

4 Ergebnisse

4.1 Computergestützte Sequenzanalyse zur Vorhersage der Proteinstrukturen

4.1.1 Bestimmung von potentiellen Signalpeptidsequenzen

Proteine, die im Zytoplasma neu gebildet werden, können vom zellulären Sortierapparat an Hand ihrer Signalsequenz erkannt werden, um dann an den Ort ihrer Bestimmung transportiert zu werden. So tragen Proteine, die für den Transfer in das ER bestimmt sind, eine Signalsequenz an ihrem amino-terminalen Ende. Innerhalb dieser Sequenz gibt es eine charakteristische Abfolge von fünf bis zehn hydrophoben Aminosäuren. Nach Import in das ER wird die Signalsequenz in der Regel abgespalten. Mit Hilfe des Programms SignalP (Bendtsen et al. 2004) konnte je eine typische Signalsequenz für die Proteine mCLCA3 und eCLCA1 mit einer Spaltungsstelle zwischen den Aminosäuren 21 und 22 lokalisiert werden (Abb. 5).

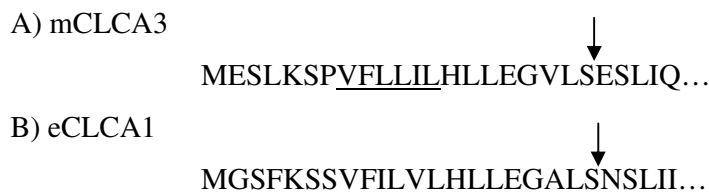


Abbildung 5: Signalsequenz des mCLCA3-Proteins (A) und des eCLCA1-Proteins (B) nach Vorhersage durch das Programm SignalP. Das mCLCA3-Protein (A) und das eCLCA1 Protein (B) besitzen am amino-terminalen Ende jeweils eine Signalsequenz zum Import ins ER, die nach der Vorhersage dann dort zwischen den Aminosäuren 21 und 22 abgespalten wird (↓). Die Abfolgen der hydrophoben Aminosäuren, die charakteristisch innerhalb der Sequenz sind, sind unterstrichen.

4.1.2 Bestimmung von potentiellen Transmembrandomänen

Transmembranproteine besitzen sogenannte Transmembrandomänen, mit deren Hilfe sie sich in dem hydrophoben Milieu der Plasmamembran verankern können. Um die Plasmamembran zu durchspannen, sind für den üblichen Fall einer α -helikalen Transmembrandomäne circa 20

Aminosäuren nötig, deren Mehrzahl hydrophobe Eigenschaften haben muss. Mit Hilfe von verschiedenen Computerprogrammen wurden die Aminosäuresequenzen des mCLCA3-Proteins und des eCLCA1-Proteins nach potentiellen Transmembrandomänen durchmustert. Das Programm Kyte-Doolittle (Kyte und Doolittle 1982) zeigte, dass keine Region des mCLCA3-Proteins und des eCLCA1-Proteins die von der Software vorgegebene Grenze für mögliche Transmembrandomänen von 1,8 kcal/mol überschreitet (Abb. 6). Nach dieser Vorhersage besitzen weder das mCLCA3-Protein noch das eCLCA1-Protein eine Transmembrandomäne. Als Vergleich und zur Verdeutlichung wurde bei dieser Analyse auch die Aminosäuresequenz des hCLCA2-Proteins durchmustert, welches sowohl anhand Vorhersagen als auch nach experimentellen Ergebnissen eine carboxy-terminale Transmembrandomäne von Aminosäure 906 bis 928 besitzt (Elble et al. 2006). Bei dieser Analyse überschreitet ebendiese carboxy-terminale Region die Grenze für eine mögliche Transmembrandomäne (Abb. 6). Das hCLCA2-Protein besitzt im Vergleich zu der Aminosäureanzahl der Proteine mCLCA3 und eCLCA1 30 Aminosäuren mehr. Innerhalb dieser zusätzlichen 30 Aminosäuren wurde ein Teil der Transmembrandomäne vorhergesagt.

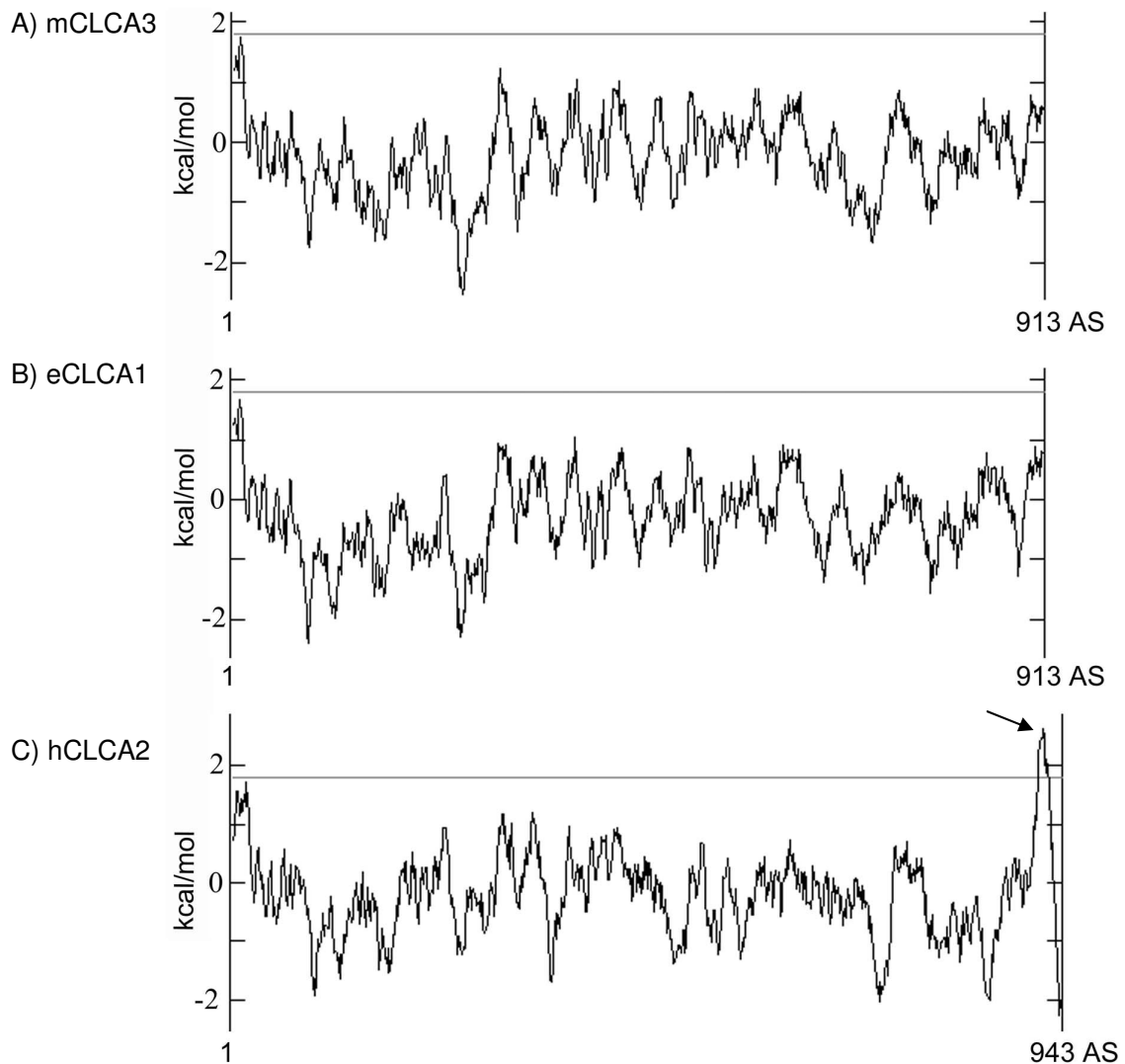


Abbildung 6: Grafische Darstellung der Kyte-Doolittle-Analysen des mCLCA3- (A) und eCLCA1- (B) Proteins im Vergleich zu hCLCA2 (C). Für sowohl mCLCA3 (A) als auch eCLCA1 (B) wurde keine Transmembrandomäne vorhergesagt, wie sie bei hCLCA2 (C) hier vorhergesagt wird (Pfeil) und bereits experimentell bestätigt wurde (Elble et al. 2006). AS : Aminosäuren; waagerechte Linie : die von der Software vorgegebene Grenze für mögliche Transmembrandomänen von 1,8 kcal/mol.

