Karim Sven Yahya
Dr. med.

Die Bedeutung von Adapterproteinen für epitheliale Sekretions – und Absorptionsprozesse in Duodenum und Kolon

Geboren am 01.02.1977 in Hamburg
Staatsexamen am 19.05.2006 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Labormedizin
Doktorvater: Priv. –Doz. Dr. med. M. Volkmann

Die verschiedenartigen Absorptions – und Sekretionsprozesse in Duodenum und Kolon werden von einer Vielzahl von Transportproteinen durchgeführt. Von dem Kanalprotein CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) ist bekannt, dass es Leitfähigkeit für Chlorid und Bikarbonat besitzt und entscheidend an der cAMP stimulierten Bikarbonatsekretion beteiligt ist. Eine Dysfunktionalität führt zum Krankheitsbild der Mukoviszidose. DRA (Down Regulated in Adenoma) ist ein Cl^-/HCO_3^- Transportprotein mit einem PDZ – Domänen Interaktionsmotiv, das zusammen mit NHE3 u.a. für die Natriumchloridrückresorption im Kolon zuständig ist. Mutationen führen zur kongenitalen Chlorid Diarrhoe. Bei der Suche nach intestinalen Proteinen, die in der Lage sind, eine Bindung mit DRA einzugehen, fiel ein 70 kDa großes Protein auf, welches nur im Dünndarm, nicht jedoch im Dickdarm exprimiert wird: Als Kandidat kam CAP70 (CFTR associated protein of 70 kDa) in Frage. Von diesem Protein ist bekannt, dass es in der Lage ist mit CFTR eine Bindung einzugehen. Ziel dieser Arbeit war es, das bislang nicht sicher zugeordnete, DRA – bindende Protein zu identifizieren, und im Anschluss an die Identifikation dieses Proteins als CAP70 zu zeigen, in welcher Weise die beiden Proteine interagieren, und zu prüfen, ob sie in vivo die Möglichkeit dazu haben.

Aus der Schleimhaut von Kaninchen Duodenum und Kolon wurden CAP70 und DRA mittels RT - PCR amplifiziert, kloniert und zur Proteinexpression in E.coli BL21 transformiert. Nach Sequenzierung konnte die Primärstruktur der Kaninchensequenz von DRA und CAP70 sowie

die genaue Lage der einzelnen PDZ – Domänen von CAP70 dargestellt werden. Die einzelnen PDZ – Domänen wurden als CAP70 Fragmente kloniert, in E.coli BL21 exprimiert und in Bindungsessays zur näheren Charakterisierung der Interaktion zwischen DRA und CAP70 eingesetzt.

Für DRA wurden zwei verschiedene Konstrukte hergestellt. Eines, welches das C – terminale PDZ – Domänen – Interaktionsmotiv (ETKF) enthält, und eines, welchem dieses Interaktionsmotiv fehlt. Mit Hilfe von in vitro Interaktionsexperimenten konnte das postulierte DRA bindende Protein als CAP70 identifiziert werden.

Mittels Far Western Analyse konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von DRA und CAP70 hauptsächlich über die 2. PDZ Domäne von CAP70 und das C – terminale Interaktionsmotiv (ETKF) von DRA vermittelt wird. Mittels Bindungselisa und Kopräzipitation von DRA und CAP70 aus transfizierten HEK Zellen konnte die Bindung an sich und die Art und Weise der Interaktion von anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe bestätigt werden.

Die Daten unserer Arbeitsgruppe sprechen für die Hypothese, dass DRA je nach Lokalisation mit unterschiedlichen Transportproteinen und Adaptern interagieren kann. Einer Kopplung von NHE3 und DRA über NHERF und E3KARP im Kolon für die elektroneutrale NaCl Rückresorption könnte somit eine Kopplung von DRA und CFTR über CAP70 im Dünndarm für die Bikarbonatsekretion gegenüberstehen .