TenBroek, E. M., Burt, J. M., Kurata, W. E., Johnson, R. G., und Lau, A. F. (2000) *J. Cell Biol.* **126,** 1503-1512

Lampe, P. D., und Lau, A. F. (2004) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36,** 1171-1186

Larsen, W. J., und Hai, N. (1978) *Tissue Cell* **10,** 585-598

Larsen, W. J., Tung, H. N., Murray, S. A., und Swenson, C. A. (1979) *J. Cell Biol.* **83,** 576-587

Larsen, W. J., Tung, H. N., und Polking, C. (1981) *Biol. Reprod.* **25,** 1119-1134

Lau, A. F., Kanemitsu, M. Y., Kurata, W. E., Danesh, S., und Boynton, A. L. (1992) *Mol. Biol. Cell* **3,** 865-874

Lauf, U., Giepmans, B. N., Lopez, P., Braconnot, S., Chen, S. C., und Falk, M. M. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99,** 10446-10451

Lehman, A. L., Nakatsu, Y., Ching, A., Bronson, R. T., Oakey, R. J., Keiper-Hrynko, N., Finger, J. N., Durham-Pierre, D., Horton, D. B., Newton, J. M., Lyon, M. F., und Brilliant, M. H. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95,** 9436-9441

Leithe, E., und Rivedal, E. (2004) *J. Cell Sci.* **117,** 1211-1220

Lin, R., Warn-Cramer, B. J., Kurata, W. E., und Lau, A. F. (2001) *J. Cell Biol.* **154,** 815-827

Lin, X., Liang, M., und Feng, X. H. (2000) *J. Biol. Chem.* **275,** 36818-36822

Liu, S., Taffet, S., Stoner, L., Delmar, M., Vallano, M. L., und Jalife, J. (1993) *Biophys. J.* **64,** 1422-1433

Loewenstein, W. R., und Kanno, Y. (1966) *Nature* **209,** 1248-1249

Loewenstein, W. R., und Kanno, Y. (1967) *J. Cell Biol.* **33,** 225-234

Loewenstein, W. R. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* **560,** 1-65

Loewenstein, W. R. (1981) *Physiol. Rev.* **61,** 829-913

Loewenstein, W. R., und Rose, B. (1992) *Semin. Cell Biol.* **3,** 59-79

Lovering, R., Hanson, I. M., Borden, K. L., Martin, S., O'Reilly, N. J., Evan, G. I., Rahman, D., Pappin, D. J., Trowsdale, J., und Freemont, P. S.(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90,** 2112-2116

Lu, P. J., Zhou, X. Z., Shen, M., und Lu, K. P. (1999) *Science* **283,** 1325-1328

Lucero, P., und Lagunas, R. (1997) *FEMS Microbiol. Lett.* **147,** 273-277

Macias, M. J., Hyvonen, M., Baraldi, E., Schultz, J., Sudol, M., Saraste, M., und Oschkinat, H. (1996) *Nature* **382,** 646-649

Makowski, L., Caspar, D. L., Phillips, W. C., und Goodenough, D. A. (1977) *J. Cell Biol.* **74,** 629-645

Margolis, B. und Skolnik, E. Y. (1994) *J. Am. Soc. Nephrol.* **5,** 1288-1299

Matesic, D. F., Rupp, H. L., Bonney, W. J., Ruch, R. J., und Trosko, J. E. (1994) *Mol. Carcinog.* **10,** 226-236

Mazet, F., Wittenberg, B. A., und Spray, D. C. (1985) *Circ. Res.* **56,** 195-204

McNutt, N. S., und Weinstein, R. S. (1970) *J. Cell Biol.* **47,** 666-688

Mehta, P. P., Bertram, J. S., und Loewenstein, W. R. (1986) *Cell* **44,** 187-196

Mesnil, M., und Yamasaki, H. (1993) *Mol. Carcinog.* **1,** 14-17

Meyers, J. A., Sanchez, D., Elwell, L. P., und Falkow, S. (1976) *J. Bacteriol.* **127,** 1529-1537

Miller, S. M., Garfield, R. E., und Daniel, E. E. (1989) *Am. J. Physiol.* **256,** C130-C141

Morley, G. E., Taffet, S. M., und Delmar, M. (1996) *Biophys. J.* **70,** 1294-1302

Morton, D. B. (1976) *Front. Biol.* **45,** 203-255

Mosser, E. A., Kasanov, J. D., Forsberg, E. C., Kay, B. K., Ney, P. A., und Bresnick, E. H. (1998) *Biochemistry* **37,** 13686-13695

Moudjou, M., Bordes, N., Paintrand, M., und Bornens, M. (1996) *J. Cell Sci.* **109,** 875-887

Musil, L. S., Beyer, E. C., und Goodenough, D. A. (1990) *J. Membr. Biol.* **116,** 163-175

Musil, L. S., und Goodenough, D. A. (1991) *J. Cell Biol.* **115,** 1357-1374

Musil, L. S., und Goodenough, D. A. (1993) *Cell* **74,** 1065-1077

Musil, L. S., Le, A. C., VanSlyke, J. K., und Roberts, L. M. (2000) *J. Biol. Chem.* **275,** 25207-25215

Nalefski, E. A., und Falke, J. J. (1996) *Protein Sci.* **5,** 2375-2390

Nathans, S. D., und Smith, H. O. (1975) *Ann. Rev. Biochem.* **44,** 273-293

Naus, C. C., Hearn, S., Zhu, D., Nicholson, B. J., und Shivers, R. R. (1993) *Exp. Cell Res.* **206,** 72-84

Oh, S. Y., Grupen, C. G., und Murray, A. W. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1094,** 243-245

Oh, S. Y., Schmidt, S. A., und Murray, A. W. (1993) *Cell Adhes. Commun.* **1,** 143-149

Osherov, N., und Levitzki, A. (1994) *Eur. J. Biochem.* **225,** 1047-1053

Page, E., und Shibata, Y. (1981) *Annu. Rev. Physiol.* **43,** 431-441

Palmer, A., Rivett, A. J., Thomson, S., Hendil, K. B., Butcher, G. W., Fuertes, G., und Knecht, E. (1996) *Biochem. J.* **316,** 401-407

Perkins, G. A., Goodenough, D. A., und Sosinsky, G. E. (1998) *J. Mol. Biol.* **277,** 171-177

Pires, J. R., Taha-Nejad, F., Toepert, F., Ast, T., Hoffmuller, U., Schneider-Mergener, J., Kuhne, R., Macias, M. J., und Oschkinat, H. (2001) *J. Mol. Biol.* **314,** 1147-1156

Plant, P. J., Yeger, H., Staub, O., Howard, P., und Rotin, D. (1997) *J. Biol. Chem.* **272,** 32329-32336

Plant, P. Y., Lafont, F., Lecat, S., Verkade, P., Simons, K., und Rotin, D. (2000) *J. Cell Biol.* **149,** 1473-1484

Qin, H., Shao, Q., Igdoura, S. A., Alaoui-Jamali, M. A., und Laird, D. W. (2003) *J. Biol. Chem.* **278,** 30005-30014

Reits, E. A., Benham, A. M., Plougastel, B., Neefjes, J., und Trowsdale, J. (1997) *EMBO J.* **16,** 6087-6094

Rennison, M. E., Handel, S. E., Wilde, C. J., und Burgoyne, R. D. (1992) *J. Cell Sci.* **102,** 239-247

Reynhout, J. K., Lampe, P. D., und Johnson, R. G. (1992) *Exp. Cell Res.* **198,** 337-342

Richard, G., Lin, J. P., Smith, L., Whyte, Y. M., Itin, P., Wollina, U., Epstein, E. Jr., Hohl, D., Giroux, J. M., Charnas, L., Bale, S. J., und DiGiovanna, J. J. (1997) *J. Invest. Dermatol.* **109,** 666-671

Rivett, A. J., Palmer, A., und Knecht, E. (1992) *J. Histochem. Cytochem.* **40,** 1165-1172

Rojas-Espinosa, O., Rodriguez-Paez, L., Gonzalez-Cruz, O., und Estrada-Parra, S. (1982) *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* **50,** 306-315

Rotin, D., Staub, O., und Haguenauer-Tsapis, R. (2000) *J. Membr. Biol.* **176,** 1-17

Rubin, D. M., und Finley, D. (1995) *Curr. Biol.* **5,** 854-858

Rutz, M. L., und Hulser, D. F., (2001) *Eur. J. Cell. Biol.* **80,** 20-30

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., und Erlich, H. A. (1988) *Science* **239,** 487-491

Sakurai, A., Yasuda, J., Takano, H., Tanaka, Y., Hatakeyama, M., und Shida, H. (2004) *Microbes Infect.* **6,** 150-156

Sambrook, J., Fritsch, E. F., und Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NewYork.

Scheffner, M., Nuber, U., und Huibregtse, J. M. (1995) *Nature* **373,** 81-83

Schlessinger, J. (2000) *Cell* **103,** 211-225

Schwake, M., Friedrich, T., und Jentsch, T. J. (2001) *J. Biol. Chem.* **276,** 12049-12054

Schwarzmann, G., Wiegandt, H., Rose, B., Zimmerman, A., Ben-Haim, D., und Loewenstein, W. R. (1981) *Science* **213,** 551-553

Segretain, D., und Falk, M. M. (2004) *Biochim. Biophys. Acta* **1662,** 3-21

Shah, M. M., Martinez, A.-M., und Fletcher, W. H. (2002) *Mol. Cell. Biochem.* **238,** 57-68

Shi, H., Asher, C., Chigaev, A., Yung, Y., Reuveny, E., Seger, R., und Garty, H. (2002) *J. Biol. Chem.* **277,** 13539-13547

Shiels, A., Mackay, D., Ionides, A., Berry, V., Moore, A., und Bhattacharya, S. (1998) *Am. J. Hum. Genet.* **62,** 526-532

Shimkets, R. A., Lifton, R., und Canessa, C. M. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95,** 3301-3305

Shinoura, N., Chen, L., Wani, M. A., Kim, Y. G., Larson, J. J., Warnick, R. E., Simon, M., Menon, A. G., Bi, W. L., und Stambrook, P. J. (1996) *J. Neurosurg.* **84,** 839-845

Singh, D., und Lampe, P. D. (2003) *Cell. Commun. Adhes.* **10,** 215-220

Solan, J. L., Fry, M. D., TenBroek, E. M.,und Lampe, P. D. (2003) *J. Cell Sci.* **116,** 2203-2211

Spray, D. C., und Bennett, M. V. L. (1985) *Annu. Rev. Physiol.* **47,** 281-303

Spray, D. C., und Burt, J. M. (1990) *Am. J. Physiol.* **258,** C195-C205

Springael, J. Y., und Andre, B. (1998) *Mol. Biol. Cell* **9,** 1253-1263

Staub, O., Dho, S., Henry, P. C., Correa, J., Ishikawa, T., McGlade, J., und Rotin, D. (1996) *EMBO J.* **15,** 2371-2380

Staub, O., Gautschi, I., Ishikawa, T., Breitschopf, K., Ciechanover, A., Schild, L. und Rotin, D. (1997) *EMBO J.* **16,** 6325-6336

Staub, O., Abriel, H., Plant, P., Ishikawa, T., Kanelis, V., Saleki, R., Horisberger, J., Schild, L., und Rotin, D. (2000) *Kidney Int.* **57,** 809-815

Storrie, B., Pepperkok, R., Stelzer, E. H., und Kreis, T. E. (1994) *J. Cell Sci.* **107,** 1309-1319

Suarez, S., und Ballmer-Hofer, K. (2001) *J. Cell Sci.* **114,** 1229-1235

Sudol, M. (1996) *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **65,** 113-132

Sun, W., Wei, X., Kesavan, K., Garrington, T. P., Fan, R., Mei, J., Gelf, S. M., Gelf, E. W., und Johnson, G. L. (2003) *Mol. Cell. Biol.* **23,** 2298-2308

TenBroek, E. M., Lampe, P. D., Solan, J. L., Reynhout, J. K., und Johnson, R. G. (2001) *J. Cell Biol.* **155,** 1307-1318

Theodoropoulos, P. A., Gravanis, A., Tsapara, A., Margioris, A. N., Papadogiorgaki, E., Galanopoulos, V., und Stournaras, C. (1994) *Biochem. Pharmacol.* **47,** 1875-1881

Thomas, M. A., Zosso, N., Scerri, I., Demaurex, N., Chanson, M., und Staub, O. (2003) *J. Cell Sci.* **116,** 2213-2222

Thyberg, J., und Moskalewski, S. (1992) *J. Cell Sci.* **103,** 1167-1175

Toyofuku, T, Yabuki, M., Otsu, K., Kuzuya, T., Hori, M. und Tada, M. (1998) *J. Biol. Chem.* **273,** 12725-12731

Toyofuku, T., Akamatsu, Y., Zhang, H., Kuzuya, T., Tada, M., und Hori, M. (2001) *J. Biol. Chem.* **276,** 1780-1788

Traub, O., Look, J., Dermietzel, R., Brummer, F., Hulser, D., und Willecke, K. (1989) *J. Cell Biol.* **108,** 1039-1052

Tsai, H., Werber, J., Davia, M. O., Edelman, M., Tanaka, K. E., Melman, A., Christ, G. J., und Geliebter, J. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **227,** 64-69

Tsao, M. S., Smith, J. D., Nelson, K. G., und Grisham, J. W. (1984) *Exp. Cell Res.* **154,** 38-52

Turin, L., und Warner, A. (1977) *Nature* **270,** 56-57

Ulrich, H. D. (2002) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **268,** 137-174

Unger, V. M., Kumar, N. M., Gilula, N. B., und Yeager, M. (1999) *Science* **283,** 1176-1180

Unwin, P. N., und Zampighi, G. (1980) *Nature* **283,** 545-549

Veenstra, R. D. (1996) *J. Bioenerg. Biomembr.* **28,** 327-337

Verdecia, M. A., Bowman, M. E., Lu, K. P., Hunter, T., und Noel, J. P. (2000) *Nat. Struct. Biol.* **7,** 639-643

Warn-Cramer, B. J., Lampe, P. D., Kurata, W. E., Kanemitsu, M. Y., Loo, L. W., Eckhart, W., und Lau, A. F. (1996) *J. Biol. Chem.* **271,** 3779-3786

Warn-Cramer, B. J., Cottrell, G. T., Burt, J. M., und Lau, A. F. (1998) *J. Biol. Chem.* **273,** 9188-9196

Warn-Cramer, B. J., und Lau, A. F. (2004) *Biochim. Biophys. Acta* **1662,** 81-95

Wigley, W. C., Fabunmi, R. P., Lee, M. G., Marino, C. R., Muallem, S., DeMartino, G. N., und Thomas, P. J. (1999) *J. Cell Biol.* **145,** 481-490

Wilkinson, C. R. M., Wallace, M., Morphew, M., Perry, P., Allshire, R., Javerzat, J.-P., McIntosh, J. R., und Gordon, C. (1998) *EMBO J.* **17,** 6465-6474

Willecke, K., Hennemann, H., Dahl, E., Jungbluth, S., und Heynkes, R. (1991) *Eur. J. Cell Biol.* **56,** 1-7

Willecke, K., Eiberger, J., Degen, J., Eckhardt, D., Romualdi, A., Guldenagel, M., Deutsch, U., und Sohl, G. (2002) *Biol. Chem.* **383,** 725-737

Wood, J. D., Yuan, J., Margolis, R. L., Colomer, V., Duan, K., Kushi, J., Kaminsky, Z., Kleiderlein, J. J., Sharp, A. H., und Ross, C. A. (1998) *Mol. Cell Neurosci.* **11,** 149-160

Xie, H.-Q., Laird, D. W., Chang, T.-H., und Hu V. W. (1997) *J. Cell Biol.* **137**, 203-210

Yamasaki, H. (1990) *Carcinogenesis* **11,** 1051-1058

Yamasaki, H., und Naus, C. C. (1996) *Carcinogenesis* **17,** 1199-1213

Yamasaki, H., Omori, Y., Zaidan-Dagli, M. L., Mironov, N., Mesnil, M., und Krutovskikh, V. (1999) *Cancer Detect. Prev.* **23,** 273-279

Yasuda, J., Nakao, M., Kawaoka, Y., und Shida, H. (2003) *J. Virol.* **18,** 9987-9992

Yeager, M., Unger, V. M., und Falk, M. M. (1998) *Curr. Opin.Struct. Biol.* **8,** 517-524

Yogo, K, Ogawa, T., Akiyama, M., Ishida, N., und Takeya, T. (2002) *FEBS Lett.* **531,** 132-136

Zarrinpar, A. und Lim, W. A. (2000) *Nature Struct. Biol.* **7,** 611-613

Zelante, L., Gasparini, P., Estivill, X., Melchionda, S., D'Agruma, L., Govea, N., Mila, M., Monica, M. D., Lutfi, J., Shohat, M., Mansfield, E., Delgrosso, K., Rappaport, E., Surrey, S., und Fortina, P. (1997) *Hum. Mol. Genet.* **6,** 1605-1609

Zeng, C. (2000) *Microsc. Res. Tech.* **49,** 467-477

Zhang, F., Crise, B., Su, B., Hou, Y., Rose, J. K., Bothwell, A., und Jakobson, K. (1991) *J. Cell Biol.* **115,** 75-84

Zhang, Y., Chang, C., Gehling, D. J., Hemmati-Brivanolu, A., und Derynck, R. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98,** 974-979

Zhu, H., Kavsak, P., Abdollah, S., Wrana, J. L., und Thomsen, G. H. (1999) *Nature* **400,** 687-693

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

2 Einleitung

Abb. 2.1: Dreidimensionales Modell von Gap Junction Kanälen **5**

Abb. 2.2: Variabilität der Connexine in der Länge ihres C-Terminus **7**

Abb. 2.3: Phosphorylierungsstellen in Cx43 **9**

Abb. 2.4: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte, die zum Auf- und Abbau von Cx43-haltigen Gap Junction Kanälen führen. **12**

Abb. 2.5: Schematische Darstellung des Ubiquitin-Proteasom-Systems **15**

Abb. 2.6: Aufbau der HECT-Ligase Nedd4 **17**

4 Methoden

Abb. 4.1: Prinzip der BIAcore-Technologie **48**

Abb. 4.2: Schematisches Sensorgramm mit Regenerationsphase **49**

Abb. 4.3: Schematische Darstellung der Oberfläche eines SA-Sensorchips **50**

5 Ergebnisse

Abb. 5.1: Antikörper SA226P detektiert bestimmte stark phosphorylierte Formen von Cx43 **56**

Abb. 5.2: Lokalisation von Cx43 in WB-F344 Zellen **58**

Abb. 5.3: Lokalisation von verschiedenen Cx43-Formen in EGF-behandelten WB-F344 Zellen **60**

Abb. 5.4: Modell des derzeit bekannten Signaltransduktionswegs zwischen EGF-Rezeptor und Cx43 **62**

Abb. 5.5: Inhibierung der EGF-vermittelten Cx43-Phosphorylierung durch AG1478 und PD98059 **63**

Abb. 5.6: Auswirkungen von AG1478 und PD98059 auf die Lokalisation von Cx43 in WB-F344 Zellen **64**

Abb. 5.7: Schematische Darstellung von Cx43 und den verwendeten GST-Fusionsproteinen **67**

Abb. 5.8: Interaktion von den Proteinen ZO-1, ZO-2 und Nedd4 mit dem C-Terminus von Cx43 **67**

Abb. 5.9: Nedd4 bindet *in vitro* an den C-Terminus von Cx43 **68**

Abb. 5.10: Cx43 bindet *in vitro* die Domänen WW2 und WW3 von Nedd4 **70**

Abb. 5.11: Nedd4-Domänen WW2 und WW3 binden an verschiedene phosphorylierte Formen von Cx43 **72**

Abb. 5.12: Cx43 enthält ein PY-Motiv im zytoplasmatischen C-Terminus **73**

Abb. 5.13: In den SPR-Messungen eingesetzte Peptide **74**

Abb. 5.14: Interaktion zwischen der Nedd4-Domäne WW2 und den C-terminalen Peptiden von Cx43 **75**

Abb. 5.15: Kinetik der Interaktion zwischen Nedd4-WW2 und dem phosphorylierten bzw. unphosphorylierten PY-Motiv von Cx43 **77**

Abb. 5.16: Abnahme der Bindefähigkeit von GST-WW2 an Cx43 $CT_{phosph.}$ durch die Inkubation von GST-WW2 mit einem kompetitierenden Peptid **78**

Abb. 5.17: Nachweis der Kolokalisation von endogenem Cx43 und Nedd4 in Hepa1c1c7 WT Zellen **80**

Abb. 5.18: Lokalisation von endogenem Cx43 und Ubiquitin in WB-F344 Zellen **82**

Abb. 5.19: Kolokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 und Nedd4 bzw. Ubiquitin in mitotischen Zellen **84**

Abb. 5.20: Kolokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 und γ-Tubulin in den Centrosomen von mitotischen WB-F344 Zellen **87**

Abb. 5.21: Verlust der von Antikörper 71-0700 detektierbaren Cx43-Formen an den Plasmamembranen von mitotischen WB-F344 Zellen **89**

Abb. 5.22: Kolokalisation von S279/S282-phosphoryliertem Cx43 und Pericentrin in den Centrosomen von mitotischen WB-F344 Zellen **90**

Abb. 5.23: Lokalisation von S279/S282-phophoryliertem Cx43, unphosphoryliertem Cx43 und Nedd4 in den Centrosomen **92**

Abb. 5.24: Lactacystin verhindert den Abbau von phosphoryliertem Cx43 **95**

6 Diskussion

Abb. 6.1: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte, die zum Abbau der Cx43-Gap Junction Kanälen während der Interphase bzw. der Mitose führen könnten **115**

8.2 Tabellarischer Lebenslauf

Angaben zur Person

Name:	Kerstin Leykauf
Adresse:	Schröderstr. 49 69120 Heidelberg
Geburtsdatum:	03. Juli 1974
Geburtsort:	Bad Tölz
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

Ausbildung

1981 – 1985	Karl-Lederer-Grundschule, Geretsried
1985 – 1994	Gymnasium Geretsried
01.07.1994	Allgemeine Hochschulreife mit der Gesamtnote „2,3“
1994 – 1995	Freiwilliges Soziales Jahr am Kreiskrankenhaus Starnberg
1995 – 1997	Biologiestudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München
17.11.1997	Ablegen der Diplom-Vorprüfungen mit der Gesamtnote „gut“
1997 – 2000	Biologiestudium an der Philipps-Universität Marburg
26.09.2000	Ablegen der mündlichen Diplomprüfungen in den Fachgebieten Mikrobiologie (Note „sehr gut-“), Genetik (Note „sehr gut-“) und Virologie (Note „sehr gut“)
1999 – 2000	Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Terrestrische Mikrobiologie in Marburg unter der Leitung von PD Dr. Matthias Ullrich Titel: Klonierung und molekularbiologische Analyse des *tra*-Operons aus *Pseudomonas syringae.*
23.08.2000	Studienabschluss als Diplom-Biologin mit der Gesamtnote „sehr gut“
15.01.2001	Beginn der Promotion am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg unter der Leitung von Prof. Dr. Angel Alonso Titel: Phosphorylierung und Gap Junctions Charakterisierung der Interaktion von Connexin 43 und der Ubiquitin-Protein-Ligase Nedd4

8.3 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Angel Alonso für die interessante Themenstellung, die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die hervorragende wissenschaftliche Betreuung sowie die stets anzutreffende Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Matthias Dürst an der Friedrich-Schiller-Universität Jena danke ich für die Vergabe des Themas und für meine Finanzierung.

Bei Frau Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl an der biologischen Fakultät der Philipps-Universität Marburg möchte ich mich für das Interesse an der Arbeit und die Übernahme des Erstgutachtens bedanken. Ohne sie wäre die Promotion an der Philipps-Universität Marburg nicht möglich gewesen.

Meinen Laborkollegen Walter Cartin, Hao Cheng, Jürgen Fischer, Dr. Nacho Gonzalez-Bravo, Myriam Grüner, Michaela Hipp, Dr. Kirsten Kabsch, Adriano LaVecchia, Dr. Xiaohong Mao, Nina Mossadegh-Mörsch, Monika Müller, Miriam Soehindrijo und Eduard Urich möchte ich für die sehr angenehme und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre danken.

Meinen Azubis Björn Brand, Pola Linzmayer und Daniel Strauß danke ich ganz herzlich für die tatkräftige Unterstützung und die wertvollen Erfahrungen, die ich während der engen Zusammenarbeit mit drei völlig unterschiedlichen Persönlichkeiten sammeln konnte.

Für die schnelle nanoESI-MS Analyse möchte ich Dr. Mojibrahman Salek danken.

Den Herren Norbert Avemarie, Dr. Jörg Bomke und Dr. Matthias Frech von der Firma Merck in Darmstadt danke ich für das Bereitstellen des BIAcore 3000 Gerätes und für ihre große Hilfe bei den SPR-Experimenten und deren Auswertungen.

Weiterhin danke ich Herrn PD Dr. Martin Müller und Herrn PD Dr. Johannes Schenkel, die in den letzten neun Monaten für meine Finanzierung aufkamen.

An Martina, Miki, Nicole und PD Dr. Pascal Tomakidi ein dickes Dankeschön für das gründliche und gleichermaßen kritische Korrekturlesen.

Holger möchte ich ganz herzlich für seine Geduld, die tägliche Unterstützung und Aufmunterung und vor Allem für sein „Dasein“ danken.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern und meiner Schwester von ganzem Herzen für ihre liebevolle Unterstützung und ihr Interesse in all den Jahren.

Erklärung

ich versichere, dass ich meine Dissertation

Phosphorylierung und Gap Junctions
Charakterisierung der Interaktion von Connexin 43
mit der Ubiquitin-Protein-Ligase Nedd4

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg/Lahn, den 04.10.2004 _____

(Kerstin Leykauf)