

Aus dem Institut für Physiologie und Pathophysiologie

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Dominik Oliver

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Charakterisierung der Lokalisation von Prestin (SLC26A5)

in Membran-Mikrodomänen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Anja Feuer

aus Leipzig, Deutschland

Marburg, 2016

Aus dem Institut für Physiologie und Pathophysiologie

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Dominik Oliver

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Charakterisierung der Lokalisation von Prestin (SLC26A5)

in Membran-Mikrodomänen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Anja Feuer

aus Leipzig, Deutschland

Marburg, 2016

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
am: 27. Oktober 2016 (Tag der Disputation)

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. Dominik Oliver

1. Korreferent: Prof. Dr. Timothy. Plant

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN	III
ZUSAMMENFASSUNG	VI
SUMMARY	VIII
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Der Hörprozess.....	1
1.2 Prestin	13
1.3 Fragestellung und Zielsetzung	23
2 MATERIAL UND METHODEN	25
2.1 Zellkultur	25
2.2 Molekularbiologie	37
2.3 Biochemische Versuche.....	58
2.4 Fluoreszenz-Mikroskopie	71
2.5 Bildbearbeitung	76
2.6 Statistik	76
2.7 Elektrophysiologie.....	78
2.8 Verwendete Software.....	83
2.9 Wiederholt eingesetzte Chemikalien	84
2.10 Verbrauchsartikel	85
3 ERGEBNISSE	87
3.1 Analyse der Pres-Lokalisation in Kulturzellen.....	87
3.2 Bestimmung der Verteilungsdeterminante und ihrer Lokalisation im Pres-Protein	91
3.3 Physiko-chemische Bedingungen des Pres-Clusterings	93
3.3.1 Cholesterol-Abhängigkeit	93
3.3.2 Temperatur-Abhängigkeit.....	94
3.4 Ko-Lokalisationsanalyse des mikrodomänen-assoziierten Cav-1 mit Pres	97
3.5 Analyse des Verteilungsmusters von Pres in Cav-1-defizienten Zellen	114
3.6 Analyse der räumlichen Beziehung von Pres zum Zytoskelett	115
3.7 Biochemische Analyse der Interaktion von Pres mit Cav-1, Aktin und Map1S	131
4 DISKUSSION.....	135
5 ANHANG.....	150
5.1 Anhang-Abbildung	150
5.2 Verzeichnisse	151
LEBENS LAUF.....	X
VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER	XII
EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG ÜBER DIE SELBSTSTÄNDIGE ANFERTIGUNG DER DISSERTATION.....	XIII
DANKSAGUNG	XIV

ABKÜRZUNGEN

aa	<i>amino acid</i> , Aminosäure
Abb.	Abbildung
ABR	<i>Auditory Brainstem Response</i> , Gehörreaktion des Hirnstamms
ACh	Azetylcholin
ÄHZ	äußere Haarzellen
Akt	<i>Actin</i> , Aktin
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure
APT	Aminoglykosid-Phosphotransferasen
<i>Aqua dest.</i>	<i>Aqua destillata</i> , destilliertes Wasser
ATPase	Adenosintriphosphatase
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , Rinderalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CASK	kalzium/ calmodulin-abhängige Serin-Proteinkinase
Cav	Caveolin
Cav-1	Caveolin-1
CD	Zytochalin D
CFP	<i>Cyan Fluorescent Protein</i>
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CHO-Zellen	Zelllinie aus den Ovarien des Chinesischen Hamsters
Cl ⁻	Chlorid-Ionen
CL	<i>cortical lattice</i> , kortikales Zytoskelett-Netzwerk
CLSM	<i>Confocal laser scanning microscopy</i> , Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie
cPres	<i>chicken Prestin</i> , Hühner-Orthologe von Prestin
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CTX-B	Cholera-Toxin-B
d.h.	das heißt
Da	Dalton [Einheit der Molekülmasse bzw. des Molekulargewichts]
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DDT	Dithiothreitol
DFNB61	<i>deafness, autosomal recessive 61</i> , autosomal rezessiv vererbter, nicht syndromaler Hörverlust
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPOAE	<i>Distortion product otoacoustic emissions</i> , Distorsionsprodukte otoakustischer Emissionen
dsDNA	<i>double stranded DNA</i> , doppelsträngige DNA
E(x)	Tag x der Embryonal-Entwicklung
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EciS	<i>extracisternal space</i> , extra-zisternaler Raum
EDTA	Ethylen-diamin-tetra-azetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum

ABKÜRZUNGEN

Ex-0	Extrazellulär-Lösung
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
FRAP	<i>Fluorescence Recovery after Photobleaching</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GLUT5	Fruktose-Transporter
GSdim	<i>ground state depletion followed by individual molecule return</i>
HEK-Zellen	<i>human embryonic kidney cells</i> , menschliche embryonale Nierenzelllinie
HepG2	humane Hepatoblastom-Zellen
HP β CD	2-Hydroxypropyl- β -Zyklodextrin
ICS	Intrazellulär-Lösung
i.d.R.	in der Regel
IDRs	<i>intrinsically disordered regions</i>
IHC	Immunhistochemie
IHZ	innere Haarzellen
IP	Immunopräzipitation
IR	Infrarot-Fluoreszenz
K ⁺	Kalium-Ionen
KCNQ4	<i>potassium channel, voltage gated KQT-like subfamily Q, member 4</i> , spannungsgesteuerter Kalium-Kanal
KoIP	Ko-Immunopräzipitation
LatA	Latrunkulin A
Map1S	<i>microtubule associated protein 1S</i> , mikrotubuli-assoziiertes Protein 1S
MD	<i>molecular dynamics simulations</i> , Molekül-Dynamik-Simulationen
MEF	<i>mouse embryonic fibroblasts</i> , Mausembryofibroblasten
MEK	Methylethylketon
MEM	<i>Minimum Essential Media</i> , Minimal-Medium
MET	mechano-elektrischen Transduktion
Mg ²⁺	Magnesium-Ionen
MIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i> [®] , Datenbank, die menschliche Gene und deren Mutationen erfasst
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure
MW	<i>molecular weight</i> , Molekulargewicht [in Da bzw. kDa]
Na ⁺	Natrium-Ionen
nAChR	nikotinerger Azetylcholin-Rezeptor
NEA	<i>Non-Essential Amino Acids</i> , nicht-essenzielle Aminosäuren
NLC	<i>nonlinear capacitance</i> , nicht-lineare Kapazität
N-Terminus	Amino-Terminus
nts	<i>nucleotides</i> , Nukleotide
OD	<i>optical density</i> , optische Dichte
OK-Zellen	<i>Opossum kidney cells</i> , Nierenzelllinie des Opossums
P(x)	<i>post partal</i> , Tag x <i>post partum</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBS-T	0.1% (v/v) Tween 20 in 1x PBS
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PDL	Poly-D-Lysin
Pen	Penizillin

ABKÜRZUNGEN

PFA	Paraformaldehyd
PLZF	<i>promyleocytic leukemia zinc finger</i>
Pres	Prestin
Q_{sp}	<i>voltage-evoked charge density</i> , spannungsinduzierte Ladungsdichte
RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i> , Vervielfältigung von cDNA-Enden
resp.	respektive
RFP	<i>Red Fluorescent Protein</i>
ROI	<i>region of interest</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute-Medium</i>
rPres	<i>rat Prestin</i> , Ratten-Orthologe von Prestin
Rr	Pearson's Ko-Lokalisationskoeffizient
RT	Raumtemperatur
SCAM	<i>substituted cysteine accessibility method</i> , Zystein-Zugänglichkeitsstudie
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SHC	<i>short hair cells</i> , entsprechen entwicklungsgeschichtlich den ÄHZ
SLC26	<i>Solute Carrier Family 26</i>
SLC26A5	<i>Solute Carrier Family 26 (Anion Exchanger), Member 5</i> , Prestin
Slc26A5d	Maus-Prestin Isoform 9b
Spag6	<i>sperm-associated antigen 6</i>
SSC	<i>subsurface cisternae</i> , subplasmalemmale Zisternen
ssDNA	<i>single stranded DNA</i> , Einzelstrang-DNA
Strep	Streptomycin
SulP	Sulfat-Transporter
T_a	<i>annealing temperature</i> , Hybridisierungstemperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Azetat-EDTA-Puffer
THC	<i>tall hair cells</i> , entsprechen entwicklungsgeschichtlich den IHZ
TIRFM	<i>Total internal reflection fluorescence microscopy</i> , Totale Interne Reflexions- Fluoreszenz-Mikroskopie
T_m	<i>melting temperature</i> , Schmelztemperatur
TMD	<i>transmembrane domain</i> , Transmembran-Domäne
T4 PNK	T4 Polynukleotid-Kinase
u.a.	unter anderem
VAPA	<i>vesicle-associated membrane protein associated protein A</i>
V_{pkc}	Spannung, bei der pro Spannungseinheit die größte Ladungsbewegung (<i>peak charge movement</i>) und die größte Längenänderung erfolgt
YFP	<i>Yellow Fluorescent Protein</i>
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
zPres	<i>zebrafish Prestin</i> , Zebrafisch-Orthologe von Prestin
β MCD	β -Methyl-Zyklodextrin

In der vorliegenden Arbeit wurden die Einheiten des Internationalen Einheitensystems (SI) mit ihren entsprechenden Basisgrößen sowie abgeleitete SI-Einheiten verwendet (Physikalisch-Technische Bundesanstalt, Braunschweig 2015) und folglich nicht aufgelistet.

ZUSAMMENFASSUNG

Prestin (*SLC26A5*; Pres) nimmt eine Schlüsselstellung für die Funktion des Säugetier-Innenohres ein. Es ist das Motorprotein der ÄHZ (Zheng et al. 2000), welches in Antwort auf Änderungen des Membranpotenzials ultraschnelle Längenänderungen der ÄHZ generiert (Brownell et al. 1985). Es wird angenommen, dass dieser als Elektromotilität bezeichnete Vorgang die Grundlage des elektro-mechanischen Verstärkerprozesses der ÄHZ darstellt und für die außerordentliche Sensitivität des Gehörs sorgt (Liberman et al. 2002). Der Verlust des Verstärkermechanismus der ÄHZ ist die häufigste Ursache von Schwerhörigkeit beim Menschen.

Immunolokalisationen von nativem Pres zeigen eine subzelluläre Lokalisation in der lateralen Plasmamembran der ÄHZ (Winter et al. 2006).

Die vorliegende Arbeit charakterisiert mittels verschiedener hoch auflösender Fluoreszenz-Mikroskopie-Techniken die spezifische subzelluläre Lokalisation der Pres-Orthologen aus Wanderratte (*Rattus norvegicus*; rPres), Zebrafisch (*Danio rerio*; zPres) und Huhn (*Gallus gallus*; cPres) im heterologen Expressionssystem.

Alle Pres-Orthologen offenbarten eine plasmamembran-ständige Lokalisation, jedoch Unterschiede in der Membran-Verteilung. Pres-Proteine aus Huhn wiesen eine homogene Verteilung auf. Die Orthologen aus Zebrafisch und Wanderratte hingegen lokalisierten als mikroskopisch sichtbare, fokale Cluster.

Als eine molekulare Determinante dieser differenziellen Lokalisation wurde die Transmembran-Domäne (TMD) von Pres identifiziert, d.h., die intrinsischen Eigenschaften der TMD sind für das Verteilungsverhalten von Pres ursächlich.

Weiterhin wurde herausgefunden, dass die biophysikalischen Bedingungen der Plasmamembran das Clustering ebenfalls beeinflussen: So wurde gezeigt, dass die Verteilung von Pres vom Cholesterol-Gehalt der Zellen und der Temperatur abhängig ist.

Darüber hinaus wird die Verteilung von Pres durch Proteine mitbestimmt. Das mikrodomänen-assoziierte Cav-1 ko-lokalisierte mit Pres und induzierte einerseits das Clustering von cPres, war andererseits aber für die Lokalisation als Cluster nicht essentiell.

Das Pres-Clustering war eng mit dem Zytoskelett assoziiert. So ko-lokalisierten Aktin- wie auch Map1S-Punkte mit den Pres-Clustern. Eine Depolymerisation des Aktin-Zytoskeletts löste die Cluster partiell auf. Heterolog exprimiertes Map1S verhinderte diese Auflösung.

Biochemisch wurde abschließend gezeigt, dass Aktin und Cav-1 mit Pres cholesterol-abhängig interagieren.

Zusammenfassend liegt Pres bei heterologer Expression in cholesterol-reichen und zytoskelett-abhängigen *lipid-raft*-artigen Membran-Domänen als Protein-Komplex mit Cav-1, Aktin und Map1S vor.

Die vorliegende Arbeit ermöglichte es, molekularen Eigenschaften der Pres-Membran-Domäne zu identifizieren und zeigt Kandidaten auf, die das Motorprotein der ÄHZ in der lateralen Membran organisieren könnten. Diese Kandidaten können an der Regulation der Elektromotilität beteiligt sein.

SUMMARY

Prestin (*SLC26A5*; Pres) takes a key position for the function of the mammalian inner ear. It is the motor protein of the outer hair cells (Zheng et al. 2000) which generates as an answer to changes in membrane potential ultrafast changes in length of the overall OHC (Brownell et al. 1985). It is supposed that this as electromotility designated process is the base for the electro-mechanical amplification performed from OHC and that this mechanism is accountable for the remarkable sensitivity of hearing (Liberman et al. 2002). Loss of the OHC amplification is the most frequent reason for hearing loss in humans.

Immunolocalisation of native Pres presents a subcellular localisation in the lateral plasma membrane of the OHC (Winter et al. 2006).

The present study characterises the distinctive membrane localisation of the three different Pres orthologs from rat (*Rattus norvegicus*, rPres), zebrafish (*Danio rerio*, zPres) and chicken (*Gallus gallus*, cPres) in heterologous expression systems using high-resolution fluorescence microscopy techniques.

All analysed Pres orthologs showed a membrane staining, but differences in their distribution within the membrane. Pres proteins from cPres displayed a homogenous distribution. Orthologs from rat and zebrafish expressed in a demonstrative manner, they localised as punctuated clusters.

The internal transmembrane domain (TMD) has been identified to act as a molecular determinant for the cluster formation. For this reason the distribution of Pres was accountable to intrinsic features of the TMD portion.

Moreover, biophysical properties of the plasma membrane influenced the clustering: The distribution of Pres depended on cellular cholesterol content and temperature.

Additionally, specific proteins co-determined the distribution of Pres. Microdomain-associated Cav-1 co-localised with Pres and induced cPres clustering, but was not essential for localisation as clusters.

Pres clustering was strongly cytoskeleton associated as Actin and Map1S spots co-localised with Pres clusters. Depolymerisation of Actin cytoskeleton partially dissolved the Pres clusters, but heterologously expressed Map1S prevented the dissolution.

SUMMARY

Finally, it has been shown biochemically that Actin and Cav-1 interact with Pres in a cholesterol-dependent manner.

In conclusion, Pres localises in cholesterol- and cytoskeleton-dependent lipid raft-like membrane domains as a protein complex with Cav-1, Actin and Map1S.

This study identified molecular characteristics of Pres membran domains and reveals candidates that could organise the motor protein of the OHC along the lateral membrane. These candidates could be involved in regulating the electromotility.

1 EINLEITUNG

1.1 Der Hörprozess

Hören beim Menschen ist ein zweistufiger Prozess. Der rein physikalische Vorgang der Schallaufnahme und -weiterleitung im Außen- und Mittelohr sowie die Umwandlung dieser Schallreize in neuronale Impulse im Innenohr, die vom Hörnerv weitergegeben werden, behandelt die periphere Teilfunktion. Die sich anschließende, zentral-auditorische Funktion sorgt für die neurale Verarbeitung. Erst der auditorische Kortex, auch Hörrinde genannt, dient der Auswertung und der bewussten und unbewussten Wahrnehmung von akustischen Reizen.

1.1.1 Die Schalleitung vom Außen- ins Mittelohr und Übertragung ins Innenohr

Das Außenohr besteht aus der Ohrmuschel und dem äußeren Gehörgang. Die Ohrmuschel sammelt die Schallwellen und bündelt diese. Der Gehörgang leitet sie zum Trommelfell weiter, einer Membran am inneren Ende des Gehörgangs, welche den Übergang zum Mittelohr darstellt (Abb. 1). Wenn Schallwellen auf das Trommelfell treffen, versetzen sie es in Schwingungen. Die Schallwellen-Bewegung wird weiter auf die Gehörknöchelchen-Kette, bestehend aus Hammer (*Malleus*), Amboss (*Incus*) und Steigbügel (*Stapes*), des luftgefüllten Mittelohrs übertragen. Der Steigbügel, das innerste Gehörknöchelchen, inseriert am ovalen Fenster und vermittelt die Schallenergie durch Schwingungsübertragung weiter an das Innenohr. Das Trommelfell, die Hebelwirkung der miteinander gekoppelten Gehörknöchelchen und die Vorhofmembran des ovalen Fensters wirken hierbei gemeinsam als Impedanz-Wandler: Die vergleichsweise niedrigen Schalldrücke und die hohe Auslenkungen des Luft-Mediums vor dem Trommelfell (niedrige Impedanz) werden in hohe Drücke und geringe Auslenkungen der Perilymph-Flüssigkeit am ovalen Fenster (hohe Impedanz) umgesetzt. Die zusätzliche Flächentransformation vom Trommelfell bis zur kleineren Fläche der Steigbügel-Fußplatte unterstützt die Impedanz-Wandlung, damit der Schall sich ohne Verluste ausbreiten kann.

1.1.2 Der Bau der Cochlea

Das Innenohr befindet sich in einem Hohlraum-Labyrinth innerhalb des Felsenbeins, eines Teils des Schläfenbeins. In diesem knöchernen Labyrinth liegt das membranöse Labyrinth. Es wird gebildet aus dem auditorischen Teil, der Gehörschnecke, auch Cochlea genannt, und aus dem Gleichgewichtsorgan.

Die Wände der Kochlea bestehen aus Knochengewebe. Die Kochlea ist schneckenartig aufgebaut. Beim Menschen besitzt sie 2,5 Windungen (Felix 2002), ist etwa 32 mm lang (Freberg 2015) und misst im Durchmesser 2 mm (Rask-Andersen et al. 2012; Singla et al. 2014).

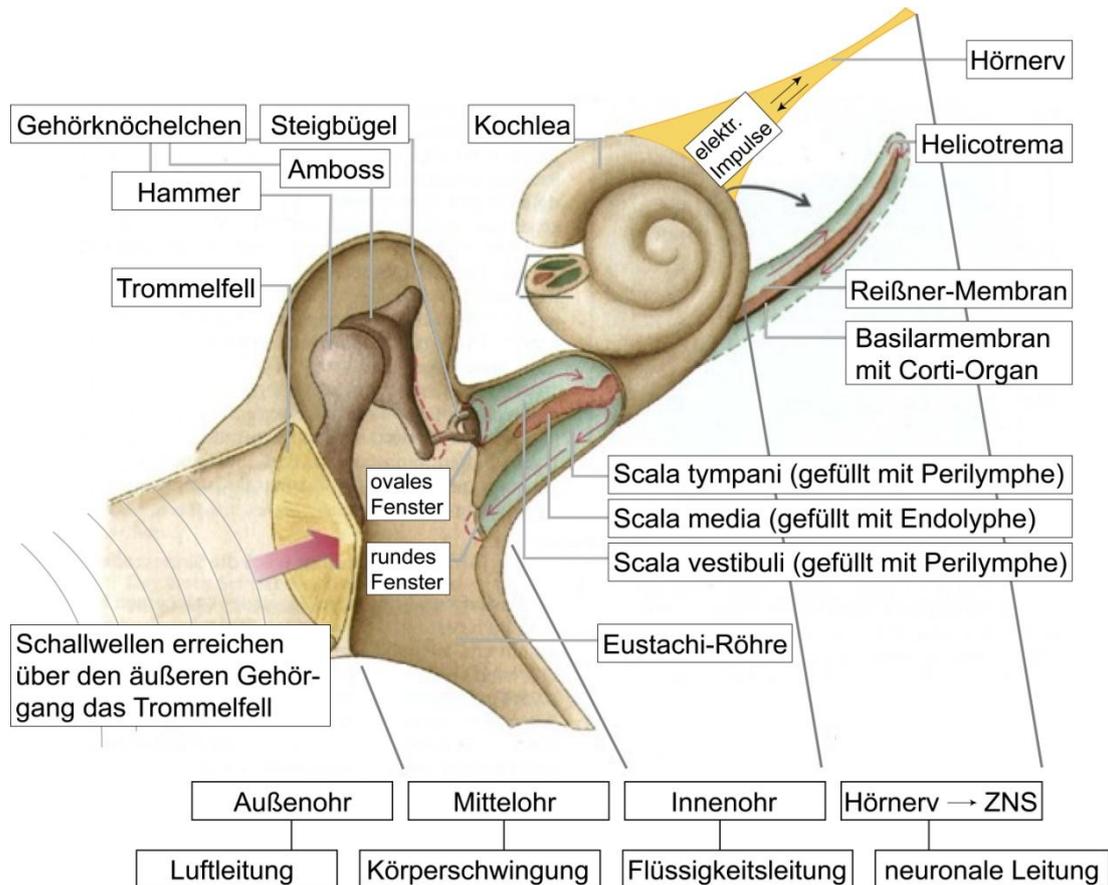


Abb. 1: Schematische Darstellung der peripheren Teilprozesse des Hörvorgangs: Das Außenohr und das Mittelohr dienen der Aufnahme und Weiterleitung des Schalls. In der Kochlea des Innenohrs (zur besseren Übersicht einmal gewunden und einmal entrollt gezeigt) werden die Schallenergien in elektrische Impulse umgewandelt, die der Hörnerv ins ZNS weitergeleitet (verändert nach Pape et al. 2010).

Die konisch geformte Schneckenwindung, Modiolus genannt, als zentraler knöcherner Kanal der Gehörschnecke, gewährleistet die Blutversorgung der Kochlea und enthält den Stamm des Höranteils des *Nervus vestibulocochlearis*, des VIII. Hirnnerven. Um die Schneckenwindung windet sich ein schlauchartiger Kanal, der innen durch Trennwände in drei voneinander abgegrenzte, parallel verlaufende, flüssigkeitsgefüllte Gänge, die *Scalae*, gegliedert ist (Abb. 1): die *Scala vestibuli* (Vorhofstreppe), die *Scala media* (*Ductus cochlearis* oder Schneckenengang) und die *Scala tympani* (Paukentreppe).

1.1.3 Das endokochleäre Potenzial

Die *Scala media* wird von der *Scala vestibuli* durch die Reissner-Membran und von der *Scala tympani* durch die Basilarmembran abgetrennt (Abb. 1). Die im Kochlea-Querschnitt oben ver-

laufende *Scala vestibuli* und die unten verlaufende *Scala tympani* stehen an der Spitze der Schnecke über das Schneckenloch, das *Helicotrema*, in Verbindung. Beide Gänge sind mit Perilymphe gefüllt, die eine ähnliche ionale Zusammensetzung wie die Extrazellulärflüssigkeit aufweist: Die Perilymphe besitzt eine hohe Natrium-Ionen- [$\text{Na}^+ = 141$ bis 148 mmol/l] und eine niedrige Kalium-Ionen-Konzentration [$\text{K}^+ = 4$ bis 6 mmol/l] (Dallos et al. 1996). Zwischen diesen beiden Gängen befindet sich die *Scala media*, die eine an Kalium-Ionen ungewöhnlich reiche [$\text{K}^+ = 157 \text{ mmol/l}$] und an Natrium-Ionen arme [$\text{Na}^+ = 1,3 \text{ mmol/l}$] Flüssigkeit, die Endolymphe, enthält (Dallos et al. 1996). Die Endolymphe wird durch aktive Transportprozesse vom Gefäßstreifen (*Stria vascularis*) an der seitlichen Schneckenwand produziert. Durch Ionenpumpen-Systeme wie Na^+/K^+ -ATPasen oder $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Co-Transporter werden Natrium-Ionen aus der Endolymphe entgegen dem Konzentrationsgefälle resorbiert und Kalium-Ionen in die Endolymphe sezerniert. Die Kalium-Ionen sind die Ursache für das um etwa 80 bis 100 mV positivere elektrische Potenzial der Endolymphe der *Scala media* gegenüber den übrigen Extrazelluläräumen. Dies wird als das endokochleäre Potenzial bezeichnet. Die Summe aus dem endokochleären Potenzial und dem Haarzellmembran-Potenzial ergibt die treibende elektrische Kraft für den depolarisierenden Kalium-Einstrom in die Haarzellen während der Transduktion.

1.1.4 Die Frequenz-Ort-Abbildung entlang der Basilarmembran

Die Cochlea ist an ihrer breiten Basis über die Gehörknöchelchen gegen das Mittelohr abgegrenzt. Dort befinden sich das ovale Fenster, direkt unterhalb der Fußplatte des Steigbügels am Übergang zur *Scala vestibuli*, und das runde Fenster am Ende der *Scala tympani*. Die Fußplatte des Steigbügel-Knochens schwingt entsprechend der Frequenz der Schallwelle und leitet somit über die Auslenkung des ovalen Fensters die mechanischen Schwingungen in die Flüssigkeit der *Scala vestibuli* hinein. Diese Druckwellen lösen Schwingungen der Basilarmembran in Form einer Wanderwelle aus, die von der Basis aufwärts zur Spitze der Schnecke läuft (Abb. 1). Aufgrund der Flexibilität der Reißner-Membran überträgt sich diese Welle auf die Endolymphe der *Scala media*, was den Druck auch auf die *Scala tympani* weitergibt. Über das runde Fenster wird dieser Druck ausgeglichen.

Von der Frequenz der Welle hängt ab, wie weit sie wandert und wo sie ihr Auslenkungsmaximum auf der Basilarmembran erreicht. Das Schwingungsverhalten der Basilarmembran wird durch ihre passiv-mechanischen, lokalen Eigenschaften bedingt: Bei abnehmender Steifigkeit nimmt ihre Breite von der Basis bis zur Spitze hin zu. Durch diese Beschaffenheit ändert sich die Eigenfrequenz der Basilarmembran und stimmt mit der Schallfrequenz nur an einem spezifischen Ort überein. Das Auslenkungsmaximum hoher Frequenzen liegt basisnah, da die starrere basale Basilarmembran stark schwingt. Niedrige Frequenzen haben ihr Amplitudenmaximum apexnah. Die Frequenzinformation wird so in eine Ortsinformation übersetzt. Die lokal ange-

sprochenen Haarzellen am Maximum und ihre afferenten Neurone sind infolgedessen für eine charakteristische Frequenz empfänglich. Diese Frequenz-Ort-Abbildung, auch Tonotopie oder Ortstheorie genannt, ist die wesentliche Ursache für die Frequenzselektivität des Säuger-Gehörs.

1.1.5 Das Corti-Organ

Die Basilarmembran trägt den sensorischen Apparat des auditorischen Systems, das Corti-Organ (Abb. 2). Das Corti-Organ umfasst Mechano-Rezeptorzellen und zusätzlich Stützzellen. Es ist nach oben hin durch die Tektorialmembran, eine azelluläre, gallertige Deckmembran, vom Lumen der *Scala media* abgetrennt.