Auch die Analysen mit den Programmen SOSUI (Hirokawa et al. 1998), HMMTop (Tusnady und Simon 2001), DAS (Cserzo et al. 1997) und Psort II (Nakai und Horton 1999) deuteten an, dass mCLCA3 keine α -helikalen Transmembrandomänen besitzt. Die Aminosäurenregion mit der höchsten Hydrophobizität innerhalb des mCLCA3-Proteins stimmte überein mit der

vorhergesagten Signalsequenz (siehe Kapitel 4.1.1). Die TMPred-Analyse (Hofman und Stoffel 1993), welche auf einem Vergleich mit bekannten Transmembranproteinen beruht, favorisiert für das mCLCA3-Protein ein Modell mit zwei Transmembrandomänen, eine von Aminosäure 375 bis 396 und eine von Aminosäure 464 bis 484. Ebenfalls für eCLCA1 deuteten die Analysen mit den Programmen SOSUI (Hirokawa et al. 1998), DAS (Cserzo et al. 1997) und PSORT II (Nakai und Horton 1999) an, dass innerhalb der Aminosäuresequenz keine α -helikale Transmembrandomänen vorhanden ist. Auch hier waren die Regionen mit der stärksten Hydrophobizität innerhalb des eCLCA1-Proteins in der vorhergesagten, abspaltbaren Signalsequenz (siehe Kapitel 4.1.1) lokalisiert. Das Programm HMMTop (Tusnady und Simon 2001) sagte zwar eine Transmembranhelix in der Region zwischen Aminosäuren 6 und 25 voraus, jedoch wurde diese Region als abspaltbare Signalsequenz vorhergesagt, so dass sie nicht als Transmembrandomäne interpretiert wurde. Die TMPred-Analyse (Hofman und Stoffel 1993) favorisierte ein Drei-Transmembranmodell. Die erste angegebene Transmembrandomäne entsprach allerdings der abspaltbaren Signalsequenz (siehe Kapitel 4.1.1). Außerdem wurden zwei weitere Transmembrandomänen favorisiert, die zwischen den Aminosäuren 374 und 395 bzw. zwischen den Aminosäuren 506 und 531 lokalisiert waren.

4.1.3 Bestimmung von potentiellen Glykosylierungsstellen

Proteine erfahren auf ihrem Weg durch die Kompartimente der Zelle verschiedene posttranslationale Modifikationen, z.B. in Form von Glykosylierungen. An bestimmte Aminosäuren werden Zuckermoleküle geknüpft, die auf dem Weg durch die Zelle weiter verändert werden. Bei einem Glykosylierungsmechanismus – der Asparagin-verknüpften Glykosylierung – wird innerhalb des ER die Aminosäuresequenz Asparagin-X-Serin/Threonin erkannt. Bei diesem Motiv darf X jede beliebige Aminosäure außer Prolin sein. An die Aminosäure Asparagin werden zunächst ausschließlich Mannose reiche Zuckerreste kovalent gebunden. Mit Hilfe des Computerprogramms NetNGly wurden die Aminosäuresequenzen des mCLCA3-Proteins und des eCLCA1-Proteins nach potentiellen Asparagin-verknüpften Glykosylierungsstellen durchmustert. Das mCLCA3-Protein besitzt demnach sechs potentielle Stellen: bei Aminosäuren 504, 770, 804, 810, 836 und 887. Von diesen potentiellen Glykosylierungsstellen werden laut der Analyse drei (bei Aminosäuren 504, 770 und 836) voraussichtlich tatsächlich glykosyliert. Unter Berücksichtigung der posttranslationalen Spaltung des Proteins in eine größere, amino-terminale und kleinere,

carboxy-terminale Untereinheit bei Aminosäure 686 (Brouillard et al. 2005) liegt demnach eine Asparagin-verknüpfte Glykosylierungsstelle im amino-terminalen Spaltprodukt und fünf in der kleineren, carboxy-terminalen Untereinheit (Abb. 7).

Das eCLCA1-Protein besitzt nach der NetNGly-Analyse sieben Asparagin-verknüpfte Glykosylierungsstellen bei Aminosäuren 503, 514, 770, 804, 810, 836 und 885 (Abb. 7). Von diesen werden vier potentiell glykosyliert (Aminosäuren 503, 514, 770 und 885). Für eCLCA1 gibt es noch keine genaue Bestimmung der Spaltungsstelle. Unter Annahme einer ähnlichen Spaltungsgstelle wie für mCLCA3 (Brouillard et al. 2005) liegen zwei der Glykosylierungsstellen im amino-terminalen Spaltprodukt und die übrigen fünf im carboxy-terminalen Spaltprodukt.

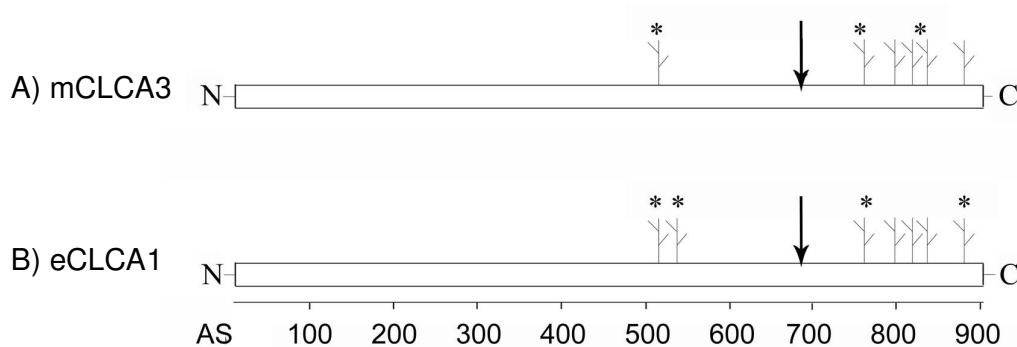


Abbildung 7: Schematische Darstellung der mCLCA3- (A) und eCLCA1-(B) Aminosäuresequenzen mit potentiellen Asparagin-verknüpften Glykosylierungsstellen (Baumartige Strukturen). Die Sternchen markieren die Glykosylierungsstellen, die potentiell glykosyliert werden. Der Pfeil markiert die bekannte Spaltungsstelle (A) von mCLCA3 (Brouillard et al. 2005) bzw. gemutmaßte (B) Spaltungsstelle von eCLCA1. AS : Aminosäure

4.2 Proteinbiochemische Analysen der Proteinprozessierung in lebenden Zellen

Da das mCLCA3-Protein sowohl in Schleimvesikeln von Becherzellen als auch extrazellulär im Darmlumen in der Schleimschicht nachgewiesen wurde (Leverkoehne und Gruber 2002), wurde die Proteinprozessierung von mCLCA3 sowohl in der Zelle als auch extrazellulär untersucht. Eine für alle CLCA-Proteine bekannte Eigenschaft ist die posttranslationale Spaltung des Vorläuferproteins in eine größere, amino-terminale- und eine kleinere, carboxy-terminale Untereinheit (Gruber et al. 2000). Daher wurde das Verhalten beider Spaltprodukte

hier analysiert. In Vorversuchen wurden verschiedene mCLCA3-spezifische Antikörper für die Immunpräzipitation getestet. Diese Antikörper detektierten die gleichen spezifischen Banden. Es wurde der Antikörper α -p3b (Leverkoehne und Gruber 2002) gewählt, da dieser kaum unspezifische Banden zeigte und für diese Studie in ausreichenden Mengen vorhanden war.

4.2.1 mCLCA3-Protein: amino-terminale Detektion

Der zelluläre Überstand (Medium) wurde getrennt vom Zelllysat mCLCA3 transfizierter COS-1 Zellen untersucht. Aus dem Medium und dem Zelllysat wurde das mCLCA3-Protein mittels Immunpräzipitation mit dem spezifischen Antikörper α -p3b (Leverkoehne und Gruber 2002), der ein Epitop im amino-terminalen Abschnitt vor der Spaltungsstelle (Abb. 8) detektiert, gewonnen. Die Immunpräzipitation mit dem Antikörper α -p3b erlaubt die Detektion des mCLCA3-Vorläuferproteins und des amino-terminalen Spaltproduktes (Leverkoehne und Gruber 2002).

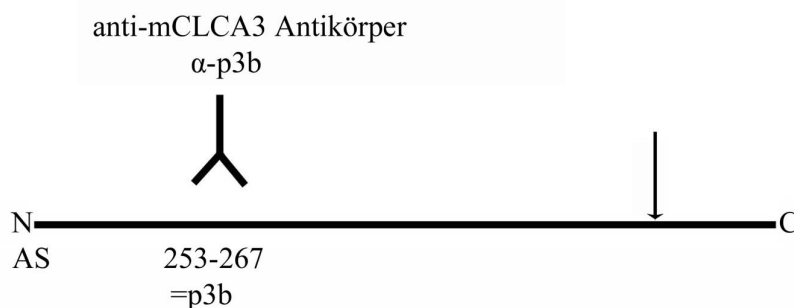


Abbildung 8: Schematische Darstellung des mCLCA3-Proteins mit dem Epitop (p3b) des spezifischen Antikörpers α -p3b. Die Spaltungsstelle ist mit einem Pfeil markiert.

Das Zelllysat und der Überstand wurden zu verschiedenen Zeitpunkten im Rahmen eines *pulse chase*-Experiments analysiert. Als Negativkontrolle dienten Vektor-allein transfizierte Zellen. COS-1 Zellen wurden mit dem in den Vektor pcDNA3.1 klonierten ORF von mCLCA3 (siehe Kapitel 3.2) transfiziert und für 20 min mit ^{35}S -Methionin biosynthetisch markiert. Nach 0 h, 0,5 h, 1 h, 4 h, 6 h und 12 h wurde das Protein mCLCA3 aus dem Zelllysat und aus dem Medium mittels Immunpräzipitation gewonnen. Die Elektrophorese

erfolgte auf einem 10%-igen SDS-PAGE-Gel, das anschließend autoradiographisch analysiert wurde. Nach 20-minütiger biosynthetischer Markierung mit ^{35}S -Methionin waren zum Zeitpunkt 0 h *chase* drei spezifische, ^{35}S -Methionin-markierte Proteinbanden im Zelllysate nachweisbar, und zwar bei 72, 100 und 110 kDa (Abb. 9), während im Medium keine Banden nachweisbar waren. Nach 0,5 h *Chase* wurde eine weitere Bande bei 75 kDa im Zelllysate nachgewiesen, nach 1 h *chase* trat eine 77 kDa Proteinbande im Medium auf (Abb. 9, Sternchen). Im Laufe der Zeit nahm die Bandenintensität im Zelllysate ab, während die Intensität der 77 kDa Bande im Medium zunahm. Gelegentlich treten zwei schwache Banden bei 100 und 110 kDa im Medium auf. In der Negativkontrolle waren keine Banden in dem analysierten Bereich nachweisbar.

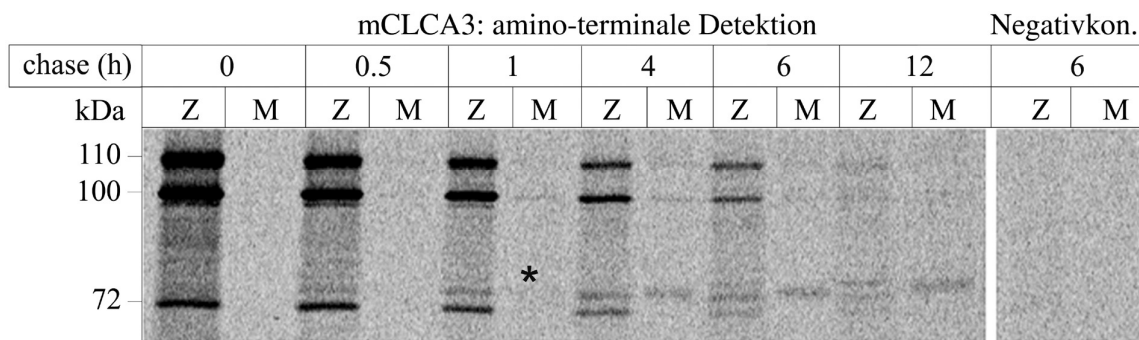


Abbildung 9: *pulse chase*-Versuch in COS-1 Zellen zur Detektion des amino-terminalen Endes von mCLCA3 mittels Autoradiographie: Vergleich Zelllysate (Z) und Medium (M). Vektor-allein transfizierte Zellen dienten als Negativkontrolle (Negativkon.). Die Proteinmassen sind in kDa angegeben.

4.2.2 Westernblotanalyse der radioaktiv markierten Banden des mCLCA3-Proteins

Um zu bestätigen, dass es sich bei den radioaktiv markierten Proteinen um das mCLCA3-Protein handelte, wurden Westernblotanalysen mit dem spezifischen Antikörper α -p3b (Leverkoehne und Gruber 2002) nach Immunpräzipitation mit dem gleichen Antikörper durchgeführt. COS-1 Zellen wurden mit dem in den Vektor pcDNA3.1 klonierten ORF von mCLCA3 (siehe Kapitel 3.2) transfiziert. Als Negativkontrolle wurde die Analyse mit Vektor-allein transfizierten Zellen durchgeführt. Das Protein wurde mittels Immunpräzipitation mit dem Antikörper α -p3b (Leverkoehne und Gruber 2002) aus dem Zelllysate und dem Medium gewonnen und anschließend mit dem gleichen Antikörper im Westernblot

analysiert. Die Westernblotanalyse detektierte im Zelllysat Banden bei 72, 75, 100 und 110 kDa. Im Medium wurde dagegen nur eine etwa 77 kDa Bande nachgewiesen (Abb. 10). Somit wurden die in der Immunpräzipitation nachgewiesenen radioaktivmarkierten Proteinbanden in der Westernblotanalyse als mCLCA3-spezifische Banden bestätigt.

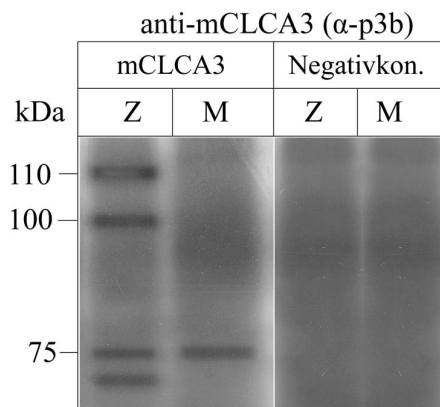


Abbildung 10: Westernblotanalyse des aus dem Zelllysat (Z) und Medium (M) immunpräzipitierten mCLCA3-Proteins. Für die Immunpräzipitation mit nachfolgender Westernblotanalyse wurde der Antikörper α -p3b eingesetzt. Proteingrößen sind in kDa angegeben.

4.2.3 mCLCA3-YFP-Fusionsprotein: carboxy-terminale Detektion

Um auch das kleinere, carboxy-terminale Spaltprodukt zu analysieren, wurde mittels Klonierungstechnik (siehe Kapitel 3.3) ein mCLCA3-YFP-Fusionsprotein konstruiert: das Reporterprotein YFP wurde dazu mit dem mCLCA3-Protein am carboxy-terminalen Ende verbunden. Eine Detektion war so durch Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen das YFP-Protein möglich (Abb. 11).

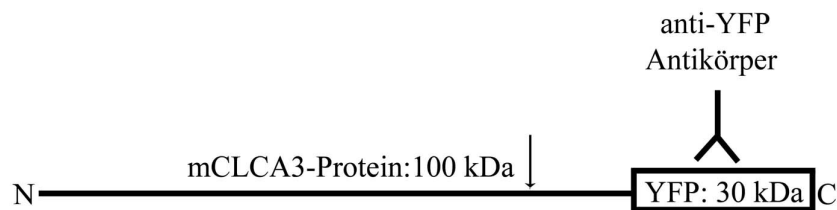


Abbildung 11: Schematische Darstellung des mCLCA3-YFP-Fusionsproteins mit dem Epitop des spezifischen Antikörpers gegen YFP. Die Spaltungsstelle des Proteins ist mit einem Pfeil markiert.

COS-1 Zellen wurden mit dem mCLCA3-YFP Vektor transfiziert und für 20 min mit ^{35}S -Methionin biosynthetisch markiert. Nach 0 h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h und 23 h wurde das Protein mCLCA3-YFP aus dem Zelllysate und aus dem Medium mittels Immunpräzipitation gewonnen. Die Elektrophorese erfolgte auf einem 10%igen SDS-PAGE-Gel, das anschließend autoradiographisch analysiert wurde. Als Negativkontrolle dienten Vektor-allein transfizierte Zellen. Zum Zeitpunkt 0 h *chase* waren drei spezifische Banden im Zelllysate nachweisbar: bei etwa 105 kDa, 130 kDa und 140 kDa. Nach 0,5 h *chase* kamen zwei weitere Banden im Zelllysate hinzu: bei 65 und bei 75 kDa. Nach 1 h traten zwei spezifischen Banden bei 68 und bei 77 kDa im Medium auf. Im Laufe des *chase* nahm die Intensität der spezifischen Banden im Zelllysate ab, während die Intensität der Proteinbanden im Medium zunahm, so dass nach 12 h *chase* nur noch Protein im Medium nachweisbar war (Abb. 12).

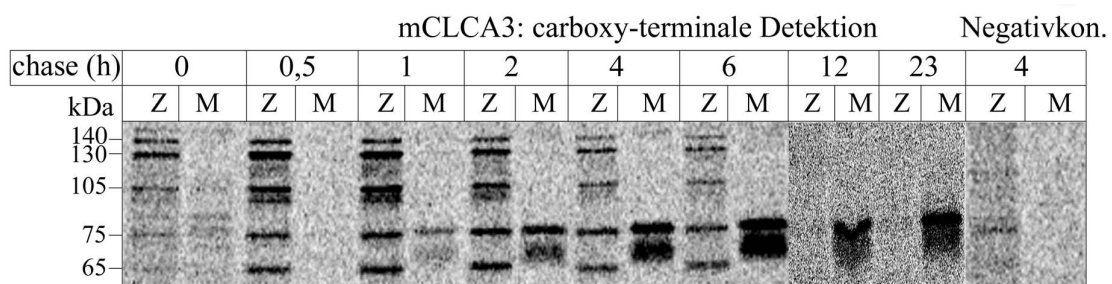


Abbildung 12: *pulse chase*-Versuch in COS-1 Zellen zur Detektion des carboxy-terminalen Endes von mCLCA3 mittels Autoradiographie: Vergleich Zelllysate (Z) und Medium (M). Vektor-allein transfizierte Zellen dienten als Negativkontrolle (Negativkon.). Proteingrößen sind in kDa angegeben.

4.2.4 Westernblotanalyse der radioaktiv markierten Banden des mCLCA3-YFP-Fusionsproteins

Von dem ersten CLCA-Vertreter beim Menschen (hCLCA1) ist bekannt, dass die beiden Spaltprodukte des Vorläuferproteins nach der Spaltung miteinander assoziiert bleiben und koimmunpräzipitiert werden (Gruber et al. 1998a). Um die ^{35}S -Methionin-markierten Proteinbanden, die im *pulse chase*-Versuch nachgewiesen wurden (Abb. 12), immunologisch zu identifizieren, wurde eine Westernblotanalyse durchgeführt. Die beiden anti-mCLCA3 Antikörper α -p3a und α -p3b (Leverkoehne und Gruber 2002) erkennen Epitope, die im amino-terminalen Abschnitt des Proteins gelegen sind, also vor der Spaltungsstelle bei Aminosäure 686 (Brouillard et al. 2005; Abb. 13). Der anti-YFP Antikörper erkennt das YFP-Protein, welches an das carboxy-terminale Ende des Proteins angehängt wurde (Abb. 13).

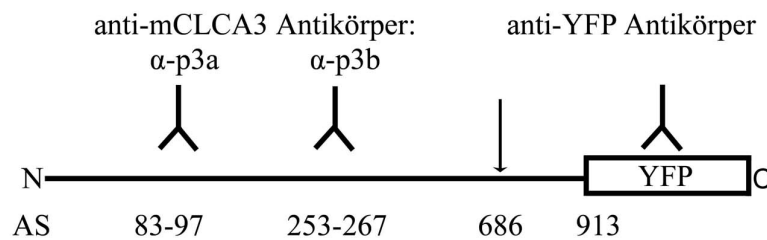


Abbildung 13: Schematische Darstellung des mCLCA3-YFP-Fusionsproteins mit den Epitopen der anti-mCLCA3 Antikörper und des anti-YFP Antikörpers. Der Pfeil markiert die Spaltungsstelle des Proteins.

COS-1 und HEK293 Zellen wurden mit dem Plasmid mCLCA3-YFP transient transfiziert, das Protein wurde mittels Immunpräzipitation mit dem anti-YFP Antikörper gewonnen und anschließend mit dem anti-YFP Antikörper und dem anti-mCLCA3 Antikörper (α -p3b) im Westernblot analysiert. Das Experiment wurde in zwei verschiedenen Zelllinien durchgeführt, um potentielle, zelllinien-spezifische Effekte der Prozessierung zu identifizieren. Beide Antikörper, anti-mCLCA3 (α -p3b) und anti-YFP, detektierten die 140 und 130 kDa Proteinbanden im Zelllysate (Abb. 14). Diese Banden wurden somit als das Vorläuferprotein vor der posttranslationalen Spaltung identifiziert. Der Antikörper α -p3b erkannte die Banden bei 75 kDa im Zelllysate und bei 77 kDa im Medium als amino-terminalen Spaltprodukte des mCLCA3-YFP-Vorläuferproteins. Zur Ermittlung, ob die Größe des amino-terminalen

Spaltprodukts mit der Größe des nativen mCLCA3-Proteins übereinstimmt, wurde natives Mauskolonlysate (Leverkoehne und Gruber 2002) als Größenkontrolle elektrophoretisch mit aufgetrennt. Die Größe des Proteins im Überstand stimmte mit dem Molekulargewicht des nativen mCLCA3-Proteins aus Mauskolonlysate überein. Der Antikörper anti-YFP erkannte die 65 kDa Proteinbande im Zelllysate und die 68 kDa Bande im Medium als zwei Formen des carboxy-terminalen Spaltprodukts des prozessierten mCLCA3-YFP-Vorläuferproteins. Zusammengefasst zeigten die Daten, die in COS-1 als auch in HEK293 Zellen erhoben wurden, ein identisches Bild. Somit wurde in beiden Zellsystemen das mCLCA3-YFP-Fusionsprotein gleich prozessiert (Abb.14 A, B).

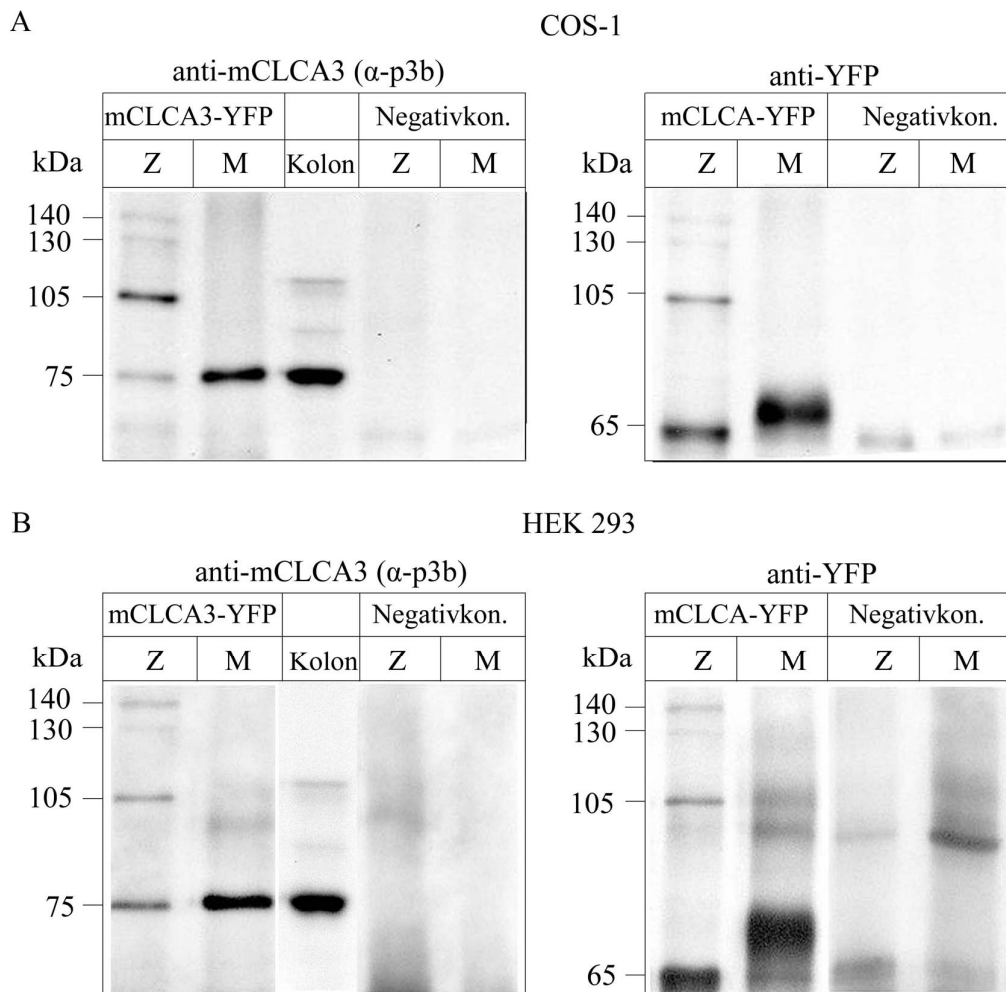


Abbildung 14: Westernblotanalyse des aus dem Zelllysate (Z) und Medium (M) immunpräzipitierten mCLCA3-YFP-Fusionsproteins: Identifikation des Vorläuferproteins, des amino-terminalen und des carboxy-terminalen Spaltproduktes. Für die Immunpräzipitation wurde der anti-YFP Antikörper und für die Westernblotanalyse der anti-mCLCA3 Antikörper (α -p3b) und der anti-YFP Antikörper eingesetzt. Proteingrößen sind in kDa angegeben.

Beide Antikörper detektierten die 105 kDa Bande im Zelllysate. Zur Untersuchung der Existenz einer zweiten Spaltungsstelle zwischen den α -p3a und α -p3b Epitopen wurden Westernblotanalysen mit den beiden anti-mCLCA3 Antikörpern α -p3a und α -p3b durchgeführt. Das mCLCA3-YFP-Fusionsprotein wurde aus dem Zelllysate (Z) und dem Medium (M) mit dem anti-YFP Antikörper immunpräzipitiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und in einem Westernblot mit den Antikörpern anti-mCLCA3 (α -p3b) und anti-mCLCA3 (α -p3a)

analysiert. Der Antikörper α -p3a identifizierte, wie zuvor bereits der Antikörper α -p3b, die 140 und 130 kDa Vorläuferproteinbanden sowie das amino-terminale Spaltprodukt im Zelllysats bei 75 kDa und im Medium bei 77 kDa. Jedoch wurde die Proteinbande bei 105 kDa nicht vom α -p3a Antikörper erkannt. Anscheinend gibt es in den hier untersuchten Zellsystemen demnach eine zweite Spaltungsstelle zwischen Aminosäure 97 und 253 (Abb. 15).

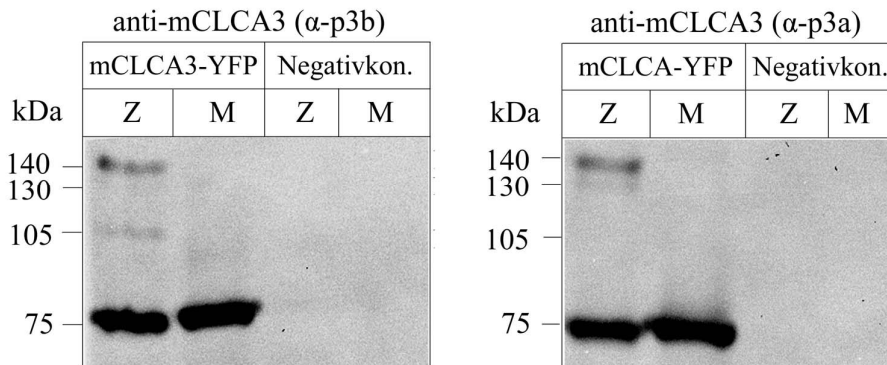


Abbildung 15: Westernblotanalyse des aus dem Zelllysats (Z) und Medium (M) immunpräzipitierten mCLCA3-YFP-Fusionsproteins: Identifikation der 105 kDa Bande ausschließlich durch den Antikörper α -p3b. Für die Immunpräzipitation wurde der anti-YFP Antikörper eingesetzt. Proteingrößen sind in kDa angegeben.

4.3 Intrazelluläre Lokalisierung des mCLCA3-Proteins mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie

4.3.1 Lokalisierung von mCLCA3 in der Zelle

Das intrazelluläre Verteilungsmuster des mCLCA3-Proteins wurde mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Dazu wurde mit Hilfe des Antikörpers α -p3b, der ein Epitop im amino-terminalen Teil der Aminosäuresequenz erkennt, das Protein innerhalb der Zelle nachgewiesen. Die Analyse zeigte ein intrazelluläres, vesikuläres Verteilungsmuster des mCLCA3-Proteins. An der Plasmamembran selbst wurde das mCLCA3-Protein stattdessen nicht gefunden (Abb. 16, A1). In Vektor-allein transfizierten Zellen wurde kein spezifisches Fluoreszenzsignal nachgewiesen (Abb. 16, A2).

Auch das intrazelluläre Verteilungsmuster des carboxy-terminalen Spaltproduktes wurde bestimmt. Dazu wurde das mCLCA3-YFP-Fusionsprotein hergestellt, das am carboxy-terminalen Ende mit dem autofluoreszierenden Protein YFP markiert wurde (siehe Kapitel 3.3). Mit Hilfe dieser Markierung konnte das Protein über die Fluoreszenzmikroskopie direkt analysiert werden. In Vorversuchen wurden drei der insgesamt 39 hergestellten mCLCA3-YFP-Klone unter dem Mikroskop untersucht, die alle ein ähnliches Bild zeigten. Ähnlich wie das amino-terminale Spaltprodukt zeigte das carboxy-terminale Spaltprodukt eine intrazelluläre, vesikuläre Lokalisation. Auch hier konnte das Protein nicht an der Plasmamembran detektiert werden (Abb. 16, B).

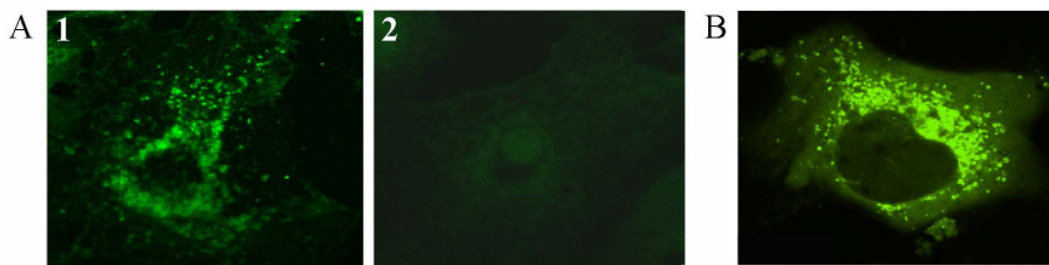


Abbildung 16: Intrazelluläre Lokalisierung des mCLCA3-Proteins mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie. Sowohl das mittels Immunfluoreszenz detektierte amino-terminale Ende (A, 1) als auch das mittels Autofluoreszenz detektierte carboxy-terminale Ende (B) zeigten ein intrazelluläres, vesikuläres Verteilungsmuster. A, 2: Vektor-allein transfizierte Zelle als Negativkontrolle.

4.3.2 Ko-Lokalisierungsstudie von mCLCA3 mit Kompartimentmarkern

Um zu untersuchen, welchen Weg das mCLCA3-Protein innerhalb der Zelle einschlägt, wurden COS-1 Zellen mit dem mCLCA3-YFP-Konstrukt und dem pDsRed-ER Vektor als ER-Marker, dem Galaktosyltransferase (GT)-dsRed Vektor als Golgi-Marker oder dem pDsRed-Saccharase-Isomaltase (SI) als Marker für die Plasmamembran ko-transfiziert. Mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie wurde eine Ko-Lokalisation mit beiden Proteinen beobachtet. Das mCLCA3-YFP-Fusionsprotein zeigte ein überlappendes Lokalisationsmuster sowohl mit dem ER-Marker als auch dem Golgi-Marker (Abb. 17). Somit erreichte das mCLCA3-YFP-Protein mit Hilfe der vorhergesagten Signalpeptidsequenz (siehe Kapitel 4.1.1) tatsächlich das ER (Abb. 17, A), um dann in den Golgi-Apparat (Abb.

17, B) weitertransportiert zu werden. Diese Ko-Lokalisation zeigte, dass das mCLCA3-Protein seinen Weg über das ER in den Golgi-Apparat nahm. Dieser intrazelluläre Weg stimmt mit dem Weg überein, den sezernierte Proteine in der Zelle typischerweise gehen. Jedoch zeigte das mCLCA3-YFP-Protein keine Ko-Lokalisation mit der Saccharase-Isomaltase, ein Transmembranprotein an der Plasmamembran (Abb. 17, C). Somit war das mCLCA3-Protein nicht an der Plasmamembran lokalisiert.

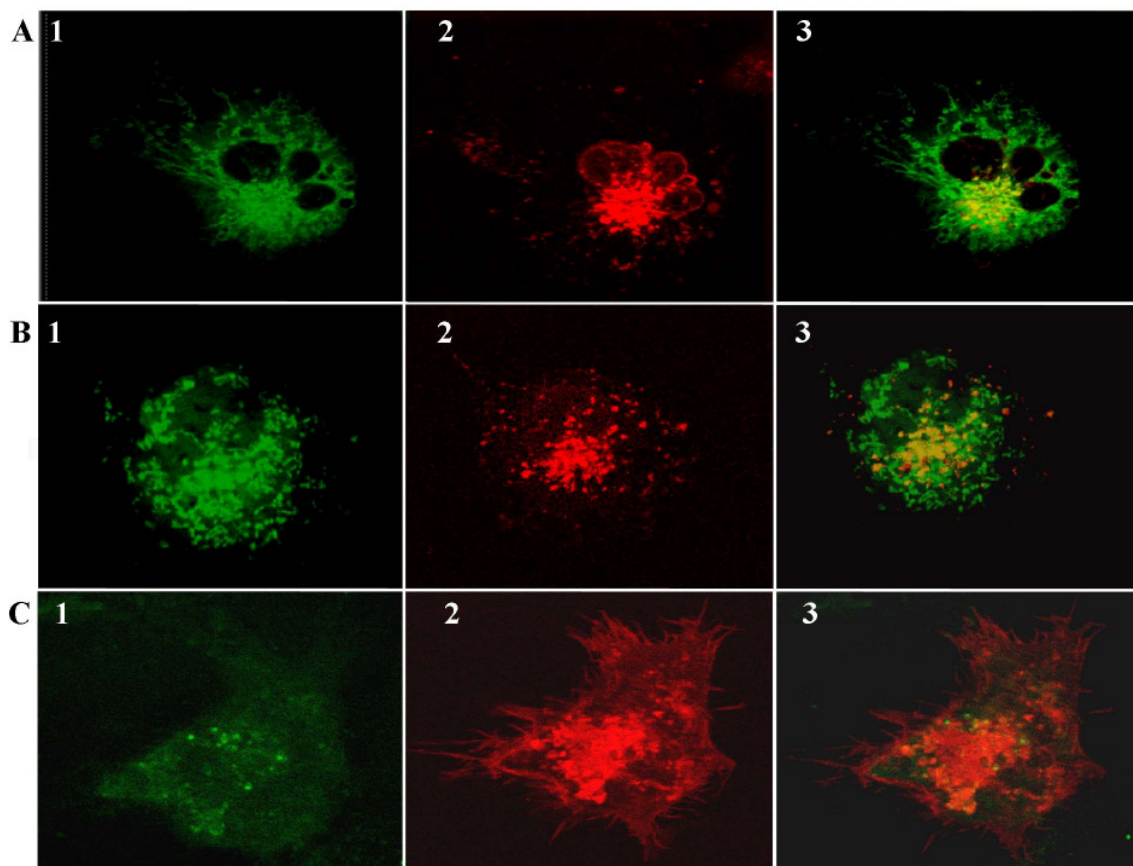


Abbildung 17: Ko-Lokalisierungsstudie des mCLCA3-YFP-Proteins mit zellulären Kompartimentsmarkern. COS-1 Zellen wurden ko-transfiziert mit dem mCLCA3-YFP-Fusionsprotein (markiert in A, B, C, 1), mit dem ER-Marker pDsRed2-ER (markiert in A, 2), mit dem Golgi-Marker GT-dsred (markiert in B, 2) und mit dem Plasmamembranmarker pDsRed-SI (markiert in C, 2). Das mCLCA3-Protein erreichte sowohl das ER (Ko-Lokalisation in A, 3) als auch den Golgi-Apparat (Ko-Lokalisation in B, 3). Jedoch zeigte sich keine Ko-Lokalisation an der Plasmamembran (C, 3).

4.4 Bestimmung des Glykosylierungsmusters

4.4.1 Glykosylierungsmuster der mCLCA3- und eCLCA1-Proteine

Die verschiedenen mCLCA3-Proteinbanden, die im *pulse chase*-Versuch identifiziert wurden (Abb. 9), unterscheiden sich in ihren Molekulargewichten (110, 100, 77, 75 und 72 kDa). Deshalb wurde das Glykosylierungsmuster des mCLCA3-Proteins untersucht, um zu testen, ob es sich hierbei um unterschiedliche Glykosylierungsformen desselben Proteins handelt. Außerdem gibt der Glykosylierungszustand Rückschlüsse darauf, in welchem Kompartiment der Zelle das Protein modifiziert wurde. Im ER wird die Aminosäuresequenz Asn-X-Ser/Thr erkannt und die Proteine werden an der Aminosäure Asparagin Mannose reich glykosyliert (N-Glykosylierung). Dieser Glykosylierungszustand wird im Golgi-Apparat in eine komplexe Glykosylierung umgewandelt (Alberts et al. 2004). Mit Hilfe der Enzyme Endo H und PNGase F kann das N-Glykosylierungsmuster eines Glykoproteins näher bestimmt werden. Endo H spaltet Asparagin-glykosylierte Mannose reiche Formen, während PNGase F sowohl Mannose reiche als auch komplex Asparagin-glykosylierte Zuckerketten eines Glykoproteins abspaltet (Abb. 18).

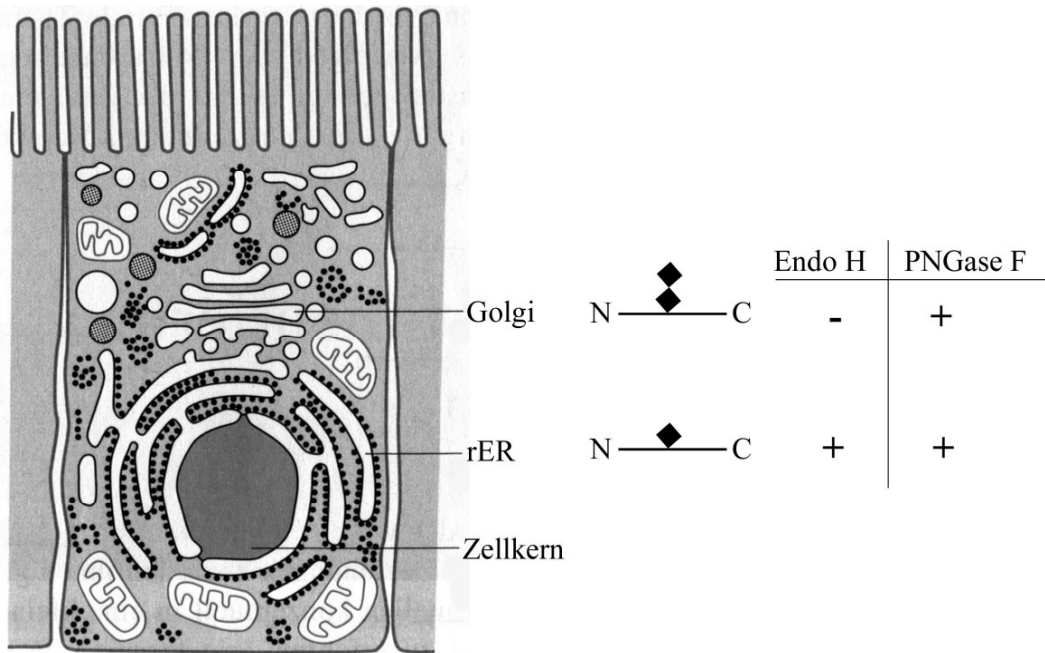


Abbildung 18: Schematische Darstellung einer polarisierten Epithelzelle mit Prozessierung der Asparagin-verknüpften Oligosaccharide im ER und Golgi-Apparat (Abb. modifiziert nach Alberts et al. 2004b). Im ER wird das reifende Protein Mannose reich glykosyliert (◆). Diese Modifikation wird im Golgi-Apparat in eine komplexe Glykosylierung (◆◆) umgewandelt und danach wird das Protein an seinen Zielort transportiert. Die Enzyme Endo H und PNGase F spalten die Zuckerformen unterschiedlich (- keine Spaltung; + Spaltung). rER : raues endoplasmatisches Retikulum

Nach Immunpräzipitation des mCLCA3-Proteins mit dem Antikörper α -p3b wurde das Immunpräzipitat mit Endo H und PNGase F behandelt (Abb. 19). Immunpräzipitate aus dem Zelllysate (Z) und dem Medium (M) von mCLCA3-transfizierten und biosynthetisch ^{35}S -Methionin-markierten COS-1 Zellen wurden in drei Aliquots geteilt und mit Endo H (H), PNGase F (F) oder nicht (-) behandelt. Danach wurde der Ansatz elektrophoretisch aufgetrennt und autoradiographisch analysiert. Die 110 kDa Bande im Zelllysate war sensitiv gegenüber beiden Enzymen und verschwand. Nur die 100 kDa Proteinbande blieb erhalten. Demnach handelt es sich bei dem 110 kDa Protein offenbar um eine Mannose reiche Form aus dem ER. Die 100 kDa Proteinbande stellte dagegen ein unglykosyliertes Vorläuferprotein dar. Auch die 75 kDa Bande im Zelllysate verschwand sowohl nach dem Endo H- als auch dem PNGase F-Verdau, während eine 73 kDa Proteinbande erhalten blieb. Auch das aminoterminal Spaltprodukt im Zelllysate ist demnach eine Mannose reich glykosylierte Form aus

dem ER. Die 72 kDa Bande war jedoch resistent gegenüber beiden Enzymbehandlungen und stellte somit offenbar eine unglykosylierte Spaltungsform dar. Das 77 kDa große amino-terminale Spaltprodukt im Medium (M) war nur sensitiv gegenüber PNGase F und nicht gegenüber Endo H, somit stellte es eine komplex glykosylierte Proteinform dar, welche den Golgi-Apparat durchlaufen hat (Abb.19, Sternchen).

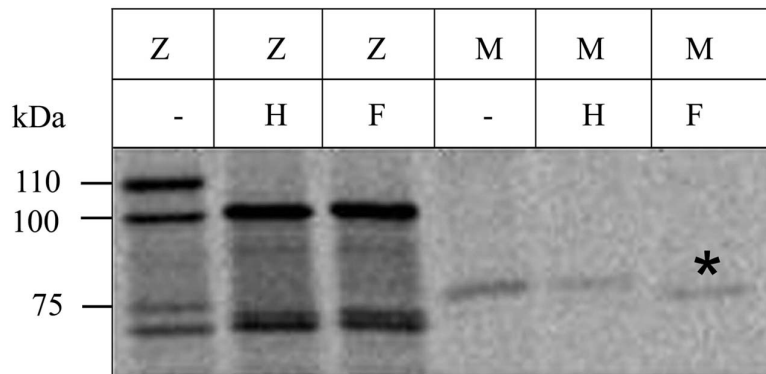


Abbildung 19: Glykosylierungsmuster des mCLCA3-Proteins. Die im Zellysat (Z) nachgewiesenen Banden wurden als Mannose reich glykosylierte Formen identifiziert. Das Protein im Medium (M) war hingegen komplex glykosyliert. Proteingrößen sind in kDa angegeben. H: Endo H, F: PNGase F; -: unbehandelt

Das eCLCA1-Protein gehört in ein phylogenetisches Cluster mit unter anderem mCLCA3 (Abb. 1). Es wurde an Hand des Glykosylierungsmusters des eCLCA1-Proteins beispielhaft analysiert, ob der orthologe Vertreter von mCLCA3 beim Pferd eine ähnliche Prozessierung erfährt. Das eCLCA1-Protein wurde mit den Enzymen Endo H (H) oder PNGase F (F) behandelt oder unbehandelt (-) belassen. Anschließend wurde das Protein mittels Westernblotanalyse mit dem eCLCA1 spezifischen Antikörper α -eCa1 (Anton et al. 2005) analysiert (Abb. 20). Das Vorläuferprotein des eCLCA1-Proteins zeigte eine Größe von 120 kDa im Zellysat (Z). Sowohl nach Endo H- als auch nach PNGase F-Verdau reduzierte sich die Größe des Proteins auf 100 kDa. Auch das amino-terminale Spaltprodukt, das eine Größe von 80 kDa zeigte, war sensitiv gegenüber beiden Enzymbehandlungen. Somit waren sowohl das Vorläuferprotein als auch das amino-terminale Spaltprodukt von eCLCA1 Mannose reich glykosyliert und stammten aus dem ER. Das amino-terminale Spaltprodukt im Medium (M) war nur sensitiv gegenüber der PNGase F-Behandlung und konnte damit als komplex

glykosylierte Form nach dem Golgi-Apparat identifiziert werden. Die Ergebnisse zeigen, dass eCLCA1 ein ähnliches Glykosylierungs- und Prozessierungsmuster aufweist wie sein orthologer Vertreter bei der Maus, mCLCA3.

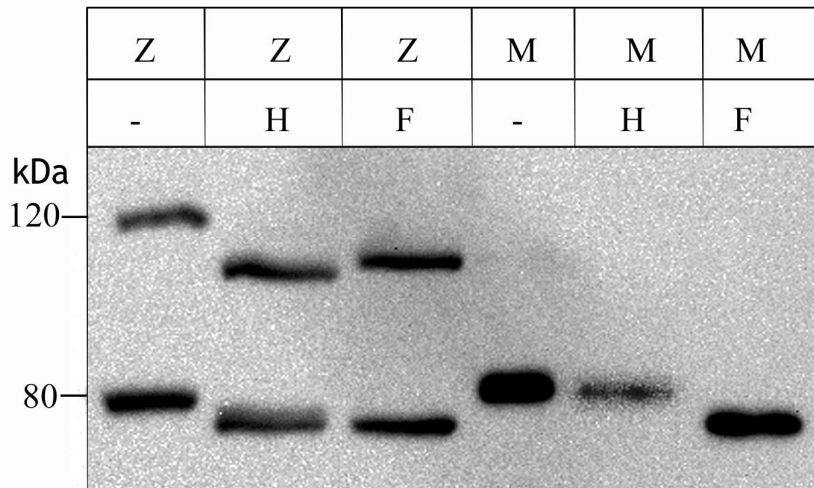


Abbildung 20: Glykosylierungsmuster des eCLCA1-Proteins. Die im Zelllysate (Z) nachgewiesenen Banden wurden als mannose reich glykosylierte Formen identifiziert. Das Protein im Medium (M) war hingegen komplex glykosyliert. Proteingrößen sind in kDa angegeben. H: Endo H, F: PNGase F; -: unbehandelt

4.4.2 Glykosylierungsmuster des mCLCA3-YFP-Fusionsproteins

Auch das Glykosylierungsmuster des mCLCA3-YFP-Fusionsproteins wurde durch Behandlung mit Endo H und PNGase F bestimmt. Das Fusionsprotein wurde mittels einer Immunpräzipitation mit dem anti-YFP Antikörper aus dem Zelllysate (Z) und dem Medium (M) gewonnen und wurde anschließend mit Endo H (H) oder PNGase F (F) behandelt oder nicht (-) behandelt (Abb. 21). Anschließend wurde eine Westernblotanalyse mit dem Antikörper α -p3b (Abb. 21, A) oder mit dem gegen das YFP-Protein gerichteten Antikörper anti-YFP (JL-8) durchgeführt. In Vorversuchen wurde deutlich, dass die Proteinbande des carboxy-terminalen Spaltproduktes nach erfolgter Deglykosylierung auf Höhe der schweren Kette des für die Immunpräzipitation genutzten Antikörpers zu liegen kommt und daher in der Westernblotanalyse nicht detektiert werden konnte. Um dieses Problem zu umgehen, wurden für diese Experimente jeweils anti-YFP Antikörper aus zwei verschiedenen Spezies benutzt:

Für die Immunpräzipitation der anti-YFP Antikörper aus einem Kaninchen und für die Westernblotanalyse der Maus anti-YFP Antikörper (JL-8).

Das 140 kDa Vorläuferprotein im Zelllysate zeigte eine Größenreduktion sowohl nach Endo H- als auch nach PNGase F-Behandlung auf die 130 kDa Bande im Zelllysate. Demnach stammte diese Mannose reiche Proteinform offenbar aus dem ER und hatte noch nicht den Golgi-Apparat passiert. Das 130 kDa große Vorläuferprotein dagegen war resistent gegenüber beiden Enzymbehandlungen und stellte folglich ein unglykosyliertes Vorläuferprotein dar. Auch die 105 kDa Proteinbande repräsentierte ein unglykosyliertes Spaltprodukt, da nach Endo H- und nach PNGase F-Behandlung keine Größenverschiebung beobachtet wurde. Das 75 kDa große, amino-terminale Spaltprodukt im Zelllysate wurde nach beiden Enzymbehandlungen auf etwa 73 kDa reduziert. Es stellte somit eine Mannose reiche Proteinform aus dem ER dar, welches noch nicht den Golgi-Apparat passiert hatte (Abb. 21, A). Die prozessierte amino-terminale Proteinbande bei 77 kDa im Medium war lediglich sensitiv gegenüber PNGase F und resistent gegenüber Endo H. Demzufolge hatte diese komplex glykosylierte Form den Golgi-Apparat passiert (Abb. 21, A). Das carboxy-terminale Spaltprodukt zeigte das folgende Prozessierungsmuster: Die 65 kDa Bande im Zelllysate war sensitiv gegenüber Endo H und gegenüber PNGase F. Daher handelte es sich hierbei um eine Mannose reiche Form aus dem ER, welches noch nicht den Golgi-Apparat passiert hatte. Die prozessierte 68 kDa Bande im Medium war dagegen resistent gegenüber Endo H, aber sensitiv gegenüber PNGase F. Auch das sezernierte carboxy-terminale Spaltprodukt war demnach eine komplex glykosylierte Proteinform, die den Golgi-Apparat passiert hatte (Abb. 21, B).

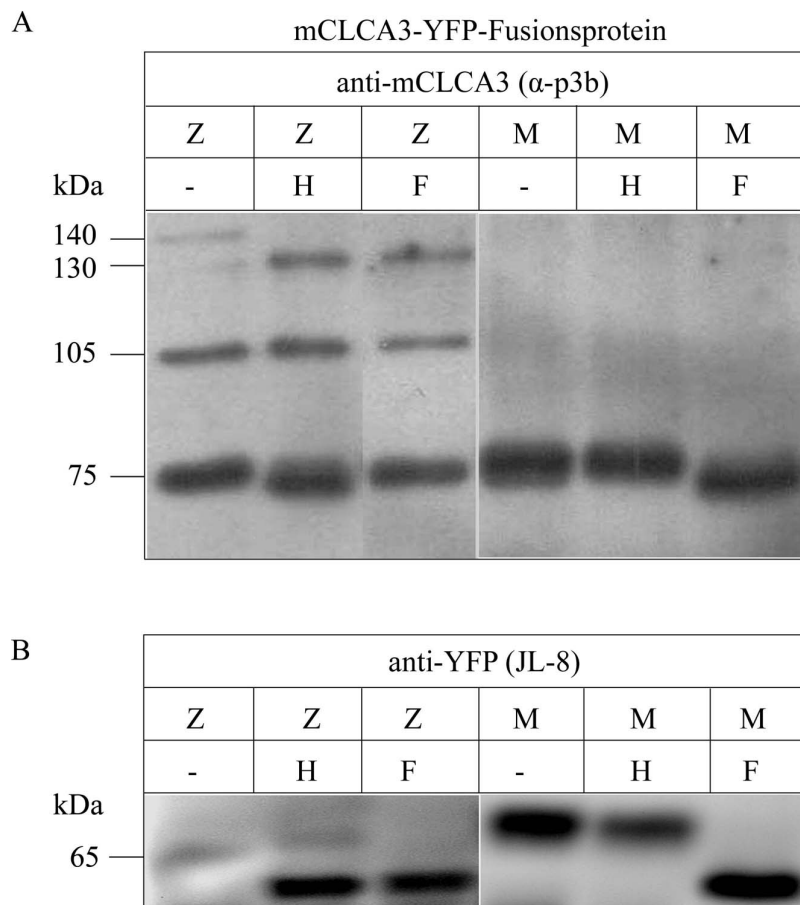


Abbildung 21: Glykosylierungsmuster des mCLCA3-YFP-Fusionproteins. Mit dem Antikörper anti-YFP immunpräzipitierte Proteine aus Zelllysate (Z) und Medium (M) von mCLCA3-YFP transfizierten COS-1 Zellen wurden auf Aliquots aufgeteilt und mit Endo H (H), PNGase F (F) oder nicht (-) behandelt. A) Westernblotanalysen mit dem Antikörper α -p3b identifizierten die 140 kDa und 75 kDa Banden im Zelllysate als Mannose reich glykosylierte Formen. Die 77 kDa Proteinform im Medium war hingegen nur empfindlich gegenüber der PNGase F-Behandlung und hatte somit den Golgi-Apparat passiert. B) Die Westernblotanalyse mit dem anti-YFP Antikörper (JL-8) zeigte, dass das 65 kDa Protein im Zelllysate eine Mannose reiche Form aus dem ER war, während das 68 kDa Protein komplex glykosyliert war und den Golgi-Apparat passiert hatte. Die Proteingrößen sind in kDa angegeben.