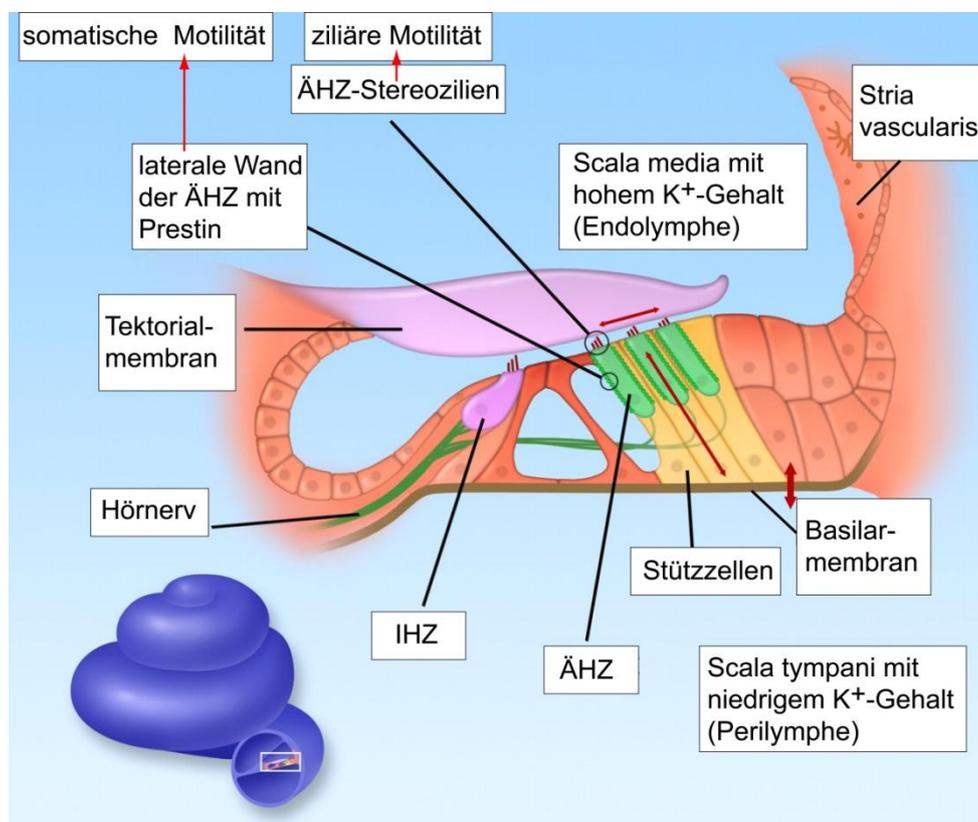


Abb. 2: Das Corti-Organ liegt auf der in der Cochlea aufgespannten Basilarmembran. Es enthält die Haarzellen (verändert nach Ashmore 2008).

Durch die eintreffende Wanderwelle werden die Basilar- und die Tektorialmembran gegeneinander verschoben. Dadurch bewegen sich die Haarzellen relativ zur Tektorialmembran (Abb. 2). Dies führt zur Auslenkung der Stereozilien der Haarzellen, wodurch die Sinneszellen erregt werden und das bisher mechanische Schallsignal in ein elektrisches Signal umgewandelt wird.

Man unterscheidet zwei Typen von Mechano-Rezeptoren, die inneren Haarzellen (IHZ) und die äußeren Haarzellen (ÄHZ; Abb. 2). Beide sind entlang des Corti-Organs auf der Basilarmembran in Längsrichtung angeordnet: Eine einzelne Reihe IHZ und parallel dazu drei Reihen ÄHZ ziehen von der cochleären Basis zum Apex. Die Zellen sind mit der Tektorialmembran bedeckt.

1.1.6 Die inneren und äußeren Haarzellen

Die IHZ, von denen in der Kochlea des Menschen ungefähr 3500 vorhanden sind (Schiebler et al. 2005), leiten die Informationen über den Hörnerv an das ZNS. Sie sind die reizaufnehmenden Sinneszellen im Innenohr. Die ÄHZ, von denen es zirka 12000 in der menschlichen Kochlea gibt (Schiebler et al. 2005), erhöhen die Leistungsfähigkeit der Kochlea, quantitativ durch die Erhöhung der Sensitivität und qualitativ durch die Erhöhung der Selektivität.

1.1.6.1 Der Aufbau der Säuger-Haarzellen

Am apikalen Pol einer Haarzelle befinden sich die Stereozilien. Diese Membran-Ausstülpungen treten aus der Kutikularplatte aus. Das untere, subnukleare Ende jeder Haarzelle ist innerviert.

Die IHZ haben eine Birnenform mit medial liegendem Nukleus. Mit einer Zelllänge von 15 bis 70 µm sind die ÄHZ eher zylindrisch, langgestreckt geformt. In der basalen Windung der Kochlea sind sie kürzer als in der apikalen Windung (Ashmore 2008). Das Motorprotein Prestin (Pres) befindet sich ausschließlich in der lateralen Zellmembran der ÄHZ (Winter et al. 2006). Nahe dem basalen Pol befindet sich der Kern der ÄHZ.

1.1.6.2 Die Innervation der Haarzellen

Haarsinneszellen sind sekundäre Sinneszellen, d.h., es handelt sich um spezialisierte Epithelzellen ohne eigenes Axon. Haarzellen werden von den Dendriten der Bipolarzellen des *Ganglion spirale* innerviert.

Jede IHZ ist über jeweils eine einzelne Synapse mit zirka 10 bis 20 Afferenzen verschaltet. Jedes dieser Neurone innerviert nur diese eine Haarzelle, so dass sich das Prinzip der Tonotopie auf der neuronalen Ebene fortsetzt. Die Hörnervenfasern weisen verschieden hohe Erregungsschwellen auf, so dass bei einem spezifischen Stimulus eine definierte Anzahl an Nervenfasern angesprochen wird. Die drei Reihen ÄHZ haben wenige afferente Fasern. Eine kleine Gruppe von etwa 10 ÄHZ wird von einer afferenten Bipolarzelle innerviert (Eska 2013).

Die Axone der Bipolarzellen des *Ganglion spirale* bilden schließlich den Hörnerv (*Nervus cochlearis* als Teil des *Nervus vestibulocochlearis*, des VIII. Hirnnerven), der als komplexe Hörbahn weiter über die *Nuclei cochleares*, die Kochleariskerne, zum Olivenkomplex im Hirnstamm und von dort zum auditorischen Kortex zieht.

Die ÄHZ sind durch Efferenzen aus übergeordneten Zentren des ZNS modulierbar: Hierfür bindet Azetylcholin (ACh) (He and Dallos 1999; Kong et al. 2006) am postsynaptischen Zellpol

an spezifische, ionotrop nikotinerge ACh-Rezeptoren (nAChR) bestehend aus $\alpha 9$ - und $\alpha 10$ -Untereinheiten (Elgoyhen et al. 1994; Elgoyhen et al. 2001; Lamas et al. 2014). Die Aktivierung dieser Rezeptoren hat einen schnellen und einen langsamen Effekt zur Folge (Sridhar et al. 1997; Cooper & Guinan 2003). Über liganden-gesteuerte Ionen-Kanäle erfolgt in der schnellen Reaktion ein rascher Einstrom von Kalzium-Ionen in die Zelle (Katz et al. 2000). Das Kalzium aktiviert einen kalzium-abhängigen Kalium-Kanal (Housley & Ashmore 1992) vom SK2-Typ, der spannungsabhängig modifiziert werden kann (Oliver et al. 2000). So kommt es zu einem Ausstrom von Kalium-Ionen und zur Hyperpolarisation der Zelle (Ashmore 2008). Der langsame Effekt (Sridhar et al. 1995) ist weniger gut erforscht: Kalzium als *second messenger*, das in den ÄHZ-spezifischen Membransystemen der subplasmalemmalen Zisternen gespeichert wird, induziert eine Verringerung der Spannungssensitivität und eine verminderte elektro-motile Antwort (He & Dallos 1999; He & Dallos 2000; Frolenkov 2006). Weiterhin resultieren die Abnahme der Steifigkeit der ÄHZ und eine Dämpfung der kochleären Verstärkung (Ashmore 2008).

1.1.6.3 Die mechano-elektrischen Wandler

Am apikalen Pol jeder Haarzelle befinden sich annähernd 90 sensorische Membranausstülpungen. Es handelt sich dabei um die namensgebenden, haarähnlichen Fortsätze, die als Haarbündel organisiert sind und bis in die Endolymph-Flüssigkeit ragen. Sie sind die eigentlichen mechano-elektrischen Wandler. Obwohl diese Ausstülpungen nicht den typischen Feinbau eines Stereoziliums, d.h. von 9 Paaren eines Mikrotubuli-Dubletts in 9 x 2-Struktur aufweisen, werden sie als solche bezeichnet. Die Stereozilien der IHZ stehen frei, sie enden unterhalb der Tektorialmembran. Die Spitzen der längsten Stereozilien der ÄHZ sind mit der Unterseite der Tektorialmembran verbunden (Abb. 2).

Die Stereozilien enthalten Fimbrin (Zine et al. 1995) und dichte, längs verlaufende Aktin-Filamente (Drenckhahn et al. 1985). Durch ihre Steifigkeit werden die Stereozilien bei mechanischer Einwirkung an der Basis abgewinkelt. Die Gesamtheit der Stereozilien einer Haarzelle wird stets als Einheit bewegt (Flock et al. 1977; Slepecky & Chamberlain 1985; Kozlov et al. 2007).

Innerhalb eines Haarbündels sind die Stereozilien unterschiedlich lang. Sie sind treppenartig abgestuft und in U- (IHZ) oder W- Form (ÄHZ) angeordnet (Fettiplace & Kim 2014). Zudem nimmt die Länge der Stereozilien entlang der *Scala media* von basal nach apikal zu. Neben dieser apiko-basalen Polarität zeichnen sich die Haarzellen durch eine planare Polarität aus (Fettiplace & Kim 2014): Ihre Stereozilien sind koordiniert ausgerichtet und stehen in einer bevorzugten Orientierung in der Ebene. An der Spitze weisen die Stereozilien einen größeren Durchmesser auf als an ihrer Basis (Fettiplace & Hackney 2006).

1.1.6.4 *Tip links* und Transduktionskanäle

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass von den Spitzen der kürzeren Stereozilien extrazelluläre, zirka 10 nm feine Proteinfäden zu den nächst größeren Stereozilien ziehen (Kachar et al. 2000). An den Ansatzstellen dieser *tip links* liegen unselektive Kationenkanäle (Denk et al. 1995; Lumpkin & Hudspeth 1995). Nach heutigem Kenntnisstand öffnen oder schließen die *tip links* je nach Spannungszustand rein mechanisch die sogenannten mechano-elektrischen Transduktions-Kanäle (MET-Kanäle; Shotwell et al. 1981; Hudspeth 1989).

Während der Scherbewegung der Basilar- gegenüber der Tektorialmembran werden die mit der Tektorialmembran verbundenen Stereozilien der ÄHZ abgewinkelt. Durch den Sog der subtektorialen Endolymphbewegung werden die Stereozilien der IHZ gleichfalls ausgelenkt (Jia et al. 2007; Nowotny & Gummer 2011; Guinan 2012).

1.1.6.5 Die mechano-elektrische Transduktion

Die Haarzelle hat eine hohe spontane Ruheaktivität. Im Ruhezustand stehen die *tip links* aufrecht unter geringfügiger Spannung, so dass sie die mechano-sensitiven MET-Kanäle partiell geöffnet halten und ein geringer, aber stetiger Kalium-Einstrom aus der Endolymph-Flüssigkeit in die Haarzelle resultiert. Werden die Stereozilien nun zur Seite ausgelenkt, so kommt es je nach Richtung zu einer Stauchung oder Dehnung der *tip links* und folglich zur Öffnung bzw. zum Verschluss der MET-Kanäle (Pickles et al. 1984; Furness & Hackney 2006): Das Abwinkeln der Stereozilien in Richtung der längsten Stereozilien durch erhöhten Zug an den *tip links* (in die exzitatorische Richtung) resultiert in einer erhöhten Offenwahrscheinlichkeit der MET-Kanäle, es kommt zu einem verstärkten Kalium-Ioneneinstrom. Durch den nun fließenden Transduktionsstrom wird eine Potenzialänderung hervorgerufen, die Zelle depolarisiert. Die Auslenkung der Stereozilien in die entgegengesetzte, inhibitorische Richtung lässt die *tip links* erschlaffen. Durch die geringere Offenwahrscheinlichkeit der MET-Kanäle versiegt der Kalium-Einstrom. Die Zelle hyperpolarisiert.

Dieser Umsetzungsprozess des mechanischen Schallreizes in elektrische Signale wird als mechano-elektrische Transduktion bezeichnet. Die genauen zugrunde liegenden Öffnungsmechanismen der MET-Kanäle wie auch ihre molekularen Komponenten sind noch unbekannt (Gillespie & Müller 2009; Schwander et al. 2010; Powers et al. 2012).

Der depolarisierende Kalium-Ioneneinstrom ist die Grundlage der membran-elektrischen Antwort der Haarzellen, des Rezeptorpotenzials, wodurch nachfolgend spannungsabhängige L-Typ-Kalziumkanäle vom Typ $Ca_v1.3$ aktivieren (Platzer et al. 2000). Die aus dem Kalzium-Ioneneinstrom resultierende Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration steuert am

basalen Pol die Ausschüttung von L-Glutamat in den synaptischen Spalt (Roberts et al. 1990; Brandt et al. 2003).

Jede IHZ weist an ihrem basalen Pol hoch spezialisierte Bändersynapsen auf (Glowatzki et al. 2008). Das ausgeschüttete Glutamat bindet an Glutamat-Rezeptoren, vom AMPA-Glutamat-Rezeptor-Subtyp, in der postsynaptischen Membran korrespondierender afferenter, bipolarer Neurone (Matsubara et al. 1996), wodurch ein postsynaptisches Generatorpotenzial bewirkt wird. In den Spiralganglienneuronen werden vermehrt Aktionspotentiale generiert, die über die Hörbahn weitergeleitet werden.

Die Repolarisation der Haarzellen wird von Kalium-Ionen getragen: Das apikal eingeströmte Kalium fließt über spannungsabhängige Kaliumkanäle, wie den Kv7.4 (*KCNQ4* in den ÄHZ; Kharkovets et al. 2000) und den kalzium-aktivierten BK-Kanal (in den IHZ; Kros et al. 1998), im baso-lateralen Teil der Haarzellen wieder hinaus, da im unteren, von Perilymphe umspülten Zellbereich zum Zellinneren eine viel niedrigere Kalium-Ionenkonzentration herrscht.

1.1.7 Die äußeren Haarzellen

1.1.7.1 Der Feinbau der Membran-Strukturen

Bei verschiedenen Säugetieren wurde in den ÄHZ ein einzigartiger, dreischichtiger Membran-Aufbau beschrieben (Abb. 3). Diese laterale Membran-Struktur ist zirka 100 nm dick (Gliko et al. 2009) und besteht aus zwei konzentrisch verlaufenden, zylindrischen Schichten: erstens, der dicht mit Pres-Partikeln gepackten Plasmamembran (Forge 1991; Kalinec et al. 1992; Zheng et al. 2000; Belyantseva et al. 2000; Zheng et al. 2003) und zweitens, einer zytoplasmatischen Membran-Besonderheit in Form von Doppelmembran-Anhäufungen (Engstrom & Sjostrand 1954), den subplasmalemalen Zisternen (*subsurface cisternae*, SSC).

Nach elektronenmikroskopischen Studien von Saito (1983) liegen die SSC parallel verlaufend, direkt unter der seitlichen Plasmamembran. Im Verlauf zum basalen Pol dünnen sie dann bis auf nur noch eine Schicht aus (Saito 1983). Wegen dieses feinstrukturellen Aufbaus wird die SSC-Organelle mit dem sarkoplasmatischen Retikulum der Skelettmuskulatur verglichen (Flock et al. 1986). Zudem konnten eine bemerkenswert hohe, zytoplasmatische Kalzium-Ionenkonzentration mittels mikro-fluorimetrischer Verfahren (Ikeda et al. 1993) und das Enzym Ca^{2+} -ATPase durch Immunfärbungen (Schulte 1993) nachgewiesen werden. Frolenkov (2006) spekulierten, dass die SSC durch Ausschüttung von Kalzium-Ionen an der Regulation der ÄHZ-Motilität mitwirken könnten. Song & Santos-Sacchi (2015) nahmen an, dass die SSC die Weiterleitung der Anregungsspannung innerhalb der lateralen Membran zu den Motorproteinen erleichtern könnten. Die genaue Funktion der SSC in den ÄHZ ist bisher nicht bekannt.

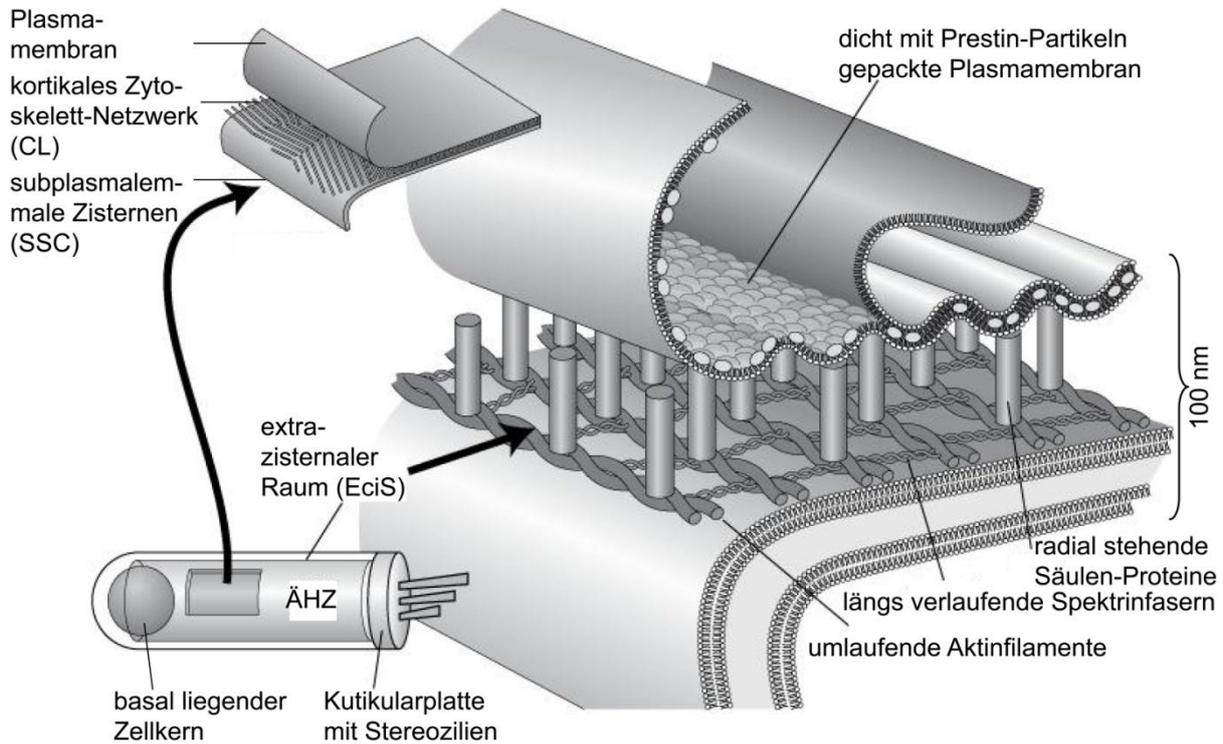


Abb. 3: Der Membran-Aufbau der lateralen Wand der ÄHZ: Zwischen der mit Pres besetzten Plasmamembran und viel-lagigen Membran-Anhäufungen befindet sich ein differenziertes Zytoskelett, *cortical lattice* genannt (verändert nach Gliko et al. 2009).

Die Membran-Strukturen der Plasmamembran und der SSC-Organelle werden nach den elektronenmikroskopischen Analysen von Saito (1983) durch den extra-zisternalen Raum (*extracisternal space*, EciS), einen 20 bis 40 nm großen, flüssigkeitsgefüllten Raum, voneinander getrennt (Abb. 3). Er enthält ein spezialisiertes, kortikales Zytoskelett-Netzwerk, das *cortical lattice* (CL), das ein System aus hochgeordneten Filamenten ausbildet (Holley & Ashmore 1988).

Elektronenmikroskopische Analysen (Holley & Ashmore 1988; Holley et al. 1992) und Immunfärbungen (Holley & Ashmore 1990; Mahendrasingam et al. 1998) zeigen, dass das CL aus im Abstand von 40 nm umlaufenden Aktin-Filamenten aufgebaut ist, die durch dazu längsverlaufende Spektrin-Fasern verbunden sind (Brownell & Popel 1998). Die Plasmamembran wird durch radial stehende, 25 nm lange Säulen-Proteine, die *pillars* (Holley et al. 1992), noch unbekannter molekularer Zusammensetzung mit den Aktin-Filamenten verknüpft (Brownell & Popel 1998; Abb. 3).

Das CL ermöglicht, wahrscheinlich zusammen mit dem zytoplasmatischen Turgor-Druck, den ÄHZ eine Steifigkeit, wie auch eine Zug- und Streckbelastbarkeit, die Erhaltung der zylindrischen Form und die Generierung der spezifischen Elektromotilität während des Hörprozesses (Holley & Ashmore 1988; Brownell & Popel 1998; Gliko et al. 2009). Zudem wird erwartet, dass das CL eine kritische Funktion für die Mobilität des Motorproteins der ÄHZ in der Plasmamembran übernimmt und darüber hinaus an der Übertragung der Pres-generierten Kräfte auf

den Zellkörper grundlegend beteiligt ist (Yamashita et al. 2015). In morphologischen Studien homozygot Pres-defizienter Mäuse beobachteten He et al. (2010) neben einer deutlich reduzierten axialen Steifheit und der verminderten Länge der ÄHZ, den Verlust dieses CL. Dies lässt die Spekulationen zu, dass einerseits die Steifheit der Haarzellen von Pres abhängig ist und andererseits Pres eine Funktion bei der Rekrutierung oder dem Erhalt des kortikalen Netzwerkes hat.

1.1.7.2 Die Signalverstärkung

Ursächlich für die besonderen Qualitäten des Hörens bei Säugern ist ein lokaler, positiver elektro-mechanischer Rückkopplungsmechanismus (Liberman et al. 2002), der als kochleärer Verstärker bezeichnet wird. Die Verstärkerfunktion basiert auf der somatischen und der ziliären Motilität der ÄHZ. Die in beiden Mechanismen entstehende selektive, elektro-mechanische Kraft verstärkt mit aktiven Bewegungen die passiven Schwingungen der Wanderwelle im angesprochenen Bereich (Dallos 1992; Oghalai 2004; Dallos et al. 2008). Durch diese Amplifikationen in den ÄHZ wird die Sensitivität des Gehörs bei Säugern um 40 bis 60 dB gesteigert (Liberman et al. 2002). Erst die Gesamtheit der mechano-elektrischen und elektro-mechanischen Transduktionsvorgänge ermöglicht die hohe Sensitivität und Frequenzselektivität des Säugetier-Gehörs.

Neben den beiden schnellen Haarzellmotilitäts-Mechanismen der Säuger existiert auch ein langsamer. Die langsame Motilität wird durch olivo-kochleäre Efferenzen gesteuert (He & Dallos 1999) und kann die schnellen Verstärkungsmechanismen durch die fast vollständig efferente Innervation der ÄHZ über ACh hemmen (Kong et al. 2006; Frolenkov 2006; Ashmore 2008; siehe 1.1.6.2). Der langsam-motile Effekt ist u.a. für den Schutz vor akustischer Überstimulation bei steigendem Schalldruckpegel verantwortlich, indem die Schwingungsfähigkeit der Basilar-membran gehemmt wird (Fuchs 2002).

Die ziliäre Motilität

Bei der ziliären Motilität erfolgt die Verstärkung durch eine aktive Motor-Funktion der apikalen Haarbündel-Strukturen. Die Stereozilien bewegen sich bei ihrer Auslenkung aktiv mit, d.h., sie haben die Fähigkeit, Bewegungen und mechanische Kräfte zu generieren (Fettiplace & Hackney 2006). So wird angenommen, dass in den ÄHZ in Antwort auf den Kationen-Einstrom durch die MET-Kanäle und die erhöhte stereoziliäre Kalzium-Ionen-Konzentration, in einem aktiven *twitch*-Mechanismus, die MET-Kanäle verschlossen und die Haarbündel in ihre Ausgangstellung zurückversetzt werden (Benser et al. 1996). An den resultierenden Oszillationen der Haarbündel können spannungsabhängige Umverteilungen von Strukturelementen der Stereozilien und Membranbestandteilen beteiligt sein, die bei konstant bleibendem Volumen zu einer Verlängerung der Stereozilien führen (Fettiplace 2006; Breneman et al. 2009). Die Oszillationen

werden durch Myosin-Motoren vermittelt (Breneman et al. 2009), wobei die genauen molekularen Komponenten der ziliären Motilität größtenteils unerforscht sind.

Das zum Säuger-Corti-Organ homologe auditorisch-sensorische Organ bei Vögeln, Amphibien und Reptilien, die *Papilla basilaris*, beinhaltet zwei Typen von Sinnesepithelzellen. Die *tall hair cells*, THC, und die *short hair cells*, SHC, entsprechen entwicklungsgeschichtlich den IHZ und den ÄHZ der Säuger. Direkte Analysen der spannungsabhängigen Längenänderung mittels Photo-Diode und der nicht-linearen Kapazität (*nonlinear capacitance*, NLC) von He et al. (2003) zeigten, dass Vogel-Haarzellen weder somatische Motilität noch NLC ausprägen. Nach derzeitigem Kenntnisstand resultieren die beobachteten aktiven Prozesse der SHC der *Papilla basilaris* allein aus oszillierenden Bewegungen der Haarbündel (Hudspeth et al. 2000). Ziliäre Motilität konnte bisher an weiteren Tetrapoden wie Fröschen und Schildkröten gezeigt werden (Crawford & Fettilplace 1985; Martin & Hudspeth 1999; Martin et al. 2003), kürzlich auch bei den ÄHZ von Nagern (Yi & He 2014).

Bei Säugern war das Auftreten der ziliären Motilität lange nicht eingehend aufgeklärt. Während Chan & Hudspeth (2005) an IHZ von Säugern ziliäre Rotationen zeigten, wiesen Yi & He (2014) erstmals an den ÄHZ von Nagern ziliäre Motilität nach. Diese ziliäre Motilität basierte aber nicht auf den MET-Kanälen wie in Nicht-Säugern (Ricci et al. 2000), sondern auf der somatischen Motilität (Yi & He 2014). Der genaue Mechanismus, der der Übertragung der Längenveränderung zur Haarbündel-Oszillationen obliegt, steht noch nicht fest (Yi & He 2014). Kipp-Bewegungen der Kutikularplatte (Reuter et al. 1992), Rotationen der *Lamina reticularis* (Mammo & Ashmore 1993) und daraus resultierende radiale Bewegung der Tektorialmembran (Yi & He 2014) während der Längenänderung der ÄHZ scheinen an der ziliären Motilität beteiligt zu sein. Die Haarbündel-Bewegungen der ÄHZ verstärken schließlich gemeinsam mit der somatischen Motilität den Input zu den Stereozilien der IHZ, indem sie eine erhöhte Bewegung der subtektorialen Flüssigkeit vermitteln, die die freistehenden Stereozilien der IHZ stimuliert (Yi & He 2014).

Die somatische Motilität

Die somatische Motilität beruht auf der spannungsabhängigen Konformationsänderung des Motorproteins Pres der ÄHZ. Während des Transduktionsprozesses wird diese Konformationsänderung auf den Zellkörper der ÄHZ übertragen, der dann mit extrem schnellen Längenänderungen der gesamten ÄHZ antwortet (Brownell et al. 1985): Bei Depolarisation kommt es zur Verkürzung der ÄHZ, bei Hyperpolarisation zur Verlängerung (Abb. 5). Zyklische Kontraktionen und Elongationen über 70 kHz wurden bei Meerschweinchen nachgewiesen (Frank et al. 1999).

Die somatische Motilität der ÄHZ wird als Elektromotilität bezeichnet (Brownell 1990). Die Elektromotilität kann direkt durch die Messung der Längenänderungen quantifiziert werden. Alternativ wird die Bestimmung der NLC als indirekte Messmethode herangezogen (Santos-Sacchi 1991).

ÄHZ haben wenige Kontakte mit der Umgebung. Sie sind über die Stereozilien mit der Tektorialmembran verbunden und an ihrem basalen Pol zusätzlich mit den Deiters-Zellen verknüpft. Diese wenigen Assoziationen ermöglichen die Beweglichkeit der ÄHZ.

Mit der Photo-Inaktivierung von Pres in kochleären Subregionen von Chinchillas reduzierten Fisher et al. (2012) die Amplitude der Wanderwelle im angesprochenen Bereich und hemmten so die zusätzlichen Schwingungsenergien der Motilitätsfunktion der ÄHZ. Dies beweist, dass die Pres-vermittelten, zellulären Kräfte an der Basalmembran für die lokale Amplifikation der kochleären Wanderwelle essentiell sind und verdeutlicht die örtliche Beziehung zwischen der somatischen Motilität der ÄHZ und der kochleären Wanderwelle (Ren & Gillespie 2012).

Der *knock out* beider muriner Pres-Allele manifestiert sich *in vitro* in der Einbuße der Elektromotilität und *in vivo* in einem 40 bis 60 dB-Verlust an kochleärer Sensitivität über den gesamten Frequenzbereich gegenüber dem Wildtyp (Liberman et al. 2002). Dies entspricht dem Verlust der kochleären Amplifikation bei erhaltener, normaler mechano-elektrischer Transduktion der ÄHZ (Liberman et al. 2002). Die Sensitivität des Säuger-Gehörs ist somit primär auf die somatische Motilität zurückzuführen. Zudem beschrieben Wu et al. (2004) in Pres *knock out*-Mäusen eine signifikant höhere Apoptoserate der IHZ und der ÄHZ in der postnatalen Entwicklung ab Tag 28. Messungen der ABR (*auditory brainstem response*, Gehörreaktion des Hirnstamms) auf Click-Stimuli dieser Mäuse dokumentierten eine Erhöhung der Hörschwelle um 25 dB, welche der Haarzell-Degeneration um wenigsten 2 Wochen vorausging (Wu et al. 2004). Dies impliziert, dass der Ausfall der Pres-induzierten Elektromotilität der primäre Grund für den Hörverlust der Pres-*knock out*-Mäuse ist (Liberman et al. 2002; Cheatham et al. 2004; Wu et al. 2004).

Der *knock in* der Mutationen K233Q/ K235Q und R236Q von positiv geladenen zu polaren Aminosäuren im Bereich einer zytoplasmatischen Schlaufe im murinen Pres-Lokus durch Gao et al. (2007) und Yamashita et al. (2012) resultierte in reduzierten Mengen von Pres-Proteinen. Die NLC wie auch die Elektromotilitäts-Antworten der isolierten ÄHZ zeigten eine Verschiebung in Richtung hyperpolarisierender Potenziale (Gao et al. 2007). Die Länge der ÄHZ, die Ladungsbewegung und -dichte und die Elektromotilität nahmen Werte zwischen WT- und Pres-defizienten-Mäusen an (Yamashita et al. 2012). Darüber hinaus zeigten ABR-Messungen, dass die Sensitivität der *knock in*-Tiere dem Wildtyp entsprach (Yamashita et al. 2012). Daraus kann geschlossen werden, dass bereits geringere Pres-Mengen in den ÄHZ ausreichen, um eine normale Sensitivität des Gehörs zu gewährleisten.

Die Einführung von V499G und Y501H im Bereich zwischen der letzten Transmembran-Domäne (TMD) und dem C-Terminus im Maus-Pres hingegen hebt die Elektromotilität der ÄHZ nahezu vollständig auf (7,5 % vom Wildtyp; Dallos et al. 2008). Die erhöhte Hörschwelle und die verringerte Frequenzselektivität sind vergleichbar mit dem Verlust der ÄHZ bzw. der Pres-*knock out*-Maus. Die Länge, Steifheit und Transduktion der ÄHZ sind durch den *knock in* unverändert, während der Verlust von 40 bis 60 dB kochleärer Sensitivität *in vivo* bei diesen Mäusen unterstreicht (Dallos et al. 2008), dass Pres, und im Besonderen die Aminosäuren an Position 499 und 501 für die Ausbildung der Elektromotilität essentiell sind.

Die *knock in*-Studien von Gao et al. (2007), Dallos et al. (2008) und Yamashita et al. (2012) wie auch die *knock out*-Untersuchungen von Liberman et al. (2002) und Wu et al. (2004) sagen einheitlich aus, dass die Pres-vermittelte Elektromotilität der ÄHZ die Basis für die kochleäre Amplifikation der Säuger ist.

Derweil die ziliäre Motilität als ursächlich für die kochleäre Amplifikation bei den Haarzellen aller Vertebraten gesehen wird, bildet die somatische Motilität aber wahrscheinlich nur einen grundlegenden Beitrag zur kochleären Amplifikation bei Säugern. Über die genauen Anteile der ziliären und somatischen Motilität der Säuger zur Gesamtverstärkung durch die ÄHZ wird kontrovers diskutiert (Dallos 2008, Yi & He 2014).

1.2 Prestin

Die molekulare Grundlage des Verstärkerprozesses der ÄHZ ist das Protein Prestin (Pres). Das Gen *SLC26A5* kodiert für Pres. Pres wurde im Jahr 2000 von Zheng et al. entdeckt. Beim Menschen enthält *SLC26A5* 21 Exons (Liu 2003) und ist auf Chromosom 7 an der Position q22.1 lokalisiert (*GeneBank*-Zugangsnummer: AF523354). Die Sequenz von Pres ist hoch konserviert. Das Pres-Protein (*SCL26A5*-Transkript-Variante a) hat eine Molekülmasse von ungefähr 80 kDa und ist aus 744 Aminosäuren aufgebaut (Zheng et al. 2000; Liu 2003). Autosomal rezessiv vererbter, nicht syndromaler Hörverlust (*DFNB61*, Phänotyp-MIM-Nummer: 613865) ist mit homozygoten Mutationen im *SLC26A5*-Gen assoziiert (Liu 2003; Mutai et al. 2013).

Pres ist ein Mitglied der *solute carrier 26* (*SLC26*)-Familie von Anionentransportern bei Säugern (Mount & Romero 2004; Dorwart et al. 2008), die der umfangreichen Sulfat-Transporter (SulP)-Superfamilie zugeordnet ist, mit Homologen bei Pflanzen, Tieren, Pilzen und Bakterien (Saier et al. 2009). Die Grundfunktion der Mitglieder der *SCL26*-Familie ist der Anionentransport, die Aufgabe von Pres ist aber eine andere. Pres ist das Motorprotein der ÄHZ des Säugetier-Innenohres (Belyantseva et al. 2000; Zheng et al. 2000) und als einziges Mitglied der *SCL26*-Familie zur Elektromotilität befähigt (He et al. 2003; Albert et al. 2007; Schaechinger &

Oliver 2007). Es nimmt demzufolge unter den *SLC*-Transportern eine Schlüsselstellung für die Funktion des Innenohrs ein.

Nicht-Säugetier-Orthologe von Pres arbeiten als elektrogene Antiporter von Anionen (Albert et al. 2007; Schaechinger & Oliver 2007). Die Vertebraten-Orthologen aus Huhn und Zebrafisch generieren im heterologen Expressionssystem robuste Transportströme: Chlorid-Ionen werden gegen divalente Anionen wie Sulfat oder Oxalat in einer 1:1-Stöchiometrie ausgetauscht (Schaechinger & Oliver 2007).

1.2.1 Membrantopologie

Pres besitzt 14 TMD. Diese sind in einer 7 + 7 invertierten Struktur-Wiederholung, als *repeat* und *inverted repeat*, organisiert (Abb. 4). Die TMD haben überwiegend eine α -helikale Konformation. Eine Ausnahme bilden nur zwei kurze, antiparallele β -Faltblatt-Stränge in der dritten und zehnten TMD (Gorbunov et al. 2014). Die komplexen N- und C-Termini sind zytoplasmatisch lokalisiert (Zheng et al. 2001).

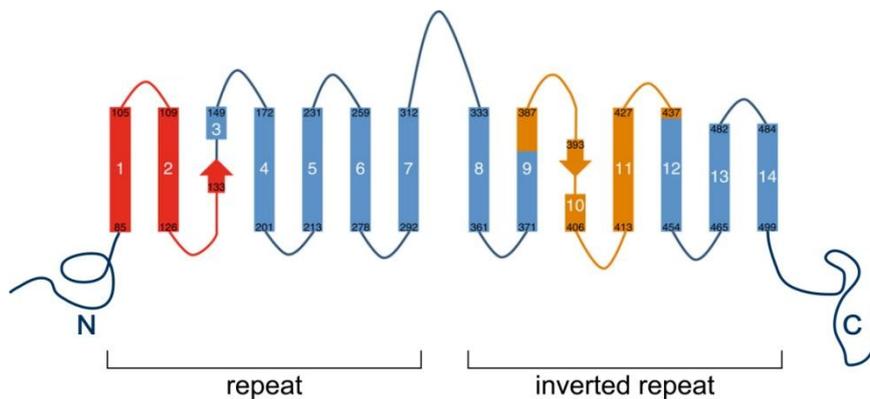


Abb. 4: Schematische Darstellung der Membran-Topologie von Pres (verändert nach Gorbunov et al. 2014)

1.2.2 Mechanismen

Den Prozess der Elektromotilität generiert Pres selbst (Zheng et al. 2000): Änderungen der Membranspannung, die durch einen molekularen Spannungssensor detektiert werden (Oliver et al. 2001; Bezanilla 2008), lösen ultraschnelle Konformationsänderungen zwischen zwei strukturell verschiedenen Zuständen von Pres aus (Iwasa 2001; Dallos & Fakler 2002; Homma & Dallos 2011). Diese Zustände belegen nach dem *area motor*-Modell verschieden große Flächen in der Membran (Dallos et al. 1991; Iwasa 2001; Abb. 5). Durch die Summe der Veränderungen der dicht gepackten Pres-Moleküle in der lateralen Membran ist die hochfrequente Veränderung der Gesamtlänge der ÄHZ möglich (Frank et al. 1999; Ashmore 2008).

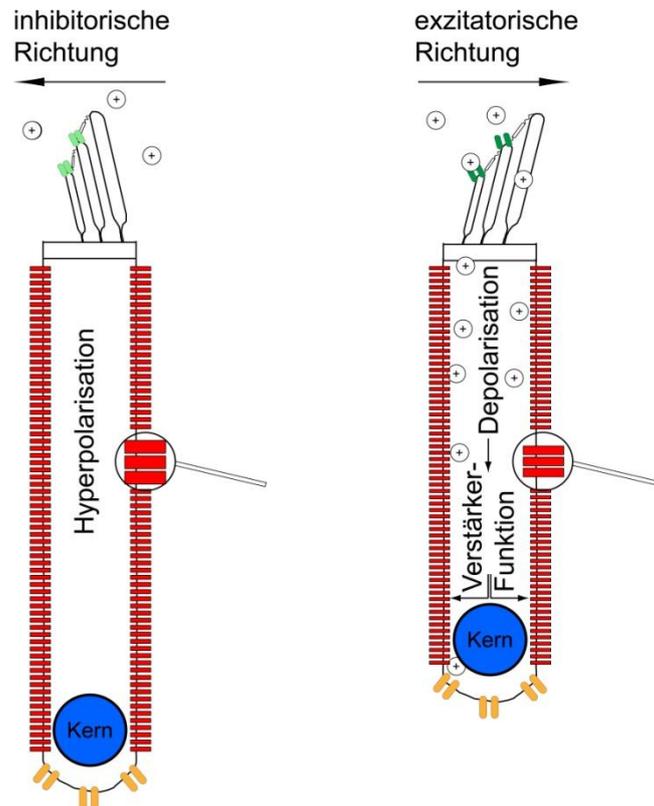


Abb. 5: Spannungsabhängige Konformationsänderungen von Pres vermitteln die zyklischen Längenänderungen der ÄHZ: Pres (symbolisiert durch rote Rechtecke) nimmt bei Hyperpolarisation eine größere Fläche in der Membran ein, bei Depolarisation eine kleinere.

Pres bedient sich als Spannungssensor wahrscheinlich intrazellulärer Anionen wie Chlorid (Oliver et al. 2001; Rybalchenko & Santos-Sacchi 2003; Rybalchenko & Santos-Sacchi 2008; Schaechinger et al. 2011; Song & Santos-Sacchi 2013). Die elektrische Ladung dieser Anionen stattet Pres mit einer mobilen, extrinsischen Sensor-Domäne aus (Santos-Sacchi 1991; Oliver et al. 2001). Hyperpolarisation verursacht die spannungsabhängige Bindung und Translokation der Chlorid-Ionen im Pres-Molekül, Depolarisation deren Dissoziation (Dallos & Fakler 2002). Oliver et al. (2001) befürworten für den Transport der Anionen ein auf der *SLC26*-Transporter-Funktion basierendes Modell (Albert et al. 2007; Schaechinger & Oliver 2007), demgemäß die intrazellulären Anionen durch die Membranpotenzial-Änderungen in einem inkompletten Transport-Zyklus innerhalb des Pres-Moleküls transloziert werden. Es wird vermutet, dass diese Translokationen die Konformationsänderungen im Pres-Molekül induzieren können (Song & Santos-Sacchi 2013).

Die spannungsabhängige Bewegung der Anionen-Ladung durch das elektrisch geladene Feld der Plasmamembran verändert die kapazitiven Eigenschaften der Zelle (Santos-Sacchi 1991; Dallos & Fakler 2002), denn zur linearen Kapazität der Zellmembran addiert sich die durch die Ladungsbewegung hervorgerufene, nicht-linear von der Transmembran-Spannung abhängige Kapazität. Diese nicht-lineare Kapazität (*nonlinear capacitance*, NLC) umschreibt folglich die spannungsabhängige Membrankapazität der ÄHZ (Santos-Sacchi 1991). Grafisch zeigt die NLC

eine glockenförmige Abhängigkeit vom Membranpotenzial. Der Kurvenverlauf spiegelt die Wahrscheinlichkeit der Translokation einer beweglichen Ladung zwischen zwei gegenüberliegenden Positionen in der Zellmembran wider (Dallos & Fakler 2002).

Es ist noch ungeklärt, wie die Konformationsänderungen von Pres auf den Zellkörper der ÄHZ übertragen werden. Einige Studien beschreiben Pres als lateral mobiles, aber nur eingeschränkt frei in der Plasmamembran diffundierendes Molekül (Organ & Raphael 2007; Kamar et al. 2012), das innerhalb der Plasmamembran cholesterol-abhängig fixiert wird (Kamar et al. 2012). Um den Mechanismus aufzuklären, wie ein mobiles Molekül generierte Kräfte auf die ÄHZ transferiert, wiesen Yamashita et al. (2015) mit FRAP-Analysen in *Slc26a5-YFP-knock in*-Mäusen eine limitierte laterale Diffusion *in situ* und in isolierten ÄHZ nach. Weder die Cholesterol-Depletion der ÄHZ mit β MCD noch die Zerstörung des CL mit LatA und Diamid ermöglichten eine erhöhte laterale Mobilität des markierten Pres (Yamashita et al. 2015). Damit ist das CL als alleiniger Regulator der Mobilität von Pres auszuschließen. Salizylat löst in den SSC der ÄHZ eine Bläschen-Bildung aus (Dieler et al. 1991; Pollice & Brownell 1993), wobei die Integrität der ÄHZ erhalten bleibt (Yamashita et al. 2015). Erst die Ko-Applikation von Salizylat und β MCD auf ÄHZ lässt EciS und CL kollabieren und erhöht die laterale Diffusion von Pres (Yamashita et al. 2015). Der dreischichtige Aufbau der lateralen Wand, insbesondere die Integrität des EciS, bestimmt folglich die Mobilität der Proteine der ÄHZ-Plasmamembran maßgeblich. Interaktionen von Pres mit den SSC und dem CL sind für die Kraftübertragung auf den Zellkörper der ÄHZ vermutlich substantiell.

1.2.3 Subzelluläre Lokalisation

Pres liegt in den ÄHZ hoch exprimiert vor. Immunolokalisations-Analysen von Pres zeigen eine subzelluläre Lokalisation entlang der lateralen Plasmamembran der ÄHZ (Belyantseva et al. 2000) von unterhalb der Kutikularplatte bis auf Kernhöhe, jedoch nicht subnuklear am synaptischen Pol (Winter et al. 2006; Abb. 6). Erst aufgrund der Lokalisation von Pres in der lateralen Membran der ÄHZ sind die Konformationsänderungen des Motorproteins auf den Zellkörper übertragbar.

Pres kann bei Ratten mittels Immunzytochemie bereits postnatal in der lateralen Wand der ÄHZ nachgewiesen werden (Belyantseva et al. 2000). Ebenfalls mit Immunfärbungen zeigten Winter et al. (2006) bei neonatalen Mäusen die Lokalisation von Pres in der gesamten baso-lateralen Membran (bis P7). Danach beginnt die Umverteilung in die laterale Membran, die bis P12 den adulten Zustand erreicht (Winter et al. 2006). Die Lokalisation von murinem Pres in der lateralen Membran korreliert zeitlich mit dem Auftreten der Elektromotilität der ÄHZ (Belyantseva et al. 2000).

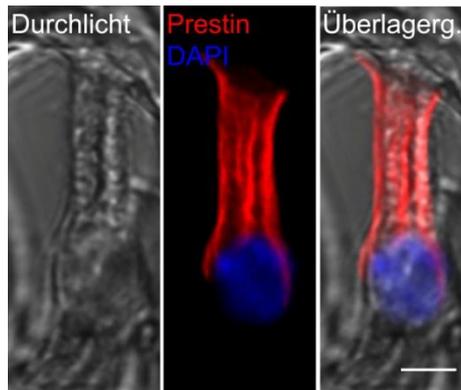


Abb. 6: Pres lokalisiert in den ÄHZ ausschließlich in der lateralen Membran: Die immunhistochemische Färbung von ÄHZ adulter Mäuse (P56) auf Pres (rot) wurde mit den Antikörpern N-20 (sc-22692 von *Santa Cruz Biotechnology*) und Esel- α Ziege-Alexa Fluor 568 (A11057 von *Life Technologies*) durchgeführt; die Kernfärbung (blau) erfolgte mit DAPI. CLSM; Maßstab-Skala: 10 μm (Marlen Dierich)

Die Pres-Dichte in der Plasmamembran hängt von der Lokalisation der ÄHZ entlang der tonotopischen Achse in der Cochlea ab. Apikale, etwas längere ÄHZ, die für die niedrigen Schallfrequenzen zuständig sind, weisen eine geringere ($4000 \mu\text{m}^{-2}$) Pres-Dichte auf als die basalen, kürzeren ($4800 \mu\text{m}^{-2}$) ÄHZ, die die höheren Frequenzen verstärken (Forge 1991; Kalinec et al. 1992; Ashmore 2008; Bai et al. 2010).

1.2.4 Interaktionspartner

1.2.4.1 Homo-Oligomerisierung

Die vorhergesagte Größe eines Pres-Monomers mit 744 Aminosäuren scheint deutlich zu klein, um die in den ÄHZ mittels Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie beobachteten 11 nm Membranprotein-Partikel (Gulley & Reese 1977; Forge 1991) auszubilden.

Zheng et al. (2006) zeigten mit verschiedenen biochemischen Analysen wie einem membranbasierten Hefe-Zwei-Hybrid-System, *Lithium dodecyl sulfate-PAGE*, *Perfluoro-octanoate-PAGE* und chemischem *cross-linking*, dass Pres sowohl in verschiedenen Expressionssystemen (in Hefe und Säugerzellen) als auch in seiner nativen Form in den ÄHZ als stabiles Oligomer höherer Ordnung (vom Monomer bis zum Tetramer) vorliegt. Pres-Homo-Oligomerisierungen zum Tetramer wurden ebenfalls *in vitro* von Navaratnam et al. (2005), Greeson et al. (2006), Wang et al. (2010) und Hallworth & Nichols (2012) erzielt. Rajagopalan et al. (2007) belegten diese Daten ebenfalls und beobachteten weiterhin, dass die Homo-Oligomerisierung von Pres (zumindest in HEK293-Zellen) durch erhöhte Cholesterol-Level begünstigt wird. Es wird aber vermutet, dass die Pres-Oligomerisierung für die Generierung der NLC nicht notwendig ist (Rajagopalan et al. 2010). Eine weitere Regulation der Oligomerisierung erfolgt über die N-Glykosylierung von Pres (Matsuda et al. 2004; Rajagopalan et al. 2010).

Die *gate domain*, die die Helices 5 bis 7 und 12 bis 14 der TMD einschließt, bildet wahrscheinlich die Kontaktzone der Monomeren zum putativen Pres-Dimer (Geertsma et al. 2015).

1.2.4.2 Hetero-Oligomerisierung

Über die Beziehung zwischen der Struktur von Pres und der Funktion als Motorprotein ist sehr wenig bekannt. So ist ungesichert, ob Pres als Hetero-Oligomer vorliegt. Die Identifikation von Interaktionspartnern, die die spezifische Lokalisation von Pres entlang der lateralen Membran der ÄHZ und in den Clustern bei heterologer Expression gewährleisten, ist essentiell, um die Mechanismen der Protein-Funktion zu verstehen.

In einem Hefe-Zwei-Hybrid-*Screening* identifizierten Nagy et al. (2005) den Transkriptionsrepressor *promyelocytic leukemia zinc finger*, PLZF, als Interaktionspartner von Pres. KoIPs und immunhistochemische Studien im nativen System belegen die Wechselwirkung der beiden Proteine (Nagy et al. 2005). Die physiologische Relevanz dieser Interaktion ist noch unklar.

Legendre et al. (2008) analysierten die Komponenten des CL bei Mäusen über Immunfluoreszenz und Konfokal-Mikroskopie. Sie fanden in den ÄHZ die Spektrin-Untereinheiten α II und β V, die direkt mit F-Aktin und dem band 4.1-Protein des CL interagieren. Pres und β V-Spektrin werden postnatal zunehmend in den ÄHZ exprimiert und ab P8 zur lateralen Membran rekrutiert (Legendre et al. 2008). Diese Lokalisation korreliert mit der Reifung der ÄHZ, dem Einsetzen der Elektromotilität sowie der Hörfähigkeit bei Mäusen. In *in vitro binding*-Assays interagiert β V-Spektrin zumindest indirekt mit Pres (Legendre et al. 2008) und wirkt so vermutlich an der Gewährleistung der Elektromotilitätsfunktion mit.

Über *in situ*-Hybridisierungen und Immunfluoreszenz wurden sowohl die mRNA- wie auch die Protein-Expression des *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, CFTR, eines cAMP-aktivierten Chlorid-Kanals in ÄHZ nachgewiesen (Homma et al. 2010). Ko-Immunfärbungen zeigen eine subzelluläre Ko-Lokalisation von CFTR und Pres in der lateralen Membran der ÄHZ. In IPs belegten Homma et al. (2010) eine direkte Interaktion der beiden Proteine. CFTR wirkt als Regulator von Ionen- und Transport-Funktionen (Nilius & Droogmans 2003), einschließlich auf verschiedene Mitglieder der SLC26-Familie wie z.B. PAT1 (SLC26A6), DRA (*down-regulated in adenoma*, SLC26A3) und PDS (*Pendred's syndrome*, SLC26A4) (Ko et al. 2002; Chernova et al. 2003; Ko et al. 2004; Chernova et al. 2005; Simpson et al. 2005). In elektrophysiologischen Messungen erhöhte cAMP-aktiviertes CFTR die NLC und moduliert somit die Pres-Funktion (Homma et al. 2010). Trotz der Vorlage dieser vielfältigen Daten ist die physiologische Relevanz der Interaktion von CFTR mit Pres nicht gesichert.

In einem membran-basierten Hefe-Zwei-Hybrid-Screen einer ÄHZ-spezifischen cDNA-Bibliothek fanden Sengupta et al. (2010) VAPA (*vesicle-associated membrane protein associated protein A*) als weiteren potentiellen Pres-Partner. VAPA wird ubiquitär als integrales Membranprotein exprimiert und ist mit intrazellulären Vesikeln, dem ER und Mikrotubuli assoziiert (Nishimura et al. 1999; Skehel et al. 2000). Bei Säugern ist VAPA in die Regulation von Sterolen und die Lipid-Biosynthese involviert (Wyles et al. 2002; Kawano et al. 2006). Wechselwirkungen von VAPA mit einem Ziel-Protein ermöglichen sowohl dessen effizienten Transport an einen Zielort wie auch eine Beeinflussung der assoziierten Proteinfunktion (Foster et al. 2000). Mit biochemischen Assays im heterologen System wurde eine Interaktion von Pres mit VAPA gesichert (Sengupta et al. 2010). Eine VAPA-Ko-Expression induziert eine höhere Pres-Expression in der Plasmamembran. Auch die endogenen Expressions-Level der beiden Proteine sind miteinander korreliert. Aus diesen Gründen ist VAPA ein Kandidaten-Protein, das am Pres-Transport in den ÄHZ beteiligt sein kann, indem es die Translokation in die Plasmamembran fördert (Sengupta et al. 2010).

2005 entdeckten Orbán-Németh et al. Map1S (*microtubule-associated protein 1S*), ein mikrotubuli- und aktin-bindendes Zytoplasma-Protein. Die leichte Kette von Map1S interagiert *in vivo* mit Mikrotubuli, indem es sie bündelt und stabilisiert. Weiterhin dekoriert Map1S auch Stressfasern über seine C-terminale Aktin-Bindeaktivität (Orbán-Németh et al. 2005; Mohan & John 2015). Über einen Hefe-Zwei-Hybrid-Ansatz und eine KoIP wiesen Bai et al. (2010) eine direkte Interaktion von Nager-Pres mit Map1S nach. Zudem schilderten Bai et al. (2010) eine starke Zunahme von Pres-Proteinen an der Zelloberfläche und eine Verstärkung der elektrophysiologischen Funktion (NLC, Q_{sp}) nach Ko-Expression von Pres und Map1S. Map1S bildet einen mRNA-Expressions-Gradienten entlang der tonotopischen Achse und ko-lokalisiert in den ÄHZ mit Pres (Bai et al. 2010). Aus diesen Daten mutmaßten Bai et al. (2010), dass Map1S am Transport von Pres-Moleküle an die Zelloberfläche beteiligt sein könnte.

Auf der Suche nach Proteinen, die die Restriktion von Pres in der lateralen Plasmamembran regulieren, fanden Cimerman et al. (2013) über die RACE (*rapid amplification of cDNA ends*)-Technik zuerst eine trunkeerte *splice*-Variante von Pres mit 360 Aminosäuren und 40 kDa, die in den ÄHZ mit Pres interagiert. Dieses Pres 9b (*Slc26A5d*) setzten sie anschließend in einem Hefe-Zwei-Hybrid-Ansatz ein, um eine Corti-Organ-cDNA-Bibliothek von Mäusen auf weitere Pres-Interaktionspartner zu testen und identifizierten darüber die kalzium/ calmodulin-abhängige Serin-Proteinkinase CASK. CASK steht in ÄHZ über das band 4.1-Protein in Verbindung mit dem Aktin-Zytoskelett (Cohen et al. 1998). In KoIPs aus nativen Maus-Kochlealysaten interagiert Pres mit CASK und seiner verkürzten Isoform (Cimerman et al. 2013). Die CASK- und Pres-Lokalisation überlappt an der Zell-Zell-Kontaktzone der ÄHZ und Deiter-Stützzellen, in dem engen Bereich, wo Pres-haltige Membran-Bereiche auf Pres-freie Mem-

branen stoßen. CASK und Pres 9b könnten gemeinsam dazu beitragen, die Lokalisation von Pres auf die lateralen Membran der ÄHZ zu begrenzen (Cimerman et al. 2013).

In bioinformatischen und biochemischen Analysen identifizierten Keller et al. (2014) im Bereich des C-Terminus von Pres eine Calmodulin (CaM)-Bindestelle, in den IDRs, den *intrinsically disordered regions*. CaM bindet dort kalzium-abhängig (Keller et al. 2014). Funktionelle Messungen an murinen ÄHZ zeigen, dass die intrazelluläre Applikation von Kalzium eine reversible Verschiebung der NLC in Richtung hyperpolarisierender Potenziale bewirkt. Eine Kalzium-Pres-Bindung könnte die kochleäre Amplifikation direkt beeinflussen oder deren efferente Vermittlung modulieren (Keller et al. 2014).

Spag6 (*sperm-associated antigen 6*) kodiert für ein axonemales Protein, welches ubiquitär in Zellen mit mikrotubuli-basierten Zilien exprimiert wird (Neilson et al. 1999; Sapiro et al. 2002; Zhang et al. 2007). Da Patienten mit Primärer Ziliärer Dyskinesie häufig Einschränkungen der Hörfähigkeit aufweisen (Holzmann et al. 2000), könnten mikrotubuli-assoziierte Gene für die auditorische Funktion essentiell sein. SPAG6 ist im Bereich der Kutikularplatte der ÄHZ lokalisiert und ko-lokalisiert entlang der lateralen Membran mit Pres (Wang et al. 2015). KoIPs von murinen Kochlea-Lysaten zeigen eine Interaktion von Pres mit SPAG6 (Wang et al. 2015). SPAG6 ist somit ein weiterer Kandidat des putativen Pres-Protein-Komplexes und potentieller Regulator der ÄHZ-Funktion (Wang et al. 2015).

Die physiologische Relevanz aller bisher beschriebenen, potentiellen Interaktionspartner von Pres ist bisher nicht oder nur ansatzweise gezeigt.

1.2.4.3 Die kritische Rolle von Cholesterol

Cholesterol stellt einen essentiellen Bestandteil der Plasmamembran der meisten eukaryontischen Zellen dar. Durch Wechselwirkungen mit den Phospholipiden und Sphingolipiden verändert es die biophysikalischen Eigenschaften der Zellmembran. Als Hauptregulator der Fluidität beeinflusst es die laterale und transversale Diffusion von Molekülen innerhalb der Membran.

Cholesterol ist nicht gleichmäßig in der Membran verteilt: Es existieren Mikrodomänen, die sich in ihrem Cholesterol-, Sphingolipid- und Glykolipid-Gehalt sowie ihrer Protein-Zusammensetzung von anderen Membran-Bereichen unterscheiden. Es werden zwei Arten von Membran-Mikrodomänen unterschieden, zu denen Cholesterol einen Lipid-Anteil bis zu 50 % beisteuert (Simons 2000; Pike 2004): planare *lipid rafts* und eingestülpte, omega-förmige Caveolae. In diesen cholesterol-haltigen Membran-Domänen reichern sich u.a. Proteine an, die an Signaltransduktionswegen beteiligt sind (Lisanti et al. 1994; Cheng & Nichols 2015). Die genaue Funktion derartiger Domänen ist noch unbekannt. Wahrscheinlich dienen sie der Kom-

partmentierung zellulärer Prozesse, begünstigen Protein-Protein- sowie Lipid-Protein-Interaktionen und regulieren Protein-Funktionen (Simons & Ikonen 1997; Pike 2003; Lucero & Robbins 2004). Weiterhin werden Funktionen für den makromolekularen Transport, beispielsweise von Cholesterol, und für die Mechanotransduktion angenommen (Cohen et al. 2004).

Die Hauptkomponente der cholesterol-reichen, hochmolekularen Caveolae (Murata et al. 1995) bildet als Oligomer das integrale Membranprotein Caveolin-1 (Cav-1) (Rothberg et al. 1992; Parton & Simons 2007). Caveolae sind 50 bis 100 nm groß (Palade 1953) und existieren in unterschiedlichen Zelltypen. Sie repräsentieren eine morphologisch identifizierbare Subpopulation der *lipid rafts*. Das Cholesterol-Gleichgewicht spielt eine wesentliche Rolle für die Ausbildung und Aufrechterhaltung der Caveolae (Rothberg et al. 1992; Schnitzer 1994; Hailstones et al. 1998): Die Depletion resultiert einerseits in der Abflachung der morphologisch erkennbaren Vertiefungen sowie der Zerstörung ihrer Hülle; andererseits muss das zelluläre Cholesterol-Level einen Grenzwert überschreiten, um Caveolae-Formationen zu ermöglichen (Hailstones et al. 1998). Zudem besteht neben der Stabilisation der Caveolae-Strukturen durch einen Cholesterol-Überschuss (Frank et al. 2002) eine direkte Cholesterol-Modulation der Cav-1-Expression über die Stabilisation des Proteins (Cohen et al. 2004). Über zwei steroid-regulatorische Elemente wird die Expression von Cav-1 auf Transkriptionsebene gesteuert (Bist et al. 1997; Fielding et al. 1997). Somit sind die Expression und die Verteilung von Cav-1 eng mit dem Cholesterol-Gehalt der Zellen verknüpft. Darüber hinaus demonstrierten Graf et al. (1999), dass Cav-1 an der Steuerung des Cholesterol-Levels durch die Regulation von Influx und Efflux beteiligt ist. Caveolae könnten demzufolge die Orte des Cholesterol-Austauschs an der Plasmamembran darstellen.

Mit Immuno-Ko-Lokalisationen und Dekonvolutions-Mikroskopie von Pres-transfizierten HEK-Zellen analysierten Sturm et al. (2007) den intrazellulären Transportweg von Pres. Pres-Moleküle werden durch die Kompartimente des ERs und des Golgi-Apparats weiter in endosomalen und clathrin-bedeckten Vesikeln bis in die Plasmamembran transportiert. Ab 24 h nach der Transfektion bildet Pres in der Plasmamembran eine punkt-förmige Verteilung aus (Sturm et al. 2007; Rajagopalan et al. 2007). Diese definierten, fokalen Pres-Ansammlungen, die Cluster, ko-lokalisieren mit dem Mikrodomänen-Marker Integrin 2α VLA- 2α und mit Cholera-Toxin-B (CTX-B, Sturm et al. 2007). Letzteres bindet das Glykosphingolipid GM1, welches in cholesterol-reichen *lipid rafts* akkumuliert (Ishitsuka et al. 2005). Infolgedessen liegt zumindest ein Teil der Pres-Moleküle in *lipid raft*-Mikrodomänen vor oder lokalisiert in eine andere Population von cholesterol-reichen Membran-Domänen (Sturm et al. 2007).

Zellulär und biochemisch beobachteten Rajagopalan et al. (2010) in Pres-transfizierten HEK-Zellen, dass Pres mit Cav-1 und mit Clathrin-Vesikeln ko-lokalisiert und dass diese Ko-

Lokalisation bei Cholesterol-Überschuss signifikant zu nimmt. Da Cholesterol die Endozytose stimuliert (Deurs et al. 2003; Sharma et al. 2004), wird angenommen, dass Pres einem cholesterol-abhängigen *cycling* unterliegt, das cav- und clathrin-vermittelte Endozytose-Wege nutzt (Rajagopalan et al. 2010).

In Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugationen konnte die Lokalisation von heterolog exprimiertem Pres in Membran-Fractionen mit geringer Dichte gezeigt werden (Sturm et al. 2007; Rajagopalan et al. 2007), die *lipid rafts* und andere detergenzien-unlösliche Membranen enthalten. Diese Fractionen zeichnen sich über die Akkumulation von Membranproteinen, Sphingomyelin und Cholesterol durch einen hohen Anteil an Membran-Mikrodomänen aus (van Meer 1998). Nach der Depletion des Cholesterols mit β MCD, das die *lipid rafts* biochemisch auflöst, verteilt sich Pres in dichteren Fractionen (Sturm et al. 2007; Rajagopalan et al. 2007). Dies zeigt sich zellulär in einer weniger punktierten bis homogenen Verteilung (Rajagopalan et al. 2007). Ein Cholesterol-Überschuss hingegen stabilisiert Pres in den Mikrodomänen-Fractionen und erhöht die Anzahl der Pres-Cluster (Rajagopalan et al. 2007). In Einzelmolekül-Fluoreszenz-Aufzeichnungen Pres-transfizierter HEK-Zellen unterliegt Pres einer beschränkten, cholesterol-abhängigen Diffusion in der Membran (Kamar et al. 2012). Geringe Cholesterol-Level und folglich wenige bis keine cholesterol-reichen Mikrodomänen vermindern diese Beschränkung und erhöhen die Diffusion (Kamar et al. 2012). Die Verteilung von Pres wird folglich durch die Membran-Zusammensetzung, speziell das Cholesterol, moduliert.

Die Cholesterol-Depletion von heterologem und endogenem Pres resultiert funktionell in einer Verschiebung der Spannungsabhängigkeit (V_{pkc}) der NLC in Richtung depolarisierter Potenziale (Sturm et al. 2007). Ein Cholesterol-Überschuss in ÄHZ hingegen verschiebt bei reduzierter Ladungsbewegung (Sfondouris et al. 2008) die Spannungsabhängigkeit in Richtung Hyperpolarisation (Rajagopalan et al. 2007). Canis et al. (2009) zeigten in *Patch clamp*-Messungen an isolierten ÄHZ bei erhöhtem Cholesterol-Level eine dosis-abhängige Reduktion der Pres-vermittelten Motilität. Brownell et al. (2011) untersuchten den Cholesterol-Depletions-Effekt mit Laser-Interferometrie und Konfokal-Mikroskopie auf elektrisch und akustisch ausgelöste Bewegungen an Nager-Kochlea-Präparaten: Unter Cholesterolmangel spiegelt die verstärkte elektro-mechanische Antwort (im Vergleich zur unbehandelten Kochlea) den Anstieg der Elektromotilität der ÄHZ wider, während die passive Mechanik der Kochlea unberührt bleibt (Brownell et al. 2011). Hypercholesterolämie im Tierversuch zieht eine signifikante Anhebung der Hörschwelle bis hin zum Hörverlust nach sich (Morizono & Paparella 1978; Saito et al. 1986; Marcucci et al. 2005; Sikora et al. 2015). Demgegenüber verzögern verminderte Cholesterol-Level einen Hörverlust im Tierversuch (Syka et al. 2007). Die einmalige Injektion von 2-Hydroxypropyl- β -Zyklodextrin (HP β CD) bei Mäusen, einem lipophilen Agens, das den Transport akkumulierten Cholesterols aus den Lysosomen fördert (Davidson et al. 2009; Liu et al.

2010), resultiert in einer dosis-abhängigen und permanenten Erhöhung der ABR-Schwelle über den gesamten Frequenzbereich sowie einer Verminderung der DPOAE-Level (Crumling et al. 2012). Histologische Analysen von HP β CD-behandelten Mäusen zeigen einen Verlust von ÄHZ in der basalen Kochlea. Überlebende ÄHZ im apikalen Bereich weisen eine anormale, für ÄHZ untypische, nicht-uniforme, sondern punktierte Verteilung von Pres auf, die auf eine Dysfunktion der ÄHZ hindeutet (Crumling et al. 2012). Diesen vielfältigen Daten zufolge ist die Funktion von Pres sensitiv gegenüber der Erhöhung und der Verminderung des zellulären Cholesterols.

Die Lipid-Zusammensetzung der Plasmamembran der ÄHZ und der subplasmalemalen Membranen ist bisher wenig erforscht. In unreifen murinen ÄHZ ist das Cholesterol-Level entlang der lateralen Membran hoch, mit der Reifung der Haarzellen und dem Einsetzen der Hörfähigkeit nimmt es ab (Rajagopalan et al. 2007). Cholesterol-Färbungen von Santi et al. (1994), Nguyen & Brownell (1998) und Oghalai et al. (1998) an adulten ÄHZ demonstrierten einheitlich, dass entlang der lateralen Membran weniger Cholesterol vorhanden ist als im basalen und apikalen Bereich der ÄHZ. Der für Säuger ungewöhnlich niedrige Cholesterol-Spiegel der ÄHZ könnte mit der funktionellen Regulation des Motorproteins in Verbindung stehen.

1.3 Fragestellung und Zielsetzung

Erst durch die Lokalisation in der lateralen ÄHZ-Membran ist die räumliche Übertragung der Konformationsänderungen von Pres während der somatischen Motilität möglich. Wie genau die Längenänderungen des Motorproteins auf den gesamten Zellkörper übertragen werden, ist aktuell nicht aufgeklärt. Es wird angenommen, dass Pres aufgrund seiner funktionellen Eigenschaften für seine Aktivität als elektro-mechanischer Wandler in den ÄHZ nach dem *area motor*-Modell (Iwasa 2001; Dallos & Fakler 2002) keine zusätzlichen haarzell-spezifischen Komponenten benötigt. Eine Beteiligung von membran-assoziierten Strukturen ist aber wahrscheinlich. Um die Zusammenhänge von Lokalisation und Funktion von Pres in den ÄHZ und somit den Mechanismus der Elektromotilität besser verstehen zu können, muss die subzelluläre Lokalisation von Pres detailliert beschrieben werden.

Trotz der enormen endogenen Expressionsmengen von Pres in den ÄHZ ist es methodisch bisher nicht möglich, Pres für biochemische Experimente in ausreichend großen Mengen aus den ÄHZ zu isolieren. Des Weiteren gelten die ÄHZ als schwer manipulierbar und kaum transfizierbar. Wird Säuger-Pres heterolog in verschiedenen Säugerzell-Linien exprimiert, so synthetisieren und exprimieren sie Pres (Matsuda et al. 2004). Die heterologe Expression von Pres bietet somit die schnelle und einfache Möglichkeit, die auf dem Motorprotein basierenden, charakteristischen Eigenschaften der ÄHZ auf Kultur-Säugerzellen zu übertragen (Zheng et al. 2000; Oliver et al. 2001, Ludwig et al. 2001; Santos-Sacchi et al. 2001).

Die vorliegende Arbeit sollte nun dazu beitragen, die molekulare Zusammensetzung der Plasmamembran-Domäne mit Pres im heterologen Expressionssystem näher zu analysieren. Um von den Eigenschaften dieser Pres-Cluster im heterologen System schließlich auf die Charakteristika der Pres-Domäne in den ÄHZ zu schließen, sollten die lokalisations-beeinflussenden Eigenschaften sowohl seitens des Pres-Proteins und der Plasmamembran erfasst wie auch Pres-assoziierte Proteine identifiziert werden.

Zunächst sollten die drei Pres-Orthologen aus Ratte, Zebrafisch und Huhn auf ihre Verteilung als GFP-Fusionsproteine in Säuger-Zellkulturen mittels hoch auflösender Fluoreszenz-Mikroskopie analysiert werden. Die subzelluläre Lokalisation der Cluster (Sturm et al. 2007; Rajagopalan et al. 2007; Schaechinger & Oliver 2007) des Ratten und Zebrafisch-Orthologen sowie deren Form und Größe sollten beschrieben werden. Sturm et al. (2007) zeigten bereits, dass die Pres-Cluster (der Mongolischen Rennmaus) cholesterol-reiche Membran-Domänen darstellen, die mit Mikrodomänen-Markern ko-lokalisieren (Sturm et al. 2007). So war fraglich, ob Pres in *lipid raft*-Mikrodomänen oder in anderen spezialisierten Populationen von Mikrodomänen lokalisiert ist. Es sollte durch Ko-Expression der Orthologen herausgearbeitet werden, ob die verschiedenen Pres-Orthologen eine gemeinsame Membran-Domäne besiedeln. Um molekulare Determinanten des Clustering-Verhaltens zu identifizieren, sollten anschließend Chimären aus cluster-formierendem rPres und nicht-clusterndem cPres kloniert werden. Diese sollten mittels Konfokal-Mikroskopie und TIRFM dahingehend untersucht werden, ob die besondere Eigenschaft des Clustering aus intrinsischen Eigenschaften des Pres-Proteins resultiert und welche Domäne oder welcher Terminus von Pres diese bedingt. Außerdem sollte analysiert werden, durch welche biophysikalischen Eigenschaften der Plasmamembran das Verteilungsverhalten von Pres mitbestimmt wird: Eine mutmaßliche Abhängigkeit von der Membranzusammensetzung, insbesondere dem Cholesterolgehalt, und der Temperatur sollten eingehend überprüft und charakterisiert werden. Da die laterale Diffusion von Pres geringer ist als die von frei diffundierenden Proteinen (Organ & Raphael 2007), gestalten vermutlich intermolekulare Wechselwirkungen die Pres-Domäne mit. Zusätzlich sollte deshalb der Frage nachgegangen werden, durch welche Protein-Wechselwirkungen die Pres-Cluster reguliert werden. Die fluoreszenz-markierten Kandidaten-Proteine Cav-1, Aktin und Map1S sollten konfokalmikroskopisch gemeinsam mit Pres-GFP dargestellt werden. Die Pres-ko-lokalisierenden Proteine sollten weiterführend mit biochemischen Verfahren auf eine Protein-Protein-Interaktion mit Pres getestet werden. Dabei sollte die Rolle des zellulären Cholesterols für die Interaktion herausgearbeitet werden.

Diese Arbeit soll dazu beitragen, die genauen Lokalisationsmechanismen des Motorproteins der ÄHZ zu identifizieren, um dadurch einen zentralen Aspekt der molekularen Funktionsweise des Hörvorgangs zu verstehen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Zellkultur

2.1.1 Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Zelllinien verwendet:

- CHO (*chinese hamster ovary*)-Zellen
- HEK293 (*human embryonic kidney*)-Zellen (auch als HEK-Zellen bezeichnet)
- HEK293-Zelllinie mit stabiler Wanderratten (*Rattus norvegicus*)-Pres-GFP-Expression (rPresHEK)
- HEK293-Zelllinie mit stabiler Hühner (*Gallus gallus*)-Pres-GFP-Expression (cPresHEK)
- HepG2 (*human liver hepatocellular carcinoma cells*): humane hepatozelluläre Krebszelllinie überlassen von Dr. Pietro Di Fazio (Universität Marburg, Institut für Chirurgische Forschung, Marburg, Deutschland)
- Wildtyp-MEFs (*mouse embryonic fibroblasts*): Mausembryofibroblasten; genetischer Hintergrund C57BL/6
- Cav-1-*knock out*-MEFs: Exon 1 und 2 von Cav-1 dieser Mäuse sind homozygot durch eine Neomycin-Kassette disruptiert. Die für die terminierten Verpaarungen angesetzten Elterntiere wurden von Prof. Dr. med. Joachim Hoyer und PD Dr. med. Ivica Grgic (Universitätsklinikum Gießen-Marburg GmbH, Nephrologie, Marburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt (genetischer Hintergrund C57BL/6).

2.1.2 Durchführung der Zellkultur-Arbeiten

Alle Zellkulturarbeiten wurden aseptisch an einer sterilen Werkbank (*Thermo Scientific Clean Air DLF/ REC 4 KL 2A*) mit laminarem Luftstrom durchgeführt. Vor Arbeitsbeginn wurde diese mit dem Flächen-Desinfektionsmittel *Terralin liquid* (*Schülke & Mayr*) oder mit 70 % igem Ethanol (vergällt mit 1% MEK, Krankenhausapotheke des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg) desinfiziert, ebenso wie sämtliche Materialien, die in der Werkbank eingesetzt wurden. Verbrauchsmaterialien und verwendete Puffer, die nicht bereits keimfrei geliefert wurden, sterilisierte man durch Autoklavieren bei 121° C für 20 min (*Tuttnauer 3150 ELV*).

Die Lagerung der Nährmedien, Lösungen und Puffer erfolgte bei 4 bis 8° C. Vor der Verwendung wurden sie auf zirka 37° C erwärmt (Kleinbrutschrank *Heraeus B15*).

Das Zellwachstum wurde regelmäßig mit einem Lichtmikroskop (*Olympus CKX41*) überprüft. Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte im Brutschrank (*Heracell 150i*) bei 37° C in einer wasserdampf-gesättigten, 5%igen CO₂-Atmosphäre. Die Zellen wurden kurzfristig bei -80° C oder langfristig in flüssigem Stickstoff bei -196° C gelagert. Nach etwa 60 Passagen wurden die Zellen verworfen und durch frisch aufgetaute ersetzt.

2.1.3 Auftauen von Zellen

Für die Kultivierung erfolgte der Auftauprozess von Zellsuspensionen zügig, da das im Einfriermedium enthaltene DMSO bei Metabolisierung toxisch wirkt. Das Auftauen im Einfrierrohrchen (*Sarstedt Cryo Pure*, 1,8 ml, 72.379.992) fand im 37° C-Wasserbad (*GFL, Typ 1003*) statt. Das Röhrchen wurde vor dem Öffnen mit 70 % igem Ethanol sterilisiert. Anschließend wurde die Zellsuspension sofort in ein *Falcon*-Röhrchen (*Greiner bio-one, Cellstar tubes* 15 ml, 188.161) mit 10 ml kaltem, zelllinien-spezifischem Medium überführt und resuspendiert. Diese Suspension wurde nun bei 1200 rpm für 2 min zentrifugiert (*Thermo Scientific/ Heraeus Megafuge 2.0*). Den Überstand saugte man ab, um das DMSO des Einfriermediums zu entfernen. Das Zellpellet wurde anschließend in 1 ml frischem, zelllinien-spezifischem Medium aufgenommen und entsprechend der gewünschten Konzentration in Zellkultur-Schalen oder -Flaschen ausgesät. 24 h nach dem Auftauen fand üblicherweise ein Mediumwechsel statt, um nicht angewachsene Zellen und deren Reste zu beseitigen.

2.1.4 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren wurden i.d.R. konfluent gewachsene Zellkultur-Schalen oder -Flaschen genutzt. Vorbereitend wurden die Einfrierrohrchen beschriftet (Zelltyp, Passage, Genotyp, Datum) und mit je 1 ml Einfriermedium (*Gibco/ Invitrogen, Recovery Cell Culture Freezing Medium*, 12648-010, 50 ml, enthält 10 % DMSO, um die Eiskristallbildung während des Einfrierprozesses zu verhindern) auf Eis vorgekühlt.

Die einzufrierende Zellkultur wurde mit PBS gewaschen. Dann folgten das Trypsinieren (siehe 2.1.5) unter mikroskopischer Beobachtung sowie das Abstoppen der Reaktion mit Vollmedium. Die Zellen pelletierte man für 2 min bei 1200 rpm. Das Zellpellet wurde nun in die vorbereiteten Einfrierrohrchen aufgenommen und vorsichtig gemischt. Zum Einfrieren wurden die Röhrchen in einen Einfrierbehälter (*Nalgene Cryo-1° C-Freezing Container*, 5100-0001, gefüllt mit 250 ml Isopropanol) gestellt und für 48 h zu -80° C heruntergekühlt. Hernach wurden die Zellen zur langfristigen Lagerung in einen Tank (*Thermo Scientific Locator 8 Plus*) mit flüssigem Stickstoff (*Linde CRYO-Service, Linde Gas Deutschland*) überführt.

2.1.5 Kultivierung von Zelllinien

2.1.5.1 Standard-Protokoll für die CHO-Zelllinie

Bei den CHO-Zellen handelt es sich um eine aus einer Primärkultur von Ovarien des Chinesischen Hamsters (*Cricetulus griseus*) isolierte immortale Zelllinie. Sie wächst als Monolayer, weil ein Übereinanderwachsen benachbarter Zellen aufgrund von Kontaktinhibition blockiert wird. Interphase-Zellen sind spindelförmig und unterscheiden sich von runden, mitotischen Zellen. Ein optimales Wachstum findet bei 36° bis 38° C und einem pH-Wert von 7 im Kulturmedium statt. Die Dauer eines Zellzyklus beträgt zirka 14 h. Die Subkultivierung erfolgte alle drei Tage, wenn die Bodenfläche des Kulturgefäßes konfluent mit Zellen bedeckt war.

Für die Kultivierung der CHO-Zellen wurden folgende Lösungen benötigt:

- Medium: Das Vollmedium wurde jeweils vor dem Arbeiten frisch (alle 4 bis maximal 8 Wochen) angesetzt und bestand aus *MEM-alpha*-Medium (22571-020, *Gibco by Life Technologies*) mit 10 % fötalem Kälberserum (*Fetal Bovine Serum*, *Biochrome*, S0115, Lot. 0735A), 1 % Penizillin/ Streptomycin (10.000 U/ ml Pen, 10.000 µg/ ml Strep, 15140-122, *Gibco by Life Technologies*).
- PBS: (*Phosphate Buffered Saline*, *1x Dulbeccos Phosphate Buffered Saline*, -CaCl₂, -MgCl₂, 14190-094, *Gibco by Life Technologies*) ist eine phosphat-gepufferte Salzlösung ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ mit einer Osmolarität von 270 - 310 mOsm/ kg. Durch verschiedene Salze hat die Lösung den osmotischen Druck von Säugerzellen (isotonische Salzlösung).
- Trypsin/ EDTA (Ethylen-diamin-tetra-azetat)-Lösung (0,5 % *Trypsin-EDTA* (10x), 15400-054, *Gibco by Life Technologies*): Die Arbeitslösung enthält 0,25 % Trypsin (2 ml 10x 0,5 % Trypsin + 18 ml 1x PBS) und EDTA als Chelator. Trypsin dient der Dissoziation der Zellen vom Substrat und voneinander.

Die Subkultivierung umfasst folgende Arbeitsschritte:

Die zu subkultivierende Zellkultur wurde makroskopisch und mikroskopisch beurteilt (*Olympus CKX41* mit folgenden Objektiven: 1. *A10PL* 10x, 0,25; 2. *LCAchN* 20x, 0,40 PhP; 3. *LCAchN* 40x, 55PhP). Das verbrauchte Medium wurde anschließend mit Hilfe einer Pasteur-Pipette (4522, *Roth*) abgesaugt. Der Zell-Monolayer wurde mit 5 ml 1x PBS waschen. Währenddessen bereitete man die frischen Kulturflaschen vor, beschriftete diese mit Zelltyp, Passage, Genotyp und Datum. Nun wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin-Arbeitslösung überschichtet und damit für ≈2 min bei 37° C inkubiert. Unter dem Mikroskop sollte kontrolliert werden, ob sich alle Zellen abgelöst hatten. Anschließend stoppte man die Trypsinierung durch Zugabe von 8 ml Vollmedium ab Diese 10 ml Zellsuspension gab man in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen, um sie für 2 min

bei 1200 rpm abzentrifugieren (RT). In der Zwischenzeit legte man frisches Medium (12 ml) in zwei sterile 75cm²-Kulturflaschen vor. Der Überstand aus der Trypsin-Medium-Lösung wurde abgesaugt und die Zellen in 1 ml frischem Vollmedium behutsam resuspendiert. Von der CHO-Zellsuspension wurden einmal 60 µl (1:15) und einmal 30 µl (1:30) in die vorbereiteten Kulturflaschen gegeben. Die Zellen schwenkte man vorsichtig im Medium, um sie auf dem Flaschenboden gleichmäßig zu verteilen.

2.1.5.2 HEK293-Zelllinie

HEK293-Zellen gehen auf eine humane embryonale Nierenzelllinie zurück, die als Transformationsprodukt mit DNA des menschlichen Adenovirus 5 geschaffen wurde. HEK-293 sind adherent wachsende, hypotriploide Zellen mit epithelialer Morphologie. Die Kultivierung der HEK293-Zelllinie erfolgte nach dem Standard-Protokoll (2.1.5.1) in folgendem Vollmedium:

- Medium: DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium with high D-Glucose (4500 mg/ l) + GlutaMAX supplement - Natriumpyruvat*, 61965-026, *Gibco by Life Technologies*). Diesem Basalmedium wurden folgende Zusätze zugefügt: 10 % fötales Kälberserum, 1 % Penizillin/ Streptomycin, 1% MEM NEA (*Minimum Essential Medium Non-Essential Amino Acids Solution 100x*, 11140-035, *Gibco by Life Technologies*) und 1 % Natriumpyruvat (*Sodium Pyruvat 100mM, 100x, Gibco by Life Technologies 11360-039*).

HEK293-Zellen wurden bei 60 bis 80 % Subkonfluenz zweimal wöchentlich 1:8 und 1:16 gesplittet. Hierbei galt zu beachten, dass diese Zelllinie nur nach Beschichtung mit Poly-D-Lysin auf Glasoberflächen (z.B. Glasboden-Schälchen für die TIRFM oder Glas-Deckgläschen für die CLSM) wächst.

Beschichtung (*coaten*) von Glasoberflächen für HEK293-Zellen mit Poly-D-Lysin:

Das *coaten* mit synthetischem PDL (*Poly-D-Lysine hydrobromide, Sigma, P0899-50MG*; 10 ml *Aqua dest.* zugeben, lösen lassen, steril filtrieren und Aliquots mit 5 mg/ ml bei -20° C einfrieren) schafft an jeder Aminogruppe des Lysins eine positive Ladung im Zellkultur-Medium, die die Glasoberfläche dadurch hydrophiler wirken lässt und die Adhäsion der HEK-293-Zellen erleichtert.

Pro 3cm-Schälchen wurden 40 µl PDL-Stock (5 mg/ ml) in 2 ml Borat-Puffer (1,55 g Borsäure (*Sigma B6768-500G*) und 2,375 g Natrium-Tetraborat-Decahydrat (*Borax, Fluka 72002*) in 500 ml *Aqua dest.* gelöst, der pH auf 8.4 eingestellt, steril filtriert und bei 4° C aufbewahrt) verdünnt. Diese Lösung gab man auf die zu *coatende* Oberfläche und inkubierte sie für 30 min bei 37° C im Zellkultur-Inkubator. Im Anschluss wurde das Schälchen 3 Mal mit sterilem Wasser

gewaschen und bis zur weiteren Verwendung mit Medium versehen. Bis maximal eine Woche können beschichtete Schälchen im Inkubator aufbewahrt werden.

2.1.5.3 Stabile rPres-HEK293-Zelllinie/ Stabile cPres-HEK293-Zelllinie

Die Zelllinien mit stabiler Transfektion des Pres-Orthologen aus Wanderratte (*Rattus norvegicus*, rPres, GeneBank-Zugangsnummer: NM_030840) bzw. aus Huhn (*Gallus gallus*, cPres, GeneBank-Zugangsnummer: EF028087) wurden zur Verfügung gestellt.

Die Kultivierung lehnte sich an die der HEK293-Zellen an. Nur zur Selektion der Zellen, die das Pres-GFP-Fusionsprotein stabil exprimierten, wurde dem HEK293-Vollmedium Genetizin (*Gibco by Life Technologies* 10131-019, 50 mg/ ml; 1,6 ml pro 100 ml Vollmedium → 0,8 mg/ ml, 4° C) zugesetzt. Das Aminoglykosid Genetizin, ein Analogon zu Neomycin, beeinträchtigt bei Eukaryonten die Proteinbiosynthese: Es bindet an die ribosomale 80S-Einheit und behindert so die Elongation während der Translation. In genetizin-haltigem Medium ermöglichte die Expression eines Genetizin-Resistenzgens (*Neo*®) gemeinsam mit Pres-GFP die Selektion der stabil exprimierenden Zellen. Das *Neo*®-Resistenzgen kodiert für Aminoglykosid-Phosphotransferasen, die Genetizin intrazellulär an Hydroxylgruppen phosphorylieren und damit inaktivieren.

Da Genetizin begrenzt stabil ist, wurde genetizin-haltiges Medium maximal 10 Tage genutzt. Die Subkultivierung der beiden stabilen Zelllinien erfolgte zweimal wöchentlich mit einer Ratio von 1:12 und 1:6. Die Expression der Pres-GFP-Orthologen wurde regelmäßig unter einer UV-Lampe (*Olympus U-RFL-T*) mikroskopisch kontrolliert.

2.1.5.4 HepG2-Zelllinie

Bei den HepG2s handelt es sich um adhärenz Zellen mit epitheloider Morphologie, die größtenteils als Monolayer wachsen. Sie wurden aus einem Patienten mit Hepatoblastom isoliert und etabliert (Aden et al. 1979). Fujimoto et al. (2000) zeigte, dass diese Zelllinie über keine endogene Cav-1-, -2- und -3-Expression verfügt.

HepG2-Zellen erhielten ein Vollmedium bestehend aus:

- RPMI Medium 1640 (*Roswell Park Memorial Institute, Gibco by Life Technologies, +L-Glutamine*, 21875-034), 10 % fötales Kälberserum, 1 mM Natriumpyruvat, 1 % Penicillin/ Streptomycin, 40 mg/ l Gentamycin (*Roth*, 0233.4, 0,02g in 500 ml Medium) und 1 % MEM NEA.

Abzutrypsinierende Zellen wurden zum Ablösen in der Flasche nicht angeklopft, da dies zum Verklumpen und folglich zu ungleichmäßigem Wachstum führte. Die Subkultivierung mit einer Ratio von 1:4 bis 1:6 erfolgte nach dem Standard-Protokoll (2.1.5.1).

2.1.5.5 Wildtyp- (WT-MEFs) und Cav-1-knock out-Mausembryofibroblasten (Cav-1^{-/-}-MEFs)

Mausembryofibroblasten (MEFs) stellen eine morphologisch heterogene Zellkultur mesenchymaler Herkunft dar, die sich durch unterschiedlich viele zytoplasmatische Ausläufer, einen elliptisch geformten, gesprenkelten Zellkern und ein ausgeprägtes raues ER charakterisiert.

Um die Auswirkungen des Cav-1-knock outs bezüglich der Pres-Lokalisation aufzudecken, wurden MEFs aus trächtigen Cav-1^{-/-}-Weibchen präpariert. Exon 1 und 2 von Cav-1 waren homozygot durch eine Neomycin-Kassette disruptiert.

Terminierte Verpaarungen von Cav-1-knock out-Mäusen

1 bis 3 weibliche adulte Cav-1-knock out-Mäuse (idealerweise im Alter von 8 Wochen bis zirka 7 Monaten) wurden in den Käfig eines adulten Mausbocks (ebenfalls Cav-1^{-/-}) zur terminierten Verpaarung gesetzt. Morgens wurde täglich eine *copulation plug*-Kontrolle der Weibchen durchgeführt. Zur vergleichenden Kontrolle wurden Wildtyp-Mäuse mit gleichem genetischem Hintergrund (C57BL/6) zur Verpaarung angesetzt. Da sich Mäuse in der Mitte der dunklen Periode paaren, entspricht ein vorhandener *plug* Tag 0,5 nach der Empfängnis. Der gelblich-weißliche *plug* verschließt die Vagina und fällt im Laufe des Tages ab. Als optimaler Zeitpunkt für die MEF-Präparation wurde Tag 13 bis 14 nach der Empfängnis gewählt: als Kompromiss zwischen Embryogröße (Ausbeute an Zellen) und der Ausbildung von festen embryonalen Geweben, die später die komplette Dissoziation des Embros behindern.

Töten der trächtigen Weibchen

Die trächtigen Weibchen zeigten an Tag 13 bis 14 nach der Empfängnis einen dicken Bauch. Die Mäuse wurden zur Betäubung in ein 3l-Becherglas gesetzt, welches ein Papiertuch mit wenigen Tropfen (zirka 500 µl) Isofluran (*Forene®*, Abbvie Deutschland GmbH & Co. KG, B506) enthielt. Nachdem die Tiere das Bewusstsein verloren hatten, wurden sie durch Zervikal-Dislokation getötet. Anschließend wurde die Maus in 500 ml 70% Ethanol kurzzeitig sterilisiert und unter der Sterilbank platziert.

Entnahme der Embryonen

Vor der Präparation wurden 2 große Pinzetten, 4 Präzisionspinzetten, ein Skalpell und 4 Präparationsscheren (*Fine Science Tools*) in Aluminiumfolie (*Roth 2596.1*) verpackt und für 12 h bei

180° C ausgebacken (Backofen: *Memmert UNB 200*). Weiterhin wurden ein Becher mit 70 % igem Ethanol für die Maus-Sterilisation und 8 bis 10 sterile 10cm-Zellkultur-Schalen mit mindestens 30 ml sterilem PBS vorbereitet, um die Uteri zu waschen und komplett zu bedecken. Weiterhin wurde ein Mikroskop (*Olympus SZX7*) unter der Sterilbank platziert.

Zunächst wurde die Bauchhaut mit zwei Pinzetten aufgerissen. Die Bauchwand wurde mit einer frischen Pinzette möglichst hoch angehoben, um den Bauchraum zu eröffnen. Dieser Schnitt wurde zu beiden Seiten von *posterior* nach *anterior* vergrößert. Der jetzt sichtbare zwei-hörnige Uterus mit den Embryonen wurde mittig mit einer Pinzette leicht hoch genommen und jeweils zwischen Ovar und erster Implantationsstelle an beiden Enden abgetrennt. Zur Entfernung von Fettgewebe und Blutgefäßen wurde je ein Horn des Uterus in eine mit PBS gefüllte Zellkultur-Schale gelegt. Dabei wurde beachtet, dass das komplette Organ mit Flüssigkeit bedeckt war. Die Embryonen überleben in den Uteri für zirka weitere 30 min, was am Herzschlag beurteilt werden kann. Die Uteri wurden jeweils in ein frisches Schälchen mit PBS überführt. Dort wurde unter Zuhilfenahme zweier Präzisionspinzetten ein Uterushorn vorsichtig durch mehrfaches, kurzes Ziehen geöffnet: Die Angriffspunkte der beiden Pinzetten sollten unbedingt sehr nah beieinander liegen. Die Embryonen durften keinesfalls durch explosionsartiges Eröffnen des Uterus beschädigt werden. Nacheinander wurde jede deziduale Schwellung aus dem Uterus entfernt und in ein separates Schälchen mit PBS überführt. Die den Embryo umgebende Membran wurde dann entfernt und in ein steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Dieser Dottersack konnte als Ausgangsmaterial zur Genotypisierung genutzt werden, da dieses Gewebe rein embryonalen Ursprungs ist.

Isolation der Fibroblasten aus den Mausembryonen

Die MEFs wurden in folgendem Medium kultiviert:

- MEF-Voll-Medium: 500 ml DMEM-Basalmedium mit 4500 mg/ l Glukose (- Natriumpyruvat) wurden 10 % fötalem Kälberserum, 1 % Penizillin/ Streptomycin und 1 % L-Glutamin zugesetzt.

Nachdem jeder einzelne Embryo in ein frisches Schälchen mit PBS überführt wurde, entfernte man den Kopf mittels Skalpell. Dunkelrote Organe wie das Herz und die Leber, die im Wesentlichen keine Fibroblasten enthalten, wurden mit einer Pinzette ventral aus dem Embryo herausgezogen. Die Überreste wurden in eine 6 cm-Zellkultur-Schale mit PBS überführt. Dort wurden sie mit Hilfe eines Skalpells sehr fein zerkleinert, bis sie mit einer serologischen Pipette pipetierbar waren. Nachdem die Fragmente sedimentiert waren, wusch man zweimal mit PBS in einem 50 ml-Falcon. Die Gewebestückchen wurden dann mit 1 ml Trypsin/ EDTA pro Embryo-Äquivalent 30 min bei 37° C und leichtem Schwenken inkubiert, um eine Zellsuspension zu

erhalten. Der Trypsin-Verdau wurde durch die Zugabe von 6 ml MEF-Medium gestoppt. Unverdaute Gewebestückchen wurden durch Auf- und Abpipettieren gelöst. Nach erneuter Sedimentation wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Die Zellen eines Embryo-Äquivalents wurden in 20 ml warmem MEF-Medium resuspendiert und in einer 15 cm-Zellkultur-Schale bei 37° C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Die embryonalen Fibroblasten waren im Wesentlichen der einzige Zelltyp, der auf den Zellkultur-Schalen haften blieb. Die übrigen Zellen konnten durch einen Mediumwechsel am Folgetag entfernt werden. Sobald diese Zellkultur-Schalen nach wenigen Tagen konfluent bewachsen waren (Passage 0-Zellen), wurden die Fibroblasten 1:3 gesplittet. Diese expandierten Fibroblasten (je Embryo 3 15cm-Schalen, Passage 1) wurden nach Erreichen der Konfluenz eingefroren oder experimentell eingesetzt.

Expansion der Fibroblasten

Für die MEFs ist es bedeutend, dass sie nicht subkonfluent gesplittet werden, da ein Wachstum bei geringer Dichte die Proliferation enorm vermindert. Die konfluente P0-Fibroblasten-Kultur wurde vorsichtig mit PBS gewaschen und anschließend mit 3 ml Trypsin/ EDTA für max. 1 min unter leichtem Schwenken inkubiert. Die Trypsinierung wurde sofort mit MEF-Vollmedium abgestoppt. Die Suspension zentrifugierte man nun für 2 min bei 1200 rpm (RT) und verwarf den Überstand. Das Zellpellet nahm man in 1 ml Medium auf. Ein Drittel davon wurde auf eine frische 15 cm-Schale mit 20 ml MEF-Medium verteilt und im Brutschrank inkubiert. Diese Passage-1-Zellen wurden entweder nach Erreichen der Konfluenz eingefroren (3 Einfrierröhrchen pro 15 cm-Schale) oder für die Transfektion subkultiviert.

2.1.6 Transfektion von Zellkulturzellen

In der Zellbiologie versteht man unter Transfektion das Einbringen von fremder DNA oder RNA in eukaryontische Zellen. Dabei unterscheidet man die transiente Transfektion vom stabilen Einbau ins Wirtsgenom. Eingeschleuste Fremd-DNA wird üblicherweise zügig abgebaut, nach dem Einbau in die Wirts-DNA wird dies unterbunden. Es gibt eine Vielzahl an Transfektionsmethoden. Je nach Zelltyp muss die geeignete gefunden werden. Grundsätzlich unterscheidet man chemische, physikalische und virus-basierte Verfahren.

In dieser Arbeit wurden Zellen mittels chemischer Transfektion behandelt. Hierbei wird die DNA komplexiert, deren negative Ladung (durch Phosphatreste) abgeschirmt und schließlich endozytotisch aufgenommen. Klassische Kalzium-Phosphat-Transfektion wie auch Diethylaminoethyl-dextran (DEAE)-vermittelte Verfahren finden häufig Anwendung; in der vorliegenden Arbeit wurden liposomal-basierte wie auch rezeptor-vermittelte Transfektionen durchgeführt.

2.1.6.1 Liposomale Transfektion

Mittels liposomaler Transfektion, auch Lipofektion genannt, kann genetisches Material durch Bindung an bzw. Einschluss in Liposomen in Zellen gebracht werden. Die negativ geladene Plasmid-DNA bindet an positiv geladene Liposomen: Es entstehen DNA-Lipid-Komplexe, die mit der Membran fusionieren und von der Zelle endozytotisch aufgenommen werden. Regulär nutzt diese Form der Transfektion positiv geladene liposomen-bildende Substanzen, die in Verbindung mit Membranlipiden wie Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin und Cholesterol eingesetzt werden. Die Vorteile dieser Methode liegen in der hohen Effektivität bei sehr vielen Zelllinien, der vergleichsweise geringen Toxizität sowie der einfachen Handhabung.

In dieser Arbeit wurde das Reagenz *Lipofectamine 2000* der Firma *Invitrogen* (11668-019) verwendet, um die MEFs, die HepG2-Zellen wie auch alle verwendeten HEK-Zelllinien zu transfizieren.

Lipofectamine 2000-Transfektion

- Transfektionsmedium: DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) *high Glucose* (4500 mg/l) + *GlutaMAX supplement* mit 10 % fötalem Kälberserum, 1 % MEM NEA, und (je nach Zelllinie +/- 1 % Natriumpyruvat); ohne Antibiotikum

Bei Erreichen von 60 bis 70 % Konfluenz (zirka 48 h nach Subkultivierung) wurde die Transfektion durchgeführt. Dafür erfolgte zuerst ein vorsichtiger Waschschriff der Zellen mit PBS. Danach erhielten die Zellen das Transfektionsmedium für mindestens 2 h. Nun konnte der Transfektionsmix je nach Größe der Zellkulturschale angesetzt werden:

- 3 cm-Schale: 1) 4 µg DNA + 100 µl *Opti-MEM*
 2) 10 µl *Lipofectamine 2000* + 100 µl *Opti-MEM*
- 6 cm-Schale: 1) 10-15 µg DNA + 250 µl *Opti-MEM*
 2) 15 µl *Lipofectamine 2000* + 250 µl *Opti-MEM*

Hierfür wurden pro Ansatz die entsprechende Menge Plasmid-DNA in *Opti-MEM I reduced serum medium* (*Gibco by Life Technologies* 31985-047) verdünnt. In einem separaten Reaktionsgefäß wurde das Transfektionsreagenz *Lipofectamine 2000* ebenfalls in *Opti-MEM* gelöst. Die verdünnte DNA wurde nun zum Transfektionsreagenz gegeben und sehr vorsichtig gemischt. Zur Ausbildung der DNA-Lipid-Komplexe ließ man den Ansatz für 5 bis 10 min bei RT unter der Sterilbank inkubieren. Folgend gab man die Komplexe sacht an den Rand der Zellkultur-Schale mit den Zellen und schwenkte dieses behutsam, um die Komplexe im Medium zu verteilen. Nach weiteren 3 h wurden die Zellen wieder auf ihr adäquates Vollmedium (mit Antibiotikum) gesetzt. Nach 24 bis 48 h konnten die Zellen geerntet oder für die Mikroskopie genutzt werden.

2.1.6.2 Transfektion mittels linearer Polyethylenimin-Derivate

Weiterhin wurde die Transfektion anhand kationischer Polymere genutzt: Ein einfaches und vergleichsweise günstiges Verfahren erfolgt mittels linearer Polyethylenimin-Derivate, sogenannter PEI-Komplexe. Bei geringer Toxizität wird hiermit eine hohe Transfektionseffizienz erreicht. Bei dieser Methode wird negativ geladene DNA in positiv geladene Partikel verpackt. Dieses kationische Konjugat bindet an anionische Proteoglykane an der Zelloberfläche: Die Konjugate werden rezeptor-vermittelt internalisiert. Im endosomalen Kompartiment ist die DNA vor Abbauprozessen geschützt, denn das kationische Polymer wirkt als Protonen-Falle und puffert somit den pH-Wert innerhalb des Endosoms. Letztendlich wird die DNA aus dem Endosom ins Zytoplasma freigesetzt, zum Kern transportiert und exprimiert.

Die Transfektion mit PEI-Komplexen (*jetPEI DNA Transfection Reagent* 101-40N von *Polyplus transfection*) wurde in 3 cm-Schälchen 24 bis 48 h nach Subkultivierung bei ungefähr 60 bis 70 % Konfluenz durchgeführt. Bei der CHO-Zelllinie fand diese Form der Transfektion Anwendung.

***jetPEI*-Transfektion**

3 µg Plasmid-DNA wurden in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß in sterilem NaCl (150 mM NaCl, *Polyplus transfection* 31985-047) verdünnt. In einem weiteren Reaktionsgefäß wurden 6 µl *jetPEI* im gleichen Volumen NaCl gelöst. Beide Lösungen wurden für zirka 10 s durch Vortexen gemischt. Das *jetPEI*-NaCl-Gemisch wurde nun zur DNA-Lösung gegeben, für 15 s gevortext und für 20 min bei RT unter der Sterilbank zur Ausbildung der Komplexe inkubiert. Die Komplexe wurden vorsichtig an den Rand der Zellkultur-Schale pipettiert und durch Schwenken verteilt. Nach 24 bis 48 h konnte die Proteinexpression (bei fluoreszenz-markierten Konstrukten) der Zellen unter der UV-Lampe kontrolliert und für anschließende Experimente genutzt werden. Bei dieser Form der Transfektion ist kein Mediumwechsel zu antibiotika-freiem Medium notwendig.

2.1.7 Fixierung von Zellen mit Paraformaldehyd

Paraformaldehyd (PFA) ist ein Polymerisationsprodukt des Formaldehyds. Beim Erhitzen von PFA in einer wässrigen Pufferlösung (hier PBS) wird es zu Formaldehyd aufgespalten. Dieses wird zur Konservierung von Proteinen in Geweben oder Zellkulturen eingesetzt: Unter Beteiligung der Aldehyd-Gruppen des Formaldehyds werden Proteine reversibel quervernetzt.

4 g Paraformaldehyd-Pulver (*Roth* A0335.1) und 4 g Saccharose (*Merck* 1.07687.1000) wurden in 60 ml *Aqua dest.* unter Erhitzen auf 55 °C unter dem Abzug gemischt. Nach Zugabe eines

NaOH-Plätzchens (Sodium Hydroxid Pellets *Mallinckrodt Baker B.V.* 0402) wurde die Lösung klar. Nun fügte man 10 ml steriles 10x PBS (*Gibco by Life Technologies* 31985-047) hinzu. Nach dem Abkühlen der Lösung stellte man den pH mit 1 M HCl auf 7.2 ein (pH-Meter: 761 *Calimatic, Knick*). Dieser 4 % ige PFA-Ansatz wurde ad 100 ml mit *Aqua dest.* aufgefüllt, aliquotiert und bei -20° C aufbewahrt.

Zu fixierende Zellen wurden einmal mit sterilem PBS bei RT gewaschen und anschließend für 15 min bei RT in 4 % PFA-Lösung unter dem Abzug zur inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal in PBS gewaschen und bis zur Verwendung bei 4° C aufbewahrt. Die PFA-Abfälle wurden gesammelt, autoklaviert und entsorgt.

2.1.8 Endogene Aktin-Färbung mit Alexa-Farbstoff markiertem Phalloidin

Die Darstellung des endogenen Aktin-Zytoskeletts erfolgte an gewaschen und PFA-fixierten Zellen (2.1.7), die je nach Versuch 24 bis 48 h zuvor mit Pres-GFP-Konstrukten transfiziert wurden (2.1.6). Es wurde ein Phalloidin eingesetzt, an das einen fluoreszierenden Farbstoff, hier *Alexa 568 (Alexa Fluor 568 Phalloidin, von Molecular Probes by life technologies, A12380)*, gebunden ist. Man erhält damit Informationen über die Verteilung von F-Aktin. Das toxische Pilzalkaloid Phalloidin hemmt die Depolymerisierung der Aktin-Filamente und blockiert alle Bewegungsvorgänge.

Zur Aufnahme der Phallotoxine permeabilisierte man die Zellmembranen für 10 min in 0,1 % Triton-PBS-Lösung. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 1 % BSA-Lösung in PBS für 25 min abgesättigt. Im Anschluss wurden pro Coverslip 5 µl der Phalloidin-Alexa Fluor 658-Stammlösung (6,6 µM in Methanol) in 200 µl PBS gelöst und zur irreversiblen Bindung an F-Aktin 20 min mit den Zellen inkubiert. Um nicht gebundene Phalloidin-Farbstoffe zu entfernen, wusch man die Zellen mindestens 3 Mal mit PBS. Das Material konnte direkt für die Fluoreszenz-Mikroskopie eingesetzt oder für die spätere Verwendung bis zu einem Monat im Dunklen bei 4° C gelagert werden.

2.1.9 Behandlung von Zellen mit Zytochalin D (CD)

Zytochalasine sind zell-permeable Mykotoxine, die die Polymerisation und Elongation von Aktin-Filamenten in sehr geringen Konzentrationen inhibieren. Sie binden an das schnell wachsende Plus-Ende der Mikrofilamente und unterbinden die weitere Anlagerung von G-Aktin-Monomeren wie auch deren Abbau. Dies hat Veränderungen der Zellmorphologie zur Folge, beeinflusst die Zytokinese (Arrest bei G1-S), verhindert die Phagozytose wie auch die Migration der Zellen. Zytochalin D (CD) ist ein besonders potentes Alkaloid.

Das CD-Pulver (Cytochalasine D; *Calbiochem* 250255) wurde als 2,5 mM-Stammlösung in DMSO gelöst (-20° C). Die Zellen (3-cm-Schale) wurden 36 bis 48 h nach der Transfektion mit 25 µM CD für 2 h im Inkubator behandelt. Dies entsprach einer Endkonzentration von 1 % DMSO im Zellkultur-Medium. Die Zellen wurden nach Ablauf der Einwirkzeit sofort analysiert. Weitere CD-Konzentrationen wurden getestet: 12,5 µM (0,5 % DMSO); 6,2 µM (0,25 % DMSO); 3,125 µM (0,125 % DMSO) und 1,5625 µM (0,0625 % DMSO). Parallel zur CD-Behandlung wurden gleichermaßen transfizierte Zellen mit den korrespondierenden DMSO-Mengen ohne CD inkubiert, um die CD-Effekte von eventuellen DMSO-Effekten zu unterscheiden.

2.1.10 Behandlung von Zellen mit Latrunkulin A (LatA)

Latrunkuline sind toxische Pilzmetaboliten, die mit der Aktin-Polymerisation interferieren. Im Gegensatz zu CD bindet das Makrolid Latrunkulin A (LatA) die Aktin-Monomere und verhindert somit die Assemblierung zu Mikrofilamenten.

LatA (*Sigma* L5163-100UG) wurde als 1 mM Stock in DMSO gelöst (-20° C). 36 bis 48 h nach der Transfektion behandelte man die Zellen für 30 min bei RT mit folgenden Endkonzentrationen von LatA in Ex-0: 2,5 µM (0,25 % DMSO), 5 µM (0,5 % DMSO), 10 µM (1% DMSO). Parallel zur LatA-Inkubation wurden gleichermaßen transfizierte Zellen mit den korrespondierenden DMSO-Mengen ohne LatA behandelt, um LatA-Effekte von eventuellen DMSO-Effekten zu unterscheiden. Die Zellen wurden nach Ablauf der Einwirkzeit sofort untersucht.

2.1.11 Behandlung von Zellen mit Kolchizin

Kolchizin ist ein toxisches Alkaloid der Herbstzeitlosen (*Colchicum autumnale*). Es bindet an die Tubulin-Dimer-Untereinheiten und unterbindet damit die Polymerisation von stabilen Mikrotubuli und die Ausbildung der Spindelfasern bei der Mitose: je eine Zelle mit und eine ohne Zellkern entstehen, was bei tierischen Zellen zum Zelltod führt.

Kolchizin (*Sigma* C9754) wurde zu einer 100 mM-Stammlösung in Wasser verdünnt und bei -20° C gelagert. Mit folgenden Endkonzentrationen in Ex-0 wurden transfizierte Zellen für 2 h bei 37° C behandelt: 10 µM, 100 µM und 500µM.

2.1.12 Entsorgung von toxischen Modulatoren des Zytoskeletts

Alle Zytoskelett-Gift-Abfälle wurden separat gesammelt, autoklaviert und regelgerecht mit dem zentral organisierten Sondermüll der Universität Marburg entsorgt.

2.1.13 Behandlung von Zellen mit β -Methyl-Zyklodextrin (β MCD)

Zyklodextrine sind zyklische Oligosaccharide, die einen konischen, hydrophoben Hohlraum formen, in dessen Inneren ein lipophiles Molekül aufgenommen werden kann. β -Methyl-Zyklodextrin (β MCD) besteht aus 7 Glukose-Molekülen und fungiert als effektiver Cholesterol-Akzeptor, indem es zelluläres Cholesterols aus den Zellmembranen löst und folglich cholesterol-reiche Mikrodomänen wie z.B. *lipid rafts* zerstört.

Zur Depletion des Cholesterols wurde β MCD (33.261-5 *Sigma*) in einer Konzentration von 10 mM dem Kulturmedium der stabil rPres-GFP und stabil cPres-GFP transfizierten HEK-Zellen zugegeben und für 30 min bei RT dunkel inkubiert. Die Fluoreszenz wurde anschließend sofort konfokal-mikroskopisch aufgezeichnet.

2.2 Molekularbiologie

2.2.1 Verwendete Plasmid-Konstrukte

Tab. 1: Expressionsvektoren:

Herkunft (<i>GeneBank accession no.</i>)	Insert	Marker	Vektor
<i>Danio rerio</i> (NM_201473)	Pres	GFP	peGFP-N3
<i>Danio rerio</i> (NM_201473)	Pres	YFP	peYFP-N
<i>Danio rerio</i> (NM_201473)	Pres	RFP	pRFP-C3
<i>Danio rerio</i> (NM_201473)	Pres	/	peGFP-N3
<i>Gallus gallus</i> (EF028087)	Pres	GFP	peGFP-N1
<i>Gallus gallus</i> (EF028087)	Pres	RFP	PRFP-N1
<i>Gallus gallus</i> (EF028087)	Pres	/	peGFP-N1
<i>Mus musculus</i> (AK032300)	Map1S	CFP	pCFP-N1
<i>Mus musculus</i> (AK032300)	Map1S	/	pCFP-N1
<i>Homo sapiens</i> (NM_001101.3)	β -Aktin	YFP	pcDNA3.1
<i>Homo sapiens</i> (NM_001101.3)	β -Aktin	/	pcDNA3.1
<i>Canis lupus familiaris</i> (NM_001003296.1)	Cav-1	CFP	peCFP-N
<i>Canis lupus familiaris</i> (NM_001003296.1)	Cav-1	YFP	peCFP-N
<i>Canis lupus familiaris</i> (NM_001003296.1)	Cav-1	/	peYFP-N
<i>Homo sapiens</i> (NM_004700.2)	KCNQ4	/	pBK-CMV
<i>Homo sapiens</i>	Lyn	GFP	pcDNA3
<i>Homo sapiens</i>	Lyn	RFP	pRFP-N1
<i>Rattus norvegicus</i> (NM_030840)	Pres	GFP	peGFP-N1
<i>Rattus norvegicus</i> (NM_030840)	Pres	RFP	pRFP-C3
<i>Rattus norvegicus</i> (NM_030840)	Pres	/	peGFP-N1
<i>Rattus norvegicus</i> (NM_030840)	Pres	YFP	peGFP-N1
<i>Rattus norvegicus</i> (NM_030840)	Pres	HA	pBK-CMV
<i>Rattus norvegicus, Gallus gallus</i>	Chimäre-RRC	GFP	peGFP-N

<i>Rattus norvegicus, Gallus gallus</i>	Chimäre-RCC	GFP	peGFP-N
<i>Rattus norvegicus, Gallus gallus</i>	Chimäre-CRR	GFP	peGFP-N
<i>Rattus norvegicus, Gallus gallus</i>	Chimäre-CRC	GFP	peGFP-N
<i>Rattus norvegicus, Gallus gallus</i>	Chimäre-RCR	GFP	peGFP-N
<i>Rattus norvegicus, Gallus gallus</i>	Chimäre-CCR	GFP	peGFP-N

Das Map1S-CFP-Konstrukt aus *Mus musculus* (Bai et al. 2010) wurde zur Verfügung gestellt von D. Navaratnam, Hearing and Balance Center/ Yale Neurology, New Haven, USA. Der Cav-1-CFP und -YFP-Vektor aus Haushund (*Canis lupus familiaris*) stellte R. Jacob, Universität Marburg, Institut für Zytobiologie und Zytopathologie, Deutschland bereit.

2.2.2 Primer

Sämtliche synthetische Oligonukleotide (Primer) zur Amplifikation im Rahmen einer Sequenzierung, zur Vervielfältigung bei Klonierungen oder Mutagenesen wurden über die Firma *Biomers* (www.biomers.net) bezogen. Sie wurden kartusche-gereinigt und lyophilisiert geliefert. Von diesen lyophilisierten Oligo-Pellets wurden 100 pmol/ µl -Stammlösungen hergestellt, welche bei -20° C gelagert wurden. Eine Arbeitslösung (10 pmol/ µl) setzte man aus 10 µl Primer-Stammlösung und 90 µl Wasser an. Standardmäßig wurde für einen 50µl-Reaktionsansatz einer PCR mit 10 pmol pro Primer gearbeitet. Eine Liste der eingesetzten Primer ist unter „Verwendete Primer“ (2.2.10: Tab. 2) zu finden.

2.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit einer PCR (*polymerase chain reaction*) lassen sich gezielt DNA-Abschnitte amplifizieren. Die Spezifität der Amplifikationsprodukte wird durch zwei synthetische Oligonukleotide, die Primer, bestimmt, deren Sequenz zu einem kurzem Abschnitt (meist 20 -30 nts) der zu amplifizierenden DNA komplementär ist. Die Primer müssen in gegenläufiger Orientierung an flankierenden Sequenzen des gewünschten DNA-Abschnitts hybridisieren.

Bei dieser Methode erfolgt zunächst eine Denaturierung der dsDNA bei 95° C gefolgt von einer Anlagerung, dem *annealing*, der Primer an das *template*. Die zu amplifizierende DNA dient als Matrize für die Synthese eines neuen Komplementärstranges mittels einer hitzestabilen DNA-Polymerase bei 72°C.

Sämtliche PCR-Reagenzien wurden über die Firma *Thermo Scientific* bezogen. Es wurde die *DreamTaq*-DNA Polymerase genutzt, eine optimierte Version der *Taq*-Polymerase von *Thermus aquaticus*. Die Vervielfältigung der gewünschten DNA-Abschnitte wurde unter den empfohlenen Puffer-Bedingungen in einem Thermocycler der Firma *Analytik Jena* (Flex Cycler Block, Block Assembly T30, 844-60024-0) durchgeführt. Die Primer und die jeweiligen Hybri-

disierungstemperaturen des *annealing*-Schrittes (T_a) wurden mit der Software *Oligo Calc - Oligonucleotide Properties Calculator* ermittelt (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>). Mit Hilfe von $T_m = 4 * (G + C) + 2 * (A + T)$ kann die Schmelztemperatur eines Primers grob abgeschätzt werden. Die Magnesium-Konzentration wurde dem jeweiligen Primer-Paar angepasst, so dass dieses optimal an die ssDNA binden konnte. Durch die Änderung der T_a bei der Amplifikation und/ oder durch die Zugabe von DMSO konnten die Bedingungen für die PCR optimiert werden.

Standard-Reaktionsansatz zur Durchführung einer PCR

- *template* DNA 10 pg - 1 µg
- 10x PCR-Puffer (inkl. 20 mM MgCl₂, *Thermo Scientific* EP0703) 5 µl
- MgCl₂ (25 mM, *Thermo Scientific* R0971) 1 - 4 µl (2,5 - 4 mM)
- DMSO (2-10 %, *Sigma* D8418-50ML) max. 10 %
- Vorwärts-Primer (F-Primer; *sense*) (10 pmol/µl) 0,1 - 1,0 µM
- Rückwärts-Primer (R-Primer; *antisense*) (10 pmol/µl) 0,1 - 1,0 µM
- dNTPs (je 2 mM, *Thermo Scientific* R0193) 5 µl (je 0,2 mM)
- *Taq*-Polymerase (5 U/ µl, *Thermo Scientific* EP0703) 1,25 U
- ddH₂O (nuklease-frei) ad 50 µl

Standard-Amplifikationsbedingungen

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklen
• Initiale Denaturierung	1 - 3 min	95° C	1
• Denaturierung	40 s	95° C	} 25-40
• Primer- <i>annealing</i>	30 s	$T_a = T_m - 5° C$	
• Elongation	1 min für 1 kb	72° C	
• Finale Elongation	2 - 8 min	72° C	1
• Aufbewahrung	∞	4° C	

Spezifische PCR zur Genotypisierung der Cav-1-defizienten Mäuse

Die genomische DNA zur Bestimmung des Genotyps wurde aus dem Dottersack-Gewebe der Embryonen mittels Mini-Prep (2.2.9.13) gewonnen. Der Cav-1-Lokus wurde anschließend in einer 3-Primer-PCR-Reaktion amplifiziert.

- Genomische Maus-DNA 10 µl (25 ng)
- 10x PCR-Puffer (20 mM MgCl₂, *Thermo Scientific* EP0703) 3 µl
- Vorwärts-Primer (10 pmol/µl); F-Cav-WT (204) 1 µl
- Vorwärts-Primer (10 pmol/µl); F-Cav-k.o.(205) 1 µl
- Rückwärts-Primer (10 pmol/µl); R-Cav-common (206) 1 µl
- dNTPs (je 2 mM, *Thermo Scientific* R0193) 1 µl
- *Taq*-Polymerase (5 U/ µl, *Thermo Scientific* EP0703) 1 µl
- ddH₂O (nuklease-frei) ad 30 µl

Amplifikationsbedingungen für Cav-1-defiziente Mäuse

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklen
• Initiale Denaturierung	3 min	94° C	1
• Denaturierung	40 s	94° C	} 30
• Primer- <i>annealing</i>	45 s	68° C	
• Elongation	45 s	72° C	
• Finale Elongation	2 min	72° C	1
• Aufbewahrung	∞	4° C	

Auswertung der Amplifikationsprodukte der Genotypisierung von Cav-1^{-/-} Mäusen

Die PCR-Produkte wurden in einem 1%igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und unter der UV-Lampe analysiert: Ein homozygoter Wildtyp bildete eine Bande bei 690 bp aus. Ein homozygoter *knock out* von Cav-1 lieferte eine Bande bei 410 bp. Ein heterozygoter Genotyp resultierte in einer 410 bp- und einer 690 bp-Bande.

2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in horizontalen Agarose-Gelen. Die Agarose wurde entsprechend der Größe der zu trennenden Fragmente in unterschiedlichen Konzentrationen (i.d.R. 1 bis 1,5 % Agarose (*Roth* 3810.4) in 1x TAE-Puffer (50x TAE, *Thermo Scientific* B49) durch Aufkochen im Mikrowellenherd (*Privileg* 30590) gelöst. Anschließend wurde das Gel nach Zusatz von Ethidiumbromid (0,025 % Ethidiumbromid-Lösung *Roth* (250 µg/ ml) HP47.1) zur Polymerisation auf den Gelträger gegossen. Die Proben wurden mit 0,1 Volumen 10x Agarose-Gel-Ladungspuffer (*Thermo Scientific Standard 10 x Green buffer* oder *6x DNA Loading Dye* R0611) versetzt und in die Geltaschen aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte bei 80 bis 150 V (*Gibco by Life Technologies* ST606T, 119901G). Mit Hilfe von Längen-Standards (*Thermo Scientific GeneRuler 1 kb Plus DNA ladder* SM 1331 oder 100 bp DNA SM 0241) konnte die Größe der DNA-Fragmente geschätzt werden. Nach dem Lauf wurden die durch das Ethidiumbromid sichtbaren Nukleinsäure-Banden auf dem UV-Transilluminator (*Viber Lourmat DP-CF_011.C*, 08 200386) fotografiert (*Mitsubishi electric P93E* mit Fotopapier *K65HM/ KP65HM*, 160014564) und analysiert.

2.2.5 Klonierung

Unter Klonierung im weiteren Sinne versteht man die Erzeugung genetisch identischer Zellen (Klone). Im engeren Sinne meint die Klonierung molekularbiologische Techniken, um DNA zu gewinnen und identisch zu vervielfältigen. Dieses *molecular cloning* erlaubt es, spezifische DNA-Fragmente zu schneiden und zusammenzufügen, zu verändern, zu vermehren und zu isolieren. Diese Techniken ermöglichen letztendlich, dass gezielt DNA-Fragmente beliebiger Herkunft in einen Klonierungsvektor, z.B. ein viraler Vektor oder ein Plasmid, integriert und als

rekombinantes DNA-Molekül (i.d.R. in bakteriellen Wirtszellen z.B. *E. coli*) vervielfältigt werden können. Die durch Zellteilung entstehenden Bakterienkolonien werden als Klone bezeichnet. Nach Vervielfältigung kann durch die Isolierung der DNA ein Vielfaches der anfangs eingesetzten DNA-Menge gewonnen werden, um sie dann in eukaryontische Zellen per Transfektion einzuschleusen und das Genprodukt zu exprimieren.

Die spezifischen Klonierungsstrategien zur Herstellung der Pres-Chimären aus dem Hühner- und Ratten-Orthologen sind unter „Strategien zur Klonierung der Chimären aus rPres und cPres“ (2.2.11) zusammengefasst.

2.2.5.1 Spaltung mit Restriktionsenzymen

Restriktionsenzyme gehören zur Gruppe der Endonukleasen, die sequenz-spezifisch Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäuren binden und diese durch Hydrolyse der Phosphodiester-Bindung spalten. Basenveränderungen, die in der Erkennungssequenz eines Restriktionsenzym liegen, führen dazu, dass das Enzym nicht mehr schneiden kann. Durch Basentausch können auch zusätzliche Schnittstellen erzeugt werden.

PCR-amplifizierte DNA-Fragmente oder isolierte Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen wurden mit Restriktionsenzymen verdaut. Die Inkubation erfolgte i.d.R. bei 37° C für 10 min bis 16 h. Es wurden bakterielle *Fast Digest* Restriktionsenzyme der Firma *Fermentas/ Thermo Scientific* mit dem zugehörigen universalen Puffersystem genutzt, was den simultanen Verdau mit verschiedenen Enzymen ermöglichte.

Standard-Reaktionsansatz zur Durchführung eines Restriktionsverdau

- | | |
|---|----------|
| • DNA | 1 µg |
| • 10x <i>Fast Digest Green Puffer</i> (<i>Thermo Scientific</i>) | 2 µl |
| • <i>Fast Digest</i> Restriktionsenzym (<i>Thermo Scientific</i>) | 1 µl |
| • H ₂ O (nuklease-frei) | ad 20 µl |

Die entstandenen Spaltungsprodukte wurden danach mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.2.4) analysiert.

2.2.5.2 Gelextraktion

Die Gelextraktion ist eine Technik, um DNA-Fragmente nach der Agarose-Gelelektrophorese aus der Agarose zu isolieren: Dazu werden die Banden im Agarose-Gel mittels langwelliger, möglichst kurzer UV-Bestrahlung sichtbar gemacht und identifiziert. Die gewünschte Bande schneidet man mit einem Skalpell aus, überführt diese in ein 2,0-ml-Reaktionsgefäß, um nun die enthaltene DNA aufzureinigen:

Zur Gelextraktion wurde ein säulen-basiertes Kit der Firma *Qiagen* verwendet (*Qiagen QIAquick Gel Extraction Kit* 28706): Hier erfolgte zuerst das Auflösen der Agarose im 3-fachen Volumen *QG-Puffer* durch Erhitzen (50° C, 10 min) in einem *Thermoblock* (*Thermo Dux Techno Dri Block DB2A*). Der Puffer enthielt chaotrope Salze, welche durch das Aufbrechen von Wasserstoff-Brückenbindungen hydrophobe Effekte verringerte und so zur Denaturierung der DNA führte. Zudem stellte dieser Puffer den optimalen pH-Wert ($\leq 7,5$) und die erforderliche hohe Salzkonzentration ein, um die DNA-Lösung nun auf die Säule zu geben. Dort adsorbierten die DNA-Moleküle an eine kieselsäure-beschichtete Membran während einer Zentrifugation von 1 min bei 13.000 rpm (Zentrifuge *Eppendorf 5424R* mit Rotor *FA-45-24-11 Special*). Primer und andere Verunreinigungen wie Salze, freie Nukleotide, Enzyme, Agarose, Ethidiumbromid und Detergenzien (z.B. DMSO) banden nicht am diese Membran. Die Säule wurde anschließend einmal mit 500 μ l *QG-Puffer* gespült (1 min, 13.000 rpm), um sämtliche Gelreste aufzulösen und zu entfernen. Das zusätzliche quantitative Auswaschen der Salze erfolgte mit 750 μ l ethanol-haltigem PE-Puffer unter erneuter Zentrifugation. Nach dem Trocknen der Säule (1 min, 13.000 rpm) schloss sich die ebenfalls pH- und salz-abhängige Elution an; die Effizienz war unter basischen Bedingungen (7.0 - 8.5) und niedriger Salzkonzentration am höchsten: Die DNA wurde entweder in 30 bis 70 μ l Steril-Wasser oder TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) bei 13.000 rpm (2 min) in ein frisches 1,5ml-Reaktionsgefäß eluiert. Die DNA-Lösung wurde abschließend kurzzeitig bei 4° C oder langfristig bei -20° C gelagert.

2.2.5.3 Insert-Phosphorylierung

Für die Ligation mittels *T4-Ligase* muss wenigstens ein DNA-Ende, i.d.R. das Insert, ein 5'-Phosphat enthalten. Da Primer meist unphosphoryliert synthetisiert werden, enthalten zu ligierende PCR-Produkte kein 5' Phosphat. Der Verdau von DNA mittels Restriktionsenzymen hingegen liefert immer ein 5' Phosphat. Die *T4 Polynukleotid-Kinase* (*T4 PNK*) katalysiert den Transfer von γ -Phosphat von ATP zur 5'-OH-Gruppe des Oligonukleotides, der ss oder dsDNA oder RNA.

Nach der Aufreinigung des Insert-Fragmentes über eine Zentrifugationssäule (2.2.5.2) wurden die DNA-Fragmente mit *T4 PNK* inkubiert. Puffer, ATP (100 mM Stock) und die *T4 PNK* wurden über die Firma *Thermo Scientific* bezogen.

Standard-Reaktionsansatz zur Phosphorylierung von DNA

- | | |
|---|-----------------------|
| • lineare dsDNA (Insert) | 1-20pmol (5' Termini) |
| • 10x Reaktionspuffer A (<i>Thermo Scientific</i> EK0031) | 2 μ l |
| • ATP (10 mM; <i>Thermo Scientific</i> ATP 100 μ M, R0441) | 2 μ l |
| • <i>T4 PNK</i> (10 U / μ l, <i>Thermo Scientific</i> EK0031) | 1 μ l (1 U) |
| • H ₂ O (nuklease-frei) | ad 20 μ l |

Die Inkubation des Reaktionsmixes erfolgte bei 37° C für 20 min. Im Anschluss wurde die Reaktion bei 75° C (10 min) inaktiviert und in der Ligation (2.2.5.6) eingesetzt.

2.2.5.4 Vektor-Dephosphorylierung

Dephosphorylierung ist manchmal notwendig, um eine Selbst-Ligation des Klonierungsvektors zu vermeiden. Die *FastAP* thermo-sensitive, alkalische Phosphatase katalysiert die Freisetzung von 5'-, 3'- Überhang- und *blunt*-Phosphatgruppen von DNA, RNA und Nukleotiden und von Proteinen.

Standard-Reaktionsansatz zur Dephosphorylierung der Vektor-DNA

- | | |
|--|----------------------|
| • lineare DNA (Vektor) | 1 µg (1pmol Termini) |
| • 10x Reaktionspuffer | 2 µl |
| • <i>FastAP</i> (1 U/ µl, <i>Thermo Scientific</i> EF0654) | 1 µl (1U) |
| • H ₂ O (nuklease-frei) | ad 20 µl |

Die Inkubation des Reaktionsmixes erfolgte bei 37° C für 10 min. Im Anschluss wurde die Reaktion bei 75° C (5 min) inaktiviert und für die Ligation weiterverwendet (2.2.5.6).

2.2.5.5 Blunting

Unter *blunting* versteht man die Entfernung von 3'- und/ oder 5'-Überhängen an DNA-Fragmenten mittels eines Enzyms mit Exonukleaseaktivität. Solche Enzyme hydrolysieren eine terminale Phosphodiester-Bindung nach der anderen. DNA-Fragmente mit 5'-Überhang können auch durch das Auffüllen des 3'-Terminus in Gegenwart von dNTPs *geblunted* werden (mittels DNA-Polymerase z.B. *DNA Polymerase I Large (Klenow) fragment*, *T4 DNA Polymerase* oder *Mung Bean Nuclease*). PCR-Reaktionen mit *proofreading*-Polymerasen erzeugen bereits überwiegend *blunt*-Enden. Hingegen generieren die *Taq DNA Polymerase* und *Dream Taq DNA Polymerase* 3'dA-Überhänge. Der Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen erzeugt gleichermaßen 5'- oder 3'-Überhänge an den Enden (ausgenommen *blunt*-schneidende Enzyme). *Gebluntete* DNA ist universal kompatibel mit anderen *blunt*-End-Fragmenten und kann somit eine Ligation bei nicht-kompatiblen Überhängen ermöglichen. Das eingesetzte Enzym (*DNA Blunting Enzyme*) zur Erzeugung von *blunt*-Enden und dessen 2x Puffer stammen aus dem *CloneJet PCR Cloning Kit* der Firma *Thermo Scientific* (K1232). Es handelt sich hierbei um eine thermostabile *DNA-Polymerase* mit *proofreading*-Aktivität. 3'-Überhänge werden entfernt und 5'-Überhänge werden aufgefüllt. Die erforderlichen Nukleotide für die Auffüllreaktion sind im mitgelieferten Puffer enthalten.

Standard-Reaktionsansatz für die *blunting*-Reaktion

- | | |
|--|------------------------|
| • PCR-Produkt/ Verdau-Produkt mit Überhängen | 1 µl |
| • 2x Reaktionspuffer (<i>Thermo Scientific</i> K1232) | 10 µl (0,15pmol Enden) |
| • <i>DNA blunting Enzyme</i> (<i>Thermo Scientific</i> K1232) | 1 µl |
| • H ₂ O (nuklease-frei) | ad 20 µl |

Der Reaktionsmix wurde 5 bis 10 min bei 70° C inkubiert und auf Eis gestellt. Im Anschluss wurde die Ligationsreaktion gestartet.

2.2.5.6 Ligation

Eine zentrale Technik der Klonierung ist die Ligation. Darunter versteht man die Verknüpfung von DNA-Fragmenten mittels enzymatischer Aktivität zur Erzeugung von rekombinanten DNA-Molekülen. Die Ligase katalysiert die Bildung einer Phosphodiester-Bindung zwischen der 3'-Hydroxylgruppe des einen DNA-Terminus mit der 5'-Phosphorylgruppe des anderen Terminus. Als Standard-Ligase diente die *T4 DNA Ligase*. Sie verknüpft *gebluntete* Enden wie auch Fragmente mit Überhängen von DNA, RNA und DNA-RNA-Hybriden. Weiterhin repariert sie Einzelstrang-Brüche in dsMolekülen. Als Ko-Faktor der Reaktion dient ATP, welches im mitgelieferten Puffer enthalten ist.

Standard-Protokoll zur DNA-Insert-Ligation in Vektor-DNA

- | | |
|---|---|
| • lineare Vektor-DNA | 20 - 100 ng |
| • lineare Insert-DNA | 1:1 bis 7:1 molares Verhältnis zum Vektor |
| • 10x <i>T4 DNA Ligase</i> -Puffer (<i>Thermo Scientific</i> EL0012) | 2 µl |
| • <i>T4 DNA Ligase</i> (<i>Thermo Scientific</i> EL0012) | 1 U |
| • H ₂ O (nuklease-frei) | ad 20 µl |

Der Reaktionsmix wurde für 30 min bei 22° C, für 2 h bei 16° C oder über Nacht bei 4° C inkubiert und im Anschluss bei 65° C für 10 min inaktiviert.

2.2.6 *site-directed* Mutagenese

Die *site-directed*, also ortsgerichtete Mutagenese, ermöglicht den spezifischen Austausch, die gezielte Insertion oder Deletion von punkt- oder multiplen Basen einer Ziel-DNA und damit die bewusste Veränderung von Aminosäuren eines Genprodukts.

Für dieses PCR-basierte Konzept werden synthetische DNA-Oligonukleotide (Primer) benötigt: ein Vorwärts- und ein Rückwärts-Primer. Beide enthalten die gewünschte Mutation und sind jeweils komplementär zu den *template*-DNA-Strängen *upstream* und *downstream* (jeweils zirka 15 - 18 nts) der Mutationsstelle, so dass die Primer an der gewünschten Stelle der Vektor-DNA (i.d.R. ein bakterielles Plasmid) hybridisieren können. Die Einzelstrang-Primer werden an-

schließlich entsprechend der Plasmid-*template*-Stränge komplett mittels *high-fidelity-DNA-Polymerase* (*PfuUltra high-fidelity (HF) DNA polymerase AD* von *Stratagene/ Agilent Technologies* 600389) in einer PCR verlängert. Diese Reaktion generiert genickte, zirkuläre DNA. Schließlich wird die eingesetzte *template*-DNA enzymatisch mit *DpnI* abgebaut: *DpnI* erkennt und schneidet biosynthetisierte, methylierte DNA (Zielsequenz: 5'-Gm6ATC-3'), nicht aber unmethylierte DNA aus der *in vitro* PCR-Reaktion, so dass für die nachfolgende Transformation die mutierten Amplifikationsprodukte selektiert werden.

Es wurde mit dem *QuikChange™ II XL Site-Directed Mutagenesis Kit* des Anbieters *Stratagene/ Agilent Technologies* (200522) gearbeitet. Es eignet sich speziell für die Mutagenese großer Vektoren von 8 bis 14 kb. Das Primer-Design erfolgte mit Hilfe des Tools *Oligo Calc Oligonucleotide Properties Calculator* (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) und nach folgenden Vorgaben:

- Beide Primer müssen die gewünschte Mutation enthalten und an die gleiche Sequenz am jeweils komplementären Strang des Plasmids binden.
- Die optimale Primer-Länge beträgt 25 bis 45 nts, wobei $T_m \geq 75^\circ \text{C}$ (maximal 82°C). Die T_m wurde folgendermaßen kalkuliert:

$$T_m = 81,5 + 0,41 (\%GC) - \frac{675}{N} - \% mismatch$$

- N: Anzahl der Basen im Oligonukleotid
 - % GC: Anteil der Basen Guanin (G) und Zytosin (C) in Prozent im Gesamt-Primer
 - % *mismatch*: Anteil der fehlgepaarten Basen in Prozent
- Die gewünschte Mutation soll sich mittig im Primer befinden oder mindestens beidseitig von 10 bis 15 Basen flankiert werden. Der GC-Gehalt der Primer soll mindestens 40 % getragen. Die Primer terminieren beidseitig auf ein oder zwei Guanin- oder Zytosin-Basen.

Zunächst wurde die Synthese des mutierten Strangs anhand des *template*-Plasmids durchgeführt:

Standard-Protokoll zur Plasmid-Mutagenese-PCR

Auf Eis erfolgte das Ansetzen des Reaktionsmixes für das thermische *Cycling*:

- | | |
|---|----------|
| • 10× Reaktionspuffer (<i>Stratagene/ Agilent Technologies</i> 600522) | 5 µl |
| • dsDNA <i>template</i> | 10 ng |
| • F-Oligonukleotid-Primer (<i>sense</i>) | 125 ng |
| • R-Oligonukleotid-Primer (<i>antisense</i>) | 125 ng |
| • dNTP-Mix (je 2 mM, <i>Thermo Scientific</i> R0193) | 1 µl |
| • <i>QuikSolution</i> (<i>Stratagene/ Agilent Technologies</i> 600522, alternativ DMSO) | 3 µl |
| • H ₂ O | ad 50 µl |
| • <i>PfuUltra HF DNA polymerase</i> (2.5 U/ µl; <i>Stratagene/ Agilent Technologies</i> 600389) | 1 µl |

Thermisches Cycling

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklen
• Initiale Denaturierung	3 min	95° C	1
• Denaturierung	50 s	95° C	} 18
• Annealing	50 s	60° C	
• Elongation	1 min/ kb Plasmid	68° C	
• Finale Elongation	8 min	68° C	1
• Aufbewahrung	∞	4° C	

DpnI-Verdau

Für den Verdau der *template*-Stränge wurde 1 µl *DpnI* (10 U/ µl, *Thermo Scientific* ER1705) direkt in den Reaktionsmix gegeben. Diese Reaktion ließ man 1 h bei 37° C im Thermoblock inkubieren.

Die Amplifikation (10 µl des Ansatzes) kontrollierte man im 1%igem Agarose-Gel und analysierte die Größe der Produkte unter der UV-Lampe anhand eines GrößenStandards. Kompetente Bakterien-Zellen wurden mit der synthetisierten DNA (1-5 µl) transformiert (2.2.9.9), auf Selektionsagarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C temperiert. Nach 16 h Wachstum waren klonale Kolonien von resistenten Bakterien zu erkennen. Diese wurden anschließend als Mini-Kultur angeimpft (2.2.9.12, 2.2.9.13).

2.2.7 Photometrische Messung der DNA-Konzentration/ Reinheit von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsmessung von isolierter DNA erfolgte mit Hilfe eines UV-Photometers (*BioRad SmartSpec™ Plus Spectrophotometer*). 150 µl einer 1:50 in Steril-Wasser verdünnten DNA-Lösung wurden in eine Quarzküvette (*Hellma* 105.203-QS, 10 mm Schichtdicke) überführt. Die Konzentrationsbestimmung fand bei 260 nm statt. Gleichzeitig wurde der verbleibende Proteinanteil in der DNA-Lösung bei 280 nm (Absorption der aromatischen Aminosäurereste) gemessen. Das OD-Verhältnis 260 nm/ 280 nm beträgt bei einer sauberen Präparation 1,8. Bei einem Wert von 1,8 bis 2,0 kann eine ausreichende Reinheit angenommen werden. Werte unter 1,8 weisen auf eine Verunreinigung mit Proteinen und/oder Alkohol hin. Bei Werten über 2,0 liegt die Verunreinigung an vorhandener RNA oder denaturierter DNA.

Eine optische Dichte von 1,0 entspricht einer Konzentration von 50 µg doppelsträngiger DNA pro Milliliter. Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde mit Hilfe des Absorptionskoeffizienten k von Nukleinsäuren bei 260 nm wie folgt ermittelt:

$$c = OD_{260} * k * VF$$

- c : DNA-Konzentration [µg/ ml]
- OD_{260} : optische Dichte bei 260 nm

- k: Absorptionskoeffizient [$\mu\text{g}/\text{ml}$]; $k = 50$ für dsDNA, $k = 20$ für ssDNA
- VF: Verdünnungsfaktor (hier 50)

Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Anhand dieser mittleren Konzentration wurden die DNA-Lösungen auf $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt und bei 4°C aufbewahrt.

2.2.8 DNA-Sequenzierung

Die Bestimmung der Basen-Abfolge in einem DNA-Molekül ist eine Schlüsselmethode der DNA-Klonierung. Für diese Arbeit wurde der *Barcode Economy Run Service* der Firma *Microsynth* (<http://www.microsynth.ch>) genutzt. Die Sequenzierung von Plasmid-DNA oder PCR-Produkten erfolgte über die *Sanger-Methode*.

In einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß wurden zu $12 \mu\text{l}$ DNA-Lösung (Plasmide: $60\text{-}100 \text{ ng}/\mu\text{l}$; PCR-Produkte $18 \text{ ng pro } 100 \text{ Basen}$) $3 \mu\text{l}$ Sequenzier-Primer-Lösung (30 pmol) hinzugefügt. Dieses Gefäß, mit einem *Barcode Label* versehen, wurde an die Firma geschickt.

2.2.9 Bakteriologisch-molekularbiologische Methoden

2.2.9.1 Ansetzen von SOC-Medium

SOC, ein reichhaltiges Kulturmedium (*SOB*, *Super Optimal Broth with catabolic repressor*), wird zur Proliferation von kompetenten Bakterienzellen nach der Transformation eingesetzt. *SOB* kann mit 20 mM Glukose zu *SOC*-Medium erweitert werden.

Es wurden $3,07 \text{ g}$ *SOB*-Pulver (*Roth*, AE27.1) in 100 ml *Aqua dest.* autoklaviert. Nach dem Abkühlen fügte man $2 \text{ ml } 20 \%$ steril filtrierte Glukose-Lösung (2 g Glukose in 10 ml *Aqua dest.*; (D(+)-Glucose Monohydrat von *Roth* 6780.1)) hinzu.

2.2.9.2 LB-Flüssigmedium für Bakterien

LB-*(Lysogeny Broth)* ist ein komplexes Nährmedium zur Bakterienkultur. Standardmäßig wird es mit 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt und 10 g NaCl zubereitet. Für diese Arbeit wurden LB-Medium-Kapseln (LB-Medium (*Capsules Patented Process*, *MP Biomedicals*, 3002-041, France) verwendet. 25 solcher Kapseln wurden in 1 l *Aqua dest.* für 15 min bei 121°C gelöst, autoklaviert und anschließend bei RT gelagert.

2.2.9.3 LB-Selektions-Agar-Platten für Bakterien

Agar-Agar (*Roth*, 2266.2) ist ein Galaktose-Polymer und dient in der Bakteriologie als Geliermittel. Es eignet sich nach der Polymerisation als halbfester Nährboden für das Wachstum und zur Selektion von resistenten Bakterien. Es wird in Pulverform (15-16 g pro Liter) zu den LB-Kulturmedium-Kapseln vor dem Autoklavieren zugefügt. Nach dem Abkühlen auf zirka 60° C wurde das Antibiotikum (2.2.9.5, 2.2.9.7) zugegeben und anschließend zügig unter einer Sterilbank auf 10 cm-Petrischalen verteilt. Die Selektions-Agar-Platten wurden bei 4° C bis maximal eine Woche aufbewahrt.

2.2.9.4 Ansetzen von Ampizillin-Stocks

Ampizillin ist ein semi-synthetisches Breitband-Antibiotikum aus der Gruppe der β -Lactam-Antibiotika (Aminopenizilline). Der Wirkmechanismus beruht auf der Hemmung der Quervernetzung des Peptidoglykan-Gerüsts bei der Zellwand-Biosynthese in proliferierenden Bakterien. Durch Anlagerung ihres β -Lactam-Rings erfolgt die Blockade der D-Alanin-Transpeptidase. Die Bakterien sind somit teilungsunfähig. Dieses Bakteriostatikum wird als Selektionsmittel im Kulturmedium der Bakterien eingesetzt: Einzig diejenigen Bakterienzellen überleben, die bei der Transformation den Vektor aufgenommen haben, der das Ampizillin-Resistenzgen β -Lactamase trägt.

Für 25 ml Ampizillin-Stock mit einer Konzentration von 50 mg/ ml wurden 1,25 g Ampizillin-Natriumsalz (*Roth*, K029.1) in 25 ml *Aqua dest.* gelöst. Die Stammlösung wurde à 1 ml aliquotiert und bei -20° C gelagert (\rightarrow 2.2.9.5).

2.2.9.5 Ansetzen von Ampizillin-LB

Um Bakterien in LB-Ampizillin-Medium oder auf Agar-LB-Platten selektiv zu kultivieren, wurde eine Ampizillin-Endkonzentration von 50 μ g/ ml Medium verwendet, also 1 μ l Stocklösung auf 1000 μ l autoklaviertes LB-Medium/ Agar-LB eingesetzt.

2.2.9.6 Ansetzen von Kanamycin-Stocks

Das Sulfatsalz des Kanamycins ist ein weit verbreitet bakterizides Aminoglykosid-Antibiotikum, welches ebenfalls zur Selektion eingesetzt wird. Kanamycin ist gegen gram-negative und -positive Bakterien wirksam. Die Moleküle durchdringen die bakteriellen Zellmembranen, interagieren mit der 30S-Untereinheit der Ribosomen und hemmen die bakterielle Proteinbiosynthese. In kanamycin-haltigem Bakterien-Nährmedium werden nur die Zellen überleben, die einen Plasmid-Vektor mit Kanamycin-Resistenzgen tragen. Bei Expression dieses

Resistenzgens geschieht die Inaktivierung des Kanamyzins durch Phosphorylierung, Adenylierung oder Azetylierung.

Für eine 25 ml Kanamyzin-Stammlösung mit einer Konzentration von 30 mg/ ml wurden 0,75 g Kanamyzinsulfat (*Roth*, T832.1, ≥ 750 I.U./ mg) in 25 ml *Aqua dest.* gelöst. Diese Stammlösung wurde à 1 ml aliquotiert und bei -20° C gelagert (\rightarrow 2.2.9.7).

2.2.9.7 Ansetzen von Kanamyzin-LB

Um Bakterien in LB-Kanamyzin-Flüssigmedium oder auf Agar-LB-Platten selektiv zu kultivieren, wurde eine Endkonzentration von 30 μ g/ ml Medium verwendet, also 1 μ l Stocklösung auf 1000 μ l autoklaviertes LB-Medium/ Agar-LB eingesetzt.

2.2.9.8 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Kompetenz ist das Vermögen von Zellen, freie DNA aufzunehmen. Sie stellt die Basis für die Transformierbarkeit von Bakterien dar. Bei nicht natürlich kompetenten Bakterien, wie zum Beispiel *E. coli*, lässt sich durch eine Kalziumchlorid-Behandlung und einen anschließenden Hitzeschock eine künstliche Kompetenz bewirken.

Ausgangsmaterial für die Herstellung chemisch kompetenter Zellen waren *10-beta Competent E. coli High Efficiency cells* (*NEB* C3019I), *XL10-Gold ultracompetent cells* (*Stratagene* 200315) oder *5-alpha Competent E. coli subcloning efficiency cells* (*NEB* C2987I). 1 μ l dieser Bakterien wurde in 2 ml LB-Medium über Nacht bei 37° C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde 1 ml dieser Suspension in 100 ml frisches LB-Medium übergeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,25 bis 0,3 bei 37° C wachsen gelassen (*Semi micro-Küvetten Greiner bio-one* 613101). Im Anschluss ruhte die Kultur für 15 min auf Eis und wurde danach für 10 min bei 3300 g bei 4° C zentrifugiert. Das Pellet wurde in eiskaltem 0,1 M $CaCl_2$ (1,0 M $CaCl_2$ -Lösung, *Fluka* 21114-1L) aufgenommen und nochmals auf Eis inkubiert (30 min), wodurch die Zellwände der Bakterien porös wurden. Dies ermöglichte später das Anhaften der Plasmide bei der Transformation. Die Bakterien mit den leicht beschädigten Zellwänden wurden für 10 min bei 3300 g bei 4° C pelletiert und danach in 6 ml 0,1 M $CaCl_2$ + 15 % Glycerol (*Roth* 3783.1; steril filtriert) resuspendiert. In vorgekühlte Reaktionsgefäße wurden Aliquots à 50 bis 200 μ l abgefüllt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Diese lagerte man bei -75° C. Diese künstlich hergestellte Kompetenz der *E. coli*-Zellen wird als Transformationseffizienz gemessen. Sie ist definiert als die Anzahl an Bakterienkolonien, die pro μ g Plasmid-DNA aus einer Transformation hervorgehen. Sie liegt zwischen 10^7 und 10^{10} für typische Test-DNA-Vektoren wie *pUC18*(\rightarrow 2.2.9.9; 2.2.9.10).

2.2.9.9 Transformation in kompetente *E. coli* Zellen

Die Transformation ist neben der Konjugation und der Transduktion eine Möglichkeit des natürlichen Gentransfers bei Prokaryonten. In der Molekularbiologie wird die Transformation als Standard-Verfahren zur nicht-viralen Übertragung freier DNA in kompetente Bakterien, Algen, Hefen, Pilze und Pflanzen genutzt. Zur Transformation wurden kompetente *10-beta*-, *5-alpha*- oder *XL10-Gold ultrakompetente E. coli* eingesetzt (2.2.9.8), die sich sowohl für die Aufnahme von PCR-amplifizierten Plasmiden wie auch für ligierte DNA-Produkte eignen.

Die bei -75°C gelagerten Bakterien-Aliquots (i.d.R. 50 bis 200 μl) wurden schonend auf Eis aufgetaut. 1 pg bis 100 ng der zu übertragenden DNA wurde zur Zellsuspension gegeben und vorsichtig vermischt. Diesen Mix ließ man 30 min auf Eis stehen, um im Anschluss den Hitzeschock bei 42°C (40 sec) im Wasserbad (*Köttermann*) vorzunehmen. Die Suspension ließ man 5 min auf Eis stehen und gab danach 950 μl SOC-Medium (2.2.9.1) zu. Die transformierten Zellen wurden zur Expression der Antibiotikum-Resistenz 1 h bei 37°C geschüttelt (250 rpm). In der Zwischenzeit wärmte man die Selektionsplatten bei 37°C vor. Die Bakterienlösung wurde nun für 1 bis 2 min bei 3000 rpm pelletiert und in einem Volumen von zirka 200 μl SOC resuspendiert, um sie darin gleichmäßig auf den Selektionsplatten auszustreichen. Diese Platten wurden für zirka 16 h bei 37°C zur Koloniebildung der Transformanden inkubiert.

2.2.9.10 Re-Transformation

Zur Re-Transformation werden Plasmide eingesetzt, die bereits aus *E. coli*-Zellen isoliert wurden und dementsprechend spezifische Methylierungen an der DNA tragen. Solche DNA-Modifikationen werden von den kompetenten Zellen erkannt, deshalb lassen sich methylierte DNAs leichter in Bakterien bringen.

Es wurde ein Kurzprotokoll einer Transformation durchgeführt: Die kompetenten Zellen wurden zügig aufgetaut und 1 pg bis 100 ng Plasmid-DNA zugegeben. Die Suspension wurde für 2 min auf Eis gelagert. Der Hitzeschock erfolgte in einem 42°C -warmen Wasserbad für 40 sec. Danach wurde die Suspension wieder für 2 min auf Eis gesetzt. Man gab nun 1000 μl SOC-Medium zu und plattiert davon 100 bis 200 μl auf eine Selektionsplatte mit entsprechendem Antibiotikum. Die Platten wurden für 8 bis 16 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss konnten die Klone gepickt werden (2.2.9.12).

2.2.9.11 Anlegen eines bakteriellen Glycerol-Stocks

Glycerol-Stocks sind bedeutend für die Langzeit-Lagerung von Bakterien. Glycerol stabilisiert die Bakterien, verhindert Schäden an den Membranen und hält sie am Leben. Diese Lagerung spart zusätzliche Re-Transformationen und kompetente Zellen.

Zum Anlegen eines Glycerol-Stocks wurden 300 µl Glycerol (*Roth 3783.1*) in ein Gefrier Röhrchen vorgelegt. 600 µl Bakteriensuspension wurden hinzugefügt, gründlich gevortext (*Phoenix Instrument RS-VA-10*) und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die langfristige Lagerung erfolgte bei -75° C in einem Gefrierschrank (*Thermo Scientific VXS*). Das Glycerol-Bakteriengemisch wird nicht fest, so dass später mit einer sterilen Pipettenspitze Material für eine Kultur aufgenommen kann.

2.2.9.12 Animpfen einer Schüttelkultur für eine Mini-Plasmidpräparation

Je eine Bakterienkolonie wurde mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und in 5 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum (2.2.9.2, 2.2.9.5, 2.2.9.7) in ein 13 ml-Minikulturgefäß (Röhre 13 ml, *Sarstedt 62.515.006*) überführt. Die Kultur wurde für 16 h bei 37 °C mit 170 rpm geschüttelt (Inkubationsschüttler *Incutec Inc IS-1K* mit *Noctua KH10/300* und *TI-1 Eltest*; →2.2.9.13).

2.2.9.13 Plasmid-DNA-Präparation aus Mini-Kulturen

Die Plasmidpräparation stellt eine molekularbiologische Variante der DNA-Extraktion dar. Hierbei wird die Plasmid-DNA transformierter Bakterien isoliert und aufgereinigt. Zur Isolierung kleiner Mengen an Plasmiden (bis 30 µg) steht die sogenannte *Mini-prep* zur Verfügung, für größere Mengen bis 1000 µg eignet sich die *Midi-prep*. Eine häufig verwendete Möglichkeit zur Plasmid-Aufreinigung ist die hier genutzte Methode der alkalischen Lyse. Dabei werden die Bakterien unter alkalischen Bedingungen (mittels anionischem Detergenz SDS + hohem pH durch NaOH) lysiert und die DNA denaturiert. Anschließend hybridisieren die beiden Stränge der Plasmid-DNA unter neutralen Bedingungen wieder, während die größere chromosomale DNA einzelsträngig bleibt und mit den Proteinen denaturiert.

Für die *Mini-Prep* wurden fertige Lösungen und Säulen des *GeneAll EXPREP Plasmid SV mini Purification Kits* (*Gene All 101-102*) verwendet. Die Säulen (*GeneAll SV Column type Q*) sind mit einer Glas-Mikrofaser-Membran ausgestattet und erlauben das selektive Binden von Plasmid-DNA aus dem Lysat in Gegenwart hoher Salz-Konzentrationen. Die gebundene DNA wurde in mehreren Waschschrritten von anderen bakteriellen Komponenten aufgereinigt. Letztendlich erfolgte die Elution der Plasmid-DNA von der Säulen-Membran.

Vor der Präparation der Plasmid-DNA wurden 600 µl Kultur für das Anlegen eines Glycerol-Stocks abgenommen (2.2.9.11). Die verbleibende Bakteriensuspension wurde 10 min bei etwa 2500 g (Zentrifuge *Sigma 2-16P*, Rotor 12072) pelletiert, das LB-Medium abgesaugt und die Bakterien anschließend in 250 µl Puffer *S1* resuspendiert. Die Zellen wurden mit 250 µl *S2* lysiert (3 bis 5 min) und die Lyse durch Neutralisation mit 350 µl Puffer *S3* abgestoppt. Der entstehende weiße Niederschlag aus präzipitierten Proteinen und Bakterienfragmenten wurde 10 min bei 13000 rpm (*Eppendorf Centrifuge 5424R*) abzentrifugiert. Der Überstand, der die DNA enthielt, wurde vorsichtig abpipettiert, auf die Säulen-Membran gegeben und für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Die Säulen-Membran wurde mit 700 µl Puffer *PW* unter einminütiger Zentrifugation gewaschen. Der Durchfluss wurde wieder verworfen. Um verbleibenden Waschpuffer zu entfernen, trocknete man die Säule durch Zentrifugieren für 1 min bei 13000 rpm. Danach wurde die Säule in ein frisches 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe 50 µl deionisierten Wassers und 2 min Inkubation konnte die Plasmid-DNA durch Zentrifugation (2 min bei 13000 rpm) aus der Säulenmembran gelöst werden. Die Plasmid-DNA wurde bei 4° C gelagert.

2.2.9.14 Animpfen einer Schüttelkultur für eine Midi-Plasmidpräparation

Ausgangsmaterial für eine Midi-Kultur ist eine Übertag-Kultur. Hierfür pickte man eine Kolonie von einer Selektionsplatte und impfte diese in 3 bis 5 ml LB + Antibiotikum über (2.2.9.5, 2.2.9.7). Alternativ erfolgte das Animpfen aus einem Glycerol-Stock mittels steriler Pipettenspitze. Die Übertag-Kultur wurde bei 37° C mit 170 rpm 6 bis 8 h geschüttelt. Trat im Laufe dieser Zeit eine Trübung der Kultur ein, so wurden 20 µl davon in 200 ml LB + Antibiotikum überführt (500 ml Erlenmeyer-Kolben von *Roth X751.1* oder *C139.1*) und über Nacht (zirka 16 h) bei 37° C und 170 rpm inkubiert. War kein sichtbares Wachstum der Kultur zu sehen, so wurde der komplette Ansatz in die 200 ml LB + Antibiotikum-Midi-Kultur übergeimpft und ebenso inkubiert (→ 2.2.9.15).

2.2.9.15 Plasmid-DNA-Präparation aus Midi-Kulturen

Die Plasmid-DNA wurde nach dem Herstellerprotokoll des *NucleoBond® Xtra MIDI plasmid purification Kit* von *Machery-Nagel* (740410.100) präpariert. Die mitgelieferten Säulen (*NucleoBond® Xtra Columns*) sind mit einem kieselensäure-basiertem Anionenaustausch-Harz und 2 Filterelementen ausgestattet. Unter sauren pH-Bedingungen stellt dieses Harz seine positiven Ladungen zur Verfügung, um die Plasmid-DNA über seine negativ geladenen Phosphatreste hoch spezifisch und reversibel zu binden. Die hohen Salzkonzentrationen im Lysat verhindern die Adsorption von Proteinen und RNA. Nach zwei sich anschließenden Waschschritten erfolgt die Elution der Plasmid-DNA unter hoch-salzigen, alkalischen Bedingungen. Unter die-

sen Gegebenheiten werden die positiven Ladungen des Anionenaustausch-Harzes neutralisiert und die DNA kann gelöst werden. Anschließend muss die DNA bei RT (sonst fallen Salze mit aus) präzipitiert werden, um die Salze und sämtliche Alkoholreste zu entfernen.

Zur Ernte der Zellen aus der Midi-Kultur wurden die Bakterien durch Zentrifugation (*Sorvall RC6 Plus* mit Rotor SLA-1500) bei 6000 g für 12 min bei 4° C in einer *PPCO-Flasche* (*BeraneK Laborgeräte* 253421) pelletiert. Der Medien-Überstand wurde abgegossen und inaktiviert (*Gigasept Instru AF Schülke* 107412). Das Bakterienpellet löste man mittels Auf- und Abpipettieren in 8 ml Puffer *RES*. Der Suspension gab man 8 ml Puffer *LYS* zu und ließ sie zur alkalischen Zellyse 5 min bei RT inkubieren. In der Zwischenzeit wurde in die *NucleoBond® Xtra Column* ein Filterelement gesetzt und diese Einheit mit 12 ml *EQU* äquilibriert. Die Lyse wurde durch Zugabe von 8 ml Puffer *NEU* abgestoppt (Es entsteht Kaliumdodezylsulfat, dadurch fallen Proteine, chromosomale DNA und Zellreste aus. Die Plasmid-DNA erreicht wieder ihre *super coiled* Konformation). Das nun homogene Lysat wurde auf die vorbereiteten Säulen geladen. Hernach wurden Filter- und Säuleneinheit durch Zugabe von 5 ml Puffer *EQU* gewaschen. Der Filter wurde verworfen. Die Säule spülte man dann mit 8 ml Puffer *WASH*. Der sich anschließende Elutionsschritt erfolgte mit 5 ml Puffer *ELU* in ein frisches 50 ml Falcon Reaktionsgefäß. Hinzu gab man 3,5 ml Isopropanol (RT) und vortexte die Lösung, um die DNA zu präzipitieren. Die DNA wurde für 30 min bei 13000 rpm und 4° C pelletiert. Der Überstand wurde sauber abgegossen. Das Pellet wusch man in 70%igem Ethanol und zentrifugierte es für 5 min bei 13000 rpm (RT). Den Überstand nahm man mit einer Pipette ab und trocknete das DNA-Pellet bei 37° C für zirka 10 min, bis es durchscheinend erschien. Die DNA wurde über Nacht in 100 µl sterilem Wasser (je nach Pellet-Größe auch 50 bis 200 µl) gelöst. Am nächsten Tag bestimmt man die Menge und die Reinheit der DNA-Präparation (2.2.7). Es wurde eine Stammlösung mit 1 µg/ µl hergestellt und diese bei -20° C gelagert.

2.2.10 Verwendete Primer

Die für diese Arbeit *designten* und synthetisierten Oligonukleotide sind in Tab. 2 aufgelistet.

Tab. 2: Verwendete Primer:

2 MATERIAL UND METHODEN

Intere Pri-mer-Nr.	Primer-Name	5'→3'Sequenz	Verwendet im Konstrukt
045	<i>R-rPrN-Terminus</i>	CAA GTC ACC CAG CAC ATA CTC CAG TGC TTA TAC CTG AGA T	RCC
049	<i>FcPr-Helix+C-Terminus</i>	TAT GTG CTG GGT GAC TTG ATC TCA GGT ATA AGC ACT GGA GTT ATG	RCC
071	<i>F-peGFPseq1</i>	GGA GTA TTT ACG GTA AAC TGC	GFP
072	<i>F-rPres1</i>	GAA GCA GGC ATT CAC GTG C	rPres
073	<i>F-rPres2</i>	GTA CAG TGG GAT CTT CTC AG	rPres
074	<i>F-rPres3</i>	GAA AGG AAT GTT CAT GCA GTT	rPres
075	<i>F-rPres4</i>	CAT AGC TAA CGC GAC TGT T	rPres
076	<i>F-cPres1</i>	TCG ATG CTC TTC TAA GAA AG	cPres
077	<i>F-cPres2</i>	CAT TGC TCT ATT GCT GAT TG	cPres
078	<i>F-cPres3</i>	ACT AGA CTA TGG TTT GCT TAC	cPres
079	<i>F-cPres4</i>	CAA ATG TCC ACT CTT TAA TTC T	cPres
086	<i>F-BstZ17I (r)</i>	CAT TGC TCT GCT CAC TGT GGT ATA CAG AAC ACA GAG	RRC
087	<i>R-BstZ17I (r)</i>	CTC TGT GTT CTG TAT ACC ACA GTG AGC AGA GCA ATG	RRC
090	<i>F-anti-BstZ17I (c)</i>	CCT GTC TTT CTG TAC ACT TTT TTT GGG ACC TC	CCR
091	<i>R-anti-BstZ17I (c)</i>	GAG GTC CCA AAA AAA GTG TAC AGA AAG ACA GG	CCR
092	<i>F-anti-BstZ17I (r)</i>	CTC CCT GAC ACC GAT GTT TAC ATT GAC ATT GAT G	CCR
093	<i>R-anti-BstZ17I (r)</i>	CAT CAA TGT CAA TGT AAA CAT CGG TGT CAG GGA G	CCR
096	<i>F-BstZ17I (c)</i>	CAT TTG CAA TGA TAA CCG TTG TAT ACA GAA CAC AAA GGC CTC	RRC
097	<i>R-BstZ17I (c)</i>	GAG GCC TTT GTG TTC TGT ATA CAA CGG TTA TCA TTG CAA ATG	RRC
110	<i>F-104+EcoRV-I</i>	GAG TAT GTG CTG GGT GAC GAG GTC TCG GGC ATA AG	CRR
111	<i>R-104+EcoRV-I</i>	CTT ATG CCC GAG ACC TCG TCA CCC AGC ACA TAC TC	CRR
126	<i>F-GH-BstZ17I</i>	ATT TGC AAT GAT AAC CGT TAT TTA CAG AAC ACA GAG TCC	CCR
127	<i>R-GH-BstZ17I</i>	GGA CTC TGT GTT CTG TAA ATA ACG GTT ATC ATT GCA AAT	CCR
135A	<i>F-165+EcoRV</i>	GGA ATA CTT ATT AGG AGA TGA TAT CTC AGG TAT AAG CAC TGG	CRR

2 MATERIAL UND METHODEN

136	<i>R-165+EcoRV</i>	TGA GAT ATC ATC TCC TAA TAA GTA TTC CTT CAC TGG GTA ACG	CRR
137	<i>F-104+EcoRV-II</i>	GGA GTA TGT GCT GGG TGA CGA TAT CTC GGG CAT AAG C	CRR
138	<i>R-104+EcoRV-II</i>	CCC CAG TGC TTA TGC CCG AGA TAT CGT CAC CCA	CRR
145	<i>F-CD-BstZ17I</i>	CAT TGC TCT GCT CAC TGT GAT ATA CAG AAC ACA AAG GCC TC	CRC, RRC
146	<i>R-CD-BstZ17I-SS</i>	GAG GCC TTT GTG TTC TGT ATA TCA CAG TGA GCA GAG CAA TG	CRC, RRC
151	<i>F-EF-EcoRV-I</i>	GGA ATA CTT ATT AGG AGA TAT TAT CTC GGG CAT AAG CAC TGG	CRR
152	<i>R-EF-EcoRV-I</i>	CCA GTG CTT ATG CCC GAG ATA ATA TCT CCT AAT AAG TAT TCC	CRR
153	<i>F-EF-EcoRV-II</i>	GGA ATA CTT ATT AGG AGA TAT TGT CTC GGG CAT AAG CAC TGG	CRR
154	<i>R-EF-EcoRV-II</i>	CCA GTG CTT ATG CCC GAG ACA ATA TCT CCT AAT AAG TAT TCC	CRR
163	<i>F-GH+EcoRV</i>	GGA ATA CTT ATT AGG AGA TGA TAT CTC AGG TAT AAG CAC TGG	RCR
164	<i>R-GH+EcoRV</i>	CCA GTG CTT ATA CCT GAG ATA TCA TCT CCT AAT AAG TAT TCC	RCR
165	<i>F-EF+BstZ17I</i>	CTC TGC TCA CTG TGG TAT ACA GAA CAC AGA GTC CGA GC	CRC
166	<i>R-EF+BstZ17I</i>	GCTCGGACTCTGTGTTCTGTATACCACAGTGAGCAGAG165	CRC
171	<i>F-RCR-EcoRV-I</i>	GAG TAT GTG CTG GGT GAC GAG ATC TCA GGT ATA AGC ACT G	RCR
172	<i>R-RCR-EcoRV-I</i>	CAG TGC TTA TAC CTG AGA TCT CGT CAC CCA GCA CAT ACT C	RCR
173	<i>F-RCR-EcoRV-II</i>	GTA TGT GCT GGG TGA CTT GAT CTC AGG TAT AAG CAC TGG AG	RCR
174	<i>R-RCR-EcoRV-II</i>	CTC CAG TGC TTA TAC CTG AGA TCA AGT CAC CCA GCA CAT AC	RCR
204	<i>F-Cav-WT</i>	GTG TAT GAC GCG CAC ACC AAG	Cav-1
205	<i>F-Cav-k.o.</i>	CTA GTG AGA CGT GCT ACT TCC	Cav-1
206	<i>R-Cav-common</i>	CTT GAG TTC TGT TAG CCC AG	Cav-1
/	<i>peGFP1for</i>	GAG CTG GTT TAG TGA ACC	RCC
/	<i>peGFP2rev</i>	CTT TGC TCA CCA TGG TG	RCC

2.2.11 Strategien zur Klonierung der Chimären aus rPres und cPres

Ausgangsmaterial für die Klonierung der chimären Konstrukte aus dem Pres-Orthologen der Wanderratte und des Huhns stellten *peGFP-N1*-Plasmide dar, in die die kodierende Nukleotid-Sequenz von rPres bzw. von cPres eingefügt worden war („Verwendete Plasmid-Konstrukte“ 2.2.1: Tab. 1). Das Design der Strategie und die Erstellung von genetischen Karten erfolgten mit Hilfe der *VectorNTI*-Software (*Invitrogen*). Alle eingesetzten Enzyme, Salze, Puffer und weite Zusätze wurden von der Firma *Fermentas/ Thermo Scientific* bezogen. Die Primer (Mit der Primer-Nummer in Klammern kann die Oligonukleotid-Sequenz des Primers in Abschnitt 2.2.10 „Verwendete Primer“ nachgeschlagen werden.) zur PCR-Amplifikation fertigte *Biomers* (www.biomers.net). Nach Abschluss der Klonierung wurden alle entstandenen Konstrukte mittels Sequenzierung (*Seqlab*, Göttingen) auf ihre Richtigkeit überprüft.

Die Struktur-Vorhersage basierte auf Gorbunov et al. (2014) und Geertsma et al. (2015). Für das Ratten-Orthologe wurde der N-Terminus mit den Aminosäuren 1 bis 84 und der C-Terminus auf 501 bis 744 festgelegt. Die Aminosäuren 1 bis 85 (N-) und 507 bis 743 (C-) bildeten die Termini von cPres.

Chimäre RCC mittels *overlap extension PCR*

- PCR-Amplifikation des rPres-N-Terminus: *peGFP1for* und *R-rPrN-Terminus* (045): 347 bp
- PCR-Amplifikation von cPres-TMD und -C-Terminus: *FcPr-Helix+C-Terminus* (049) und *peGFP2rev*: 2004 bp
- Denaturierung; Einzelstränge mit Klenow-^{exo}-Fragment auffüllen; Klenow-^{exo}-Fragment inaktivieren (75° C, 10 min)
- PCR mit *peGFP1for* und *peGFP2rev*, um rPres-N-Terminus mit cPres-TMD und cPres-C-Terminus zu fusionieren: 2351 bp
- Verdau mit *BmtI* und *AgeI*: schneidet terminal 32 bp bzw. 25 bp ab: 2296 bp
- Verdau von *peGFP-N1-Plasmid* (*GenBank Accession #U55762*, 4,7kb) mit *BmtI* und *AgeI*: 4662 bp
- Ligation: fusioniertes Insert (2296 bp) + Vektor (inkl. GFP) (4662 bp) = 6958 bp

Chimäre RRC durch Einfügen zusätzlicher Schnittstellen (SS)

- Einfügen einer *BstZ17I*-SS zwischen TMD und C-Terminus von rPres-GFP mittels Mutagenese-PCR über *F-BstZ17I(r)* (086) und *R-BstZ17I(r)* (087); Verdau mit *BmtI* und *BstZ17I*: 1564 bp (= rPres-N-Terminus + rPres-TMD)
- Einfügen einer *BstZ17I*-SS zwischen TMD und C-Terminus von cPres-GFP mittels Mutagenese-PCR über *F-BstZ17I(c)* (096) und *R-BstZ17I(c)* (097); Verdau mit *BmtI* und *BstZ17I*: 5379 bp (= cPres-C-Terminus + Vektor-Basis)
- Ligation: rPres-N-Terminus + rPres-TMD (1564 bp) + cPres-C-Terminus + Vektor-Basis (5379 bp) = 6943 bp
- Entfernen der eingefügten *BstZ17I*-SS mittels Mutagenese-PCR über *F-CD-BstZ17I* (145) und *R-CD-BstZ17I* (146)

Chimäre CCR durch Einfügen zusätzlicher Schnittstellen (SS)

- Einfügen einer *BstZ17I*-SS zwischen TMD und C-Terminus von cPres-GFP mittels Mutagenese-PCR über *F-BstZ17I(c)* (096) und *R-BstZ17I(c)* (097); Entfernung einer weiteren *BstZ127I*-SS im TMD-Bereich mittels Mutagenese-PCR über *F-anti-BstZ17I(c)* (090) und *R-anti-BstZ17I(c)* (091); Verdau mit *BmtI* und *BstZ17I*: 1546 bp (= cPres-C-Terminus + cPres-C-TMD)
- Einfügen einer *BstZ17I*-SS zwischen TMD und C-Terminus von rPres-GFP mittels Mutagenese-PCR über *F-BstZ17I(r)* (086) und *R-BstZ17I(r)* (087); Entfernung einer weiteren *BstZ17I*-SS im C-Terminus mittels Mutagenese-PCR über *F-anti-BstZ17I(r)* (092) und *R-anti-BstZ17I(r)* (093); Verdau mit *BmtI* und *BstZ17I*: 6158 bp (= rPres-C-Terminus + Vektor-Basis)
- Ligation von cPres-C-Terminus + cPres-C-TMD (1546 bp) + rPres-C-Terminus + Vektor-Basis (6158 bp) = 7704 bp
- Entfernen der eingeführten *BstZ17I*-SS zwischen TMD und C-Terminus mittels Mutagenese-PCR über *F-GH-BstZ17I* (126) und *R-GH-BstZ17I* (127)

Chimäre CRR durch Einfügen zusätzlicher Schnittstellen (SS)

- Einfügen einer *EcoRV*-SS zwischen N-Terminus und TMD von cPres mittels Mutagenese-PCR über *F-165+EcoRV* (135A) und *R-165+EcoRV* (136); Verdau mit *BmtI* und *EcoRV*: 283 bp (= N-Terminus von cPres)
- Einfügen einer *EcoRV*-SS zwischen N-Terminus und TMD von rPres mittels Mutagenese-PCR in zwei Schritten über *F-104+EcoRV-I* (110) und *R-104+EcoRV-I* (111) und *F-104+EcoRV-II* (137) und *R-104+EcoRV-II* (138); Verdau mit *BmtI* und *EcoRV*: 7406 bp (= TMD + C-Terminus von rPres)
- Ligation von N-Terminus von cPres (283 bp) + TMD + C-Terminus von cPres (7406 bp) = 7689 bp
- Entfernen der *EcoRV*-SS in zwei Schritten mittels Mutagenese-PCR über *F-EF-EcoRV-SS-I* (151) und *R-EF-EcoRV-SS-I* (152) und *F-EF-EcoRV-SS-II* (153) und *R-EF-EcoRV-SS-II* (154)

Chimäre CRC durch Einfügen zusätzlicher Schnittstellen (SS)

- Einfügen einer *BstZ17I*-SS in Chimäre CRR zwischen TMD und C-Terminus mittels Mutagenese-PCR über *F-EF+BstZ17I* (165) und *R-EF+BstZ17I* (166); Verdau mit *BstZ17I* und *BamHI*: 6199 bp (= cPres-N-Terminus + rPres-TMD)
- Einfügen einer *BstZ17I*-SS zwischen TMD und C-Terminus von cPres-GFP mittels Mutagenese-PCR über *F-BstZ17I(c)* (096) und *R-BstZ17I(c)* (097); Entfernung einer weiteren *BstZ127I*-SS im TMD-Bereich mittels Mutagenese-PCR über *F-anti-BstZ17I(c)* (090) und *R-anti-BstZ17I(c)* (091); Verdau mit *BstZ17I* und *BamHI*: 711 bp (= cPres-C-Terminus)
- Ligation von cPres-N-Terminus + rPres-TMD (6199 bp) + cPres-C-Terminus (711 bp) = 6910 bp
- Entfernen der *BstZ17I*-SS zwischen TMD und C-Terminus mittels Mutagenese-PCR über *F-CD-BstZ17I* (145) und *R-CD-BstZ17I* (146)

Chimäre RCR durch Einfügen zusätzlicher Schnittstellen (SS)

- Einfügen einer *EcoRV*-SS zwischen N-Terminus und TMD von rPres mittels Mutagenese-PCR in zwei Schritten über *F-104+EcoRV-I* (110) und *R-104+EcoRV-I* (111) und *F-104+EcoRV-II* (137) und *R-104+EcoRV-II* (138); Verdau mit *BmtI* und *EcoRV*: 316 bp (= N-Terminus von rPres)

- Einfügen einer *EcoRV*-SS zwischen N-Terminus und TMD von Chimäre CCR mittels Mutagenese-PCR über *F-GH-EcoRV* (163) und *F-GH-EcoRV* (164); Verdau mit *EcoRV* und *BmtI*: 7421 bp (= cPres-TMD + rPres-C-Terminus)
- Ligation von N-Terminus von rPres (316 bp) und cPres-TMD + rPres-C-Termin (7421 bp) = 7737 bp
- Entfernen der eingefügten SS zwischen N-Terminus und TMD in zwei Schritten mittels Mutagenese-PCR über *F-RCR-EcoRV-I* (171) und *R-RCR-EcoRV-I* (172) und *F-RCR-EcoRV-II* (173) und *R-RCR-EcoRV-II* (174)

2.3 Biochemische Versuche

2.3.1 Antikörper

Primär-Antikörper

- α Pres: Pres N-20, sc-22692, Herkunft Ziege, polyklonal, IgG, 200 μ g/ ml, Epitop: N-Terminus von humanem Pres, *Santa Cruz Biotechnology*
- α Cav-1: ab2910, Herkunft Kaninchen, polyklonal IgG, 100 μ g (1mg/ ml), Epitop: humanes Cav-1 aa 1-17, *Abcam*
- α Aktin (α Akt): β -Aktin C4, sc-47778, Herkunft Maus, monoklonal, IgG1, 200 μ g/ ml, *Santa Cruz Biotechnology*
- α KCNQ4: KCNQ4 H-130, sc-50417, Herkunft Kaninchen, polyklonal, IgG, 200 μ g/ ml, Epitop: aa 349-478: innenliegende Region des humanen KCNQ4, *Santa Cruz Biotechnology*
- α GFP: GFP (FL), sc-8334, Herkunft Kaninchen, polyklonal, IgG, 200 μ g/ ml, Epitop : aa 1-238 (gesamtes GFP von *Aequorea victoria*), *Santa Cruz Biotechnology*
- α GFP: GFP (FL) AC, sc-8334 AC, Herkunft Kaninchen, polyklonal, IgG, 500 μ g/ ml, Epitop : aa 1-238 (gesamtes GFP von *Aequorea victoria*), als Agarose-Konjugat für IPs, *Santa Cruz Biotechnology*

Sekundär-Antikörper

- α Kaninchen-Alexa Fluor 488, A11008, Herkunft Ziege, IgG, *Life Technologies*
- α Ziege-Alexa Fluor 568, A11057, Herkunft Esel, IgG, *Life Technologies*
- α Kaninchen-IRDye 800CW, 926-32213, Herkunft Esel, IgG, 0,5 mg, *Li-cor Biosciences*
- α Maus-IRDye 800CW, 926-32212, Herkunft Esel, IgG, 0,5 mg, *Li-cor Biosciences*

2.3.2 Ernte von Säugerzellen und deren Aufschluss/ Lysat-Präparation

Ziel des Zellaufschlusses ist es, biologische Substanzen, welche nicht von den Zellen abgesondert werden, freizusetzen und zu isolieren: Um die exprimierten Membranproteine analysieren zu können, wurden HEK293-Zellen und deren Derivate geerntet: Pro Ansatz wurden dafür 2 konfluent gewachsene Kulturschalen (\varnothing 60 mm) verwendet. Man wusch die Zellen vorsichtig für 2 min mit sterilem, eiskaltem PBS, schabte sie mit einem sterilen Zellkratzer (*Greiner bio-one* 541070) in 2 ml PBS ab und nahm sie in einem 15 ml-Falcon auf. Die Zellen wurden für 5 min bei 1500 g und 4° C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde nun in 2 ml eiskaltem Lysis-Puffer (50 mM TrisHCl (pH 7.6) (*Trisma base*® T1503 *Sigma*), 1 mM

EDTA (*Fluka* 03680)) mit 10 µl Proteaseinhibitor-Cocktail (*Sigma* P8340) aufgenommen und auf Eis resuspendiert (→ 2.3.3).

2.3.3 Homogenisieren der Zellen

Mit dem Ultraschallgerät (*Branson Sonifier Cell Disruptor B15*, Einstellungen: 20 % *duty cycle*, *pulsed*, *output control* 7) erfolgte das mechanische Homogenisieren der Zellen für 2x 10 sec in Eiswasser. Beim Ultraschall-Verfahren gehen aus einer Hochfrequenz mechanische Schwingungen hervor. Diese resultieren in Kavitationskräften: Die Scher- und Prallkräfte zerreißen die Membranen, chromosomale DNA bricht aufgrund mechanischer Eigenschwingungen (→ 2.3.4).

2.3.4 Präparation von nativen Membranen

Nach der Ultraschall-Behandlung wurden die Lysate für 10 min auf Eis gestellt und danach für 5 min bei 1500 g und 4° C erneut zentrifugiert. Dabei pelletierten nicht homogenisierte Zellen. Der Überstand enthielt das Zelllysat. Dieses wurde in vorgekühlte 2ml-Reaktionsgefäße überführt und zur Abtrennung der Membran-Fraktion für 30 min bei 21000 g und 4° C zentrifugiert. Der Überstand, der die löslichen Proteine enthielt, wurde dekantiert (→ 2.3.5).

2.3.5 Solubilisierung der Membranproteine

Das Membran-Pellet wurde in 0,2 ml eiskaltem Membran-Pellet-Puffer mit 5 µl Proteinase-Inhibitor-Cocktail aufgenommen.

Membran-Pellet-Puffer

- 50 mM TrisHCl (*Trizma base*® *Sigma* T1503-1kg)
- 1 mM EDTA (*Gerbu* 1034)
- 150 mM NaCl (*Merck* 1.06404.1000)
- 10 mM Iodoacetamid (*Sigma* I6125.25G)
- 1 % Triton (*Roth* 3051.3)
- 0,5 % SDS (SDS-Pellets *Roth* CN30.2)

Die Membranen sind schwer löslich und wurden durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vom Reaktionsgefäß gelöst. Es folgte eine einstündige Inkubation zur Solubilisierung der Membranproteine unter leichtem Schütteln auf Eis. Die Lösung wurde hernach erneut für 30 min bei 21000 g und 4° C zur Abtrennung der Membranen zentrifugiert. Die aus den Membranen gelösten Proteine befanden sich nun im Überstand. Dieses Membranprotein-Lysat wurden in ein frisches 0,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Mittels einer Proteinbestimmung nach Bradford wurden die gelösten Proteine quantitativ bestimmt (2.3.6). Zur weiteren Lagerung wurden die Proben bei -20° C eingefroren.

2.3.6 Bestimmung einer Proteinmenge mittels *Bradford-Reagenz*

Die *Bradford*-Bestimmung ist eine spektroskopische Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinen in einer Lösung. Ihre Vorteile liegen in der hohen Sensitivität (Die Nachweisgrenze liegt zwischen 0,05 und 0,5 µg/ ml.) und der einfachen und schnellen Durchführung. Je nach Komposition des Proteingemisches können für gleiche Proteinmengen jedoch unterschiedliche Resultate erhalten werden. Vorausgesetzt der für die Eichung verwendete Standard hat ein annähernd gleiches Gehalt an basischen Aminosäuren wie die unbekannte Proteinlösung, kann die Konzentration der unbekannteten Proteinlösung akkurat bestimmt werden.

Basis der *Bradford*-Bestimmung ist der Comassie-Farbstoff. Er hat in ungebundener Form (rot, protoniert und kationisch) im Absorptionsspektrum ein Maximum bei 470 nm. Im sauren Milieu formiert er aber mit kationischen und polaren Seitenketten von Aminosäuren Komplexe; der Farbstoff bindet besonders an Arginyl- und Lysyl-Reste, aber auch Histidin und Tryptophan. Tyrosin und Phenylalanin tragen zur Komplex-Stabilisierung bei. Die entstehenden Farbstoff-Proteinkomplexe stabilisieren den Farbstoff in seiner anionischen Sulfat-Form (blaue Farbe, unprotoniert). Dadurch verschiebt sich sein Absorptionsmaximum auf 595 nm. Gegen das freie Farbreagenz spektroskopisch gemessen, ist die Absorption ein Maß für die Proteinkonzentration der analysierten Lösung (Bradford 1976).

Herstellung einer *Bradford*-Lösung

- 50 mg Comassie-Brillant-Blau G-250 (0,01 % w/v, A3480.0025, *AppliChem*)
- 23,75 ml Ethanol abs. (4,75 % v/v, 5054.4, *Roth*)
- ad 50 ml 85 % ortho-Phosphorsäure (10 % v/v, 9079.1, *Roth*)
- ad 500 ml *Aqua dest.*

Die Lösung wurde durch einen Faltenfilter (*Schleicher & Schüll*, 595 ½, Ø 320mm, 311653) gegossen, anschließend licht-dicht in Alufolie verpackt und bei 4° C gelagert.

Kalibrierung

Da die Konzentration eines Proteingemisches analysiert werden sollte, wurde Rinder-Serum-Albumin (BSA Fraktion V A1391.0025, *AppliChem*) als Standard zur Kalibration genutzt: Zuerst wurde eine BSA-Stamm-Lösung mit einer Konzentration von 1 mg/ ml hergestellt. Diese wurde dann zur Doppelbestimmung in 0,15 M NaCl (*Merck* 1.06404.1000) weiter verdünnt:

Konzentration des Standard-proteins [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	Volumen [μl]	Gesamtprotein in der BSA Verdünnung [μg]
• 0	40	0
• 0,15	40	6
• 0,3	40	12
• 0,45	40	18
• 0,75	40	30
• 1	40	40
• 1,25	40	50
• 1,5	40	60

40 μl jeder Verdünnung wurden in eine Einweg-Halbmikroküvette (613101, *Greiner bio-one*) gegeben. Danach wurde jeweils 1 ml *Bradford*-Reagenz hinzugefügt, gut gemischt und 5 min zur Ausbildung der Komplexe (RT) inkubiert. Die Absorption wurde bei 595 nm in einem UV-Spektrophotometer (*SmartSpec Plus, BioRad 273 BR 04216*) bestimmt. Aus dem gemittelten Absorptionswert für jede Konzentration legte man einer Kalibrationskurve an: Dafür trug man die Absorption (auf der y-Achse) als Funktion des Gesamtproteins (in μg auf der x-Achse) auf. Die Kalkulation wurde mit einer linearen Regression durchgeführt.

Bestimmung des Proteingehalts eines Lysats mit unbekannter Konzentration

40 μl NaCl (0,15 M) wurden in einer Halbmikro-Küvette vorgelegt. Von dem zu bestimmenden Lysat wurden 2 μl und vom *Bradford*-Reagenz 1,0 ml hinzugegeben. Dieser Ansatz wurde kurz gevortext und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Proteingehalt bei 595 nm spektroskopisch gegen einen Leer-Wert (ohne Protein, nur NaCl und *Bradford*-Reagenz) bestimmt. Aus der Formel für die Standardkurve wurde das Proteingehalt berechnet (\rightarrow 2.3.7).

2.3.7 Probenvorbereitung für die SDS-PAGE

Strukturveränderungen von Molekülen bezeichnet man als Denaturierung. Die Primärstruktur bleibt in der Regel unangetastet. Damit Proteine im SDS-Gel entsprechend ihrer Molekülmasse (als linearisierte Moleküle) aufgetrennt werden können, müssen die Strukturen höherer Ordnung aufgebrochen werden. Eine Hitzedenaturierung ermöglicht es, Sekundär-, Tertiär- und Quartär-Strukturen innerhalb von Proteinen aufzulösen. Durch die Wärmeenergie-Zufuhr werden die einzelnen Aminosäuren bzw. die ganze Molekülkette so in Schwingungen versetzt, dass nicht-kovalente Bindungen und Kräfte (ionische, polare und Van-der-Waals-Wechselwirkungen, hydrophobe Effekte, Wasserstoffbrückenbindungen) zwischen den verschiedenen Bereichen des Moleküls aufgehoben werden. Kovalente Bindungen werden regulär nicht gespalten. Eine Ausnahme bilden Disulfid-Brückenbindungen. Sie werden meistens durch Reduktion (zu Thiolen) gespalten. Das anionische Detergenz SDS unterstützt in hohen Konzentrationen den Denaturierungsprozess von Proteinen.

Die Denaturierung von Proteinen erfolgte in 3x *Lämmli*-Puffer. 100 ml wurden folgendermaßen angesetzt:

- 6% w/v SDS (SDS-Pellets, *Roth* CN30.2,) 6 g
- 30% v/v Glyzerol (*Roth* 3783.1) 30 ml
- 150 mM Tris (*Trizma base*®, *Sigma* T1503-1KG,), pH 6.8 1,8171g
- 0.02% w/v Bromphenol Blau (*Sigma* B0126-25G,) 0,02 g

Für die Herstellung von 3x *Lämmli*-Puffers löste man zuerst Tris und SDS in 50 ml H₂O und stellte den pH-Wert ein. Nun wurde der Ansatz auf 70 ml mit H₂O und nachfolgend mit Glyzerol auf 100 ml aufgefüllt werden. Abschließend wird das Bromphenol Blau gelöst. Der Puffer wurde bei RT gelagert.

Der Auftrags-*Lämmli*-Puffer wird direkt vor Gebrauch auf Eis vorbereitet: Zu 100 µl 3x *Lämmli*-Puffer werden pipettiert:

- 17,5 µl DTT (Dithiothreitol, 1M, Aliquots bei -20° C gelagert, *Thermo Scientific* R0861)
- 17,5 µl 20%iges SDS.

Zu 30 µl Probe wurden 10 µl Auftrags-*Lämmli*-Puffer gegeben. Die Proben wurden kurz gevortext, sofort bei 95° C und bis zum Gelauftrag (2.3.9) bei 4° C gelagert.

2.3.8 Ko-Immunopräzipitation (KoIP)

Die Immunopräzipitation (IP) ist eine Methode, die die Aufreinigung und Aufkonzentration von Proteinen ermöglicht. Ein Antikörper zum gewünschten Protein wird mit einem Zellextrakt inkubiert. Der entstehende Antigen-Antikörper-Komplex wird nun mit Hilfe einer festen Matrix, z.B. Protein A/ G-beschichteten Agarose-Kügelchen, aus dem Extrakt gezogen. Somit wird das Wunschprotein isoliert und kann elektrophoretisch in einer *SDS-PAGE* aufgetrennt und im *Western Blot* detektiert werden.

Die IP von intakten Proteinkomplexen wird Ko-Immunopräzipitation (KoIP) genannt. Sie stellt eine Methode dar, um Protein-Protein-Interaktion zu analysieren. Hier wird ein Antikörper gegen ein bekanntes Zielprotein genutzt, von dem angenommen wird, im Komplex vorzuliegen. Absicht ist es, mit Hilfe eines Antikörpers den gesamten Komplex aus dem Extrakt zu ziehen und dessen unbekannte Komponenten zu identifizieren.

Kopplung der Antikörper an die Protein A-Agarose-Kügelchen

Als Affinitätsmatrix für die Isolation von Immunkomplexen wurde mit Protein A beschichteten Agarose-Kügelchen (9863S, *Cell Signaling Technologies*) gearbeitet. Dabei ist Protein A kovalent an die Kügelchen gebunden und stellt seine hohe Affinität für verschiedene Subklassen von

Immunoglobulin G von vielen Spezies zur Verfügung. Protein A bindet nicht-kovalent an die F_c-Region der Immunglobuline.

Die KoIP wurde mit einem Cav-1- (α Cav-1), einem GFP- (α Pres-GFP), einem KCNQ4- (α KCNQ4) und einem β -Aktin- (α -Akt) spezifischen Antikörper durchgeführt. Der α GFP-Antikörper wurde bereits als Agarose-Konjugat vom Hersteller *Santa Cruz Biotechnology* (sc-8334 AC) bezogen. Die übrigen Antikörper wurden an die Agarose-Kügelchen gekoppelt: Mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze wurden pro Ansatz (pro KoIP) 20 μ l Protein A-Agarose-Kügelchen aufgenommen und in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß vorgelegt. Hinzu wurden 5 μ l Antikörper pipettiert (von α Cav nur 1 μ l). Dieser Mix wurde für 4 h bei 4° C unter sanfter Rotation inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde jeder Ansatz mit 500 μ l kaltem Lysis-Puffer (2.3.2) gewaschen und 2 min bei 3000 g bei 4° C zentrifugiert. Den Überstand pipettierte man vorsichtig ab und verwarf ihn. Dieser Waschschrift wurde anschließend noch zweimal wiederholt.

Immunpräzipitation

Für die IP wurden zu diesen Protein A-Agarose-Antikörper-Konjugaten pro Ansatz 350 μ g Zellysats (ein Ansatz entspricht einer Ladeprobe auf dem SDS-Gel \rightarrow 4 x 350 μ g = 1400 μ g, da alle 4 Antikörper im *Western Blot* eingesetzt werden; der Input entspricht 10 % eines Ansatzes: also 35 μ g Protein) gegeben und über Nacht bei 4° C unter sanfter Rotation zur Anreicherung des Zielproteins der Antikörper inkubiert.

Waschen der Immun-Präzipitate

Die an den Antikörpern gebundenen Proteinkomplexe aus dem Lysat zentrifugierte man 2 min bei 3000 g (4° C), pipettierte den Überstand mit dem ungebundenen Lysat vorsichtig ab und verwarf ihn. Die Präzipitate wusch man in 500 μ l Lysis-Puffer (+ 2 μ l Proteaseinhibitor-Cocktail) durch fünfminütige sanfte Rotation, zentrifugierte erneut (2 min bei 3000 g, 4° C) und nahm den Überstand ab. Dieser Waschschrift wurde noch zweimal wiederholt.

Elution der Protein-Komplexe

In dieser Arbeit wurde die relativ harsche SDS-Puffer-Elution angewandt: Die Elution erfolgte in Gegenwart von SDS durch Erhitzen. Hierbei werden nicht-kovalent gebundene Antikörper wie auch Antikörper-Fragmente mit dem Zielproteine gelöst. Der Vorteil dieser Elutionsmethode zeigte sich in seiner hohen Effizienz.

Zum Lösen der gebundenen Komplexe wurden 40 μ l 2x SDS-*Lämmli*-Puffer (ohne DTT) zu jedem Ansatz gegeben. Diese wurden für 10 min bei 50° C erhitzt. Die Protein A-Agarosekügelchen pelletierte man nun bei 3000 g für 2 min und nahm den Überstand, der die

gelösten Protein-Komplexe enthielt, in ein frisches 0,5ml-Reaktionsgefäß ab. Die Proben wurden anschließend für 5 min bei 95° C denaturiert und bis zu ihrer Analyse im SDS-Gel/ *Western Blot* bei 4° C aufbewahrt (2.3.9).

Da methodisch bedingt ein Teil der Antikörper (Gesamt-MW 150 kDa) gelöst wird und diese Bande sich mit der Bande für Pres (MW in HEK-Zellen durch Glykosylierung und den GFP-Marker ca. 130 kDa) im *Western Blot* überlagern könnte, wurden den Ko-IP-Ansätzen der α Cav-, α Akt- und α KCNQ4 als IP-Antikörper zum 2x SDS-*Lämmli*-Puffer 1,7 μ l DTT (Dithiothreitol, 1M) zugegeben. DTT wirkt als Reduktionsmittel für Disulfid-Brücken in der Antikörperstruktur. Folglich wurden bei DTT-behandelten Proben im *Western Blot* Antikörperbanden entsprechend ihrer Kettenlänge (50 und 22 kDa) erwartet, diese deckten sich nicht mit der für Pres erwarteten Bande.

KoIP-Ansätzen mit dem α GFP-Antikörper wurde kein DTT zugefügt, um genau diesen Effekt zu umgehen: Cav-1 hat ein MW von 20 kDa. Diese Bande würde sich nach Spaltung der Disulfid-Brücken mit der leichten Kette des IP-Antikörpers im *Western Blot* überlagern. Ebenso wurde beim Akt- (vorhergesagte Größe 43 kDa; tatsächliche Größe im Gel \approx 50 kDa) und KCNQ4- (vorhergesagte Größe 77 kDa; tatsächliche Größe \approx 90 kDa) Nachweis in der α GFP-KoIP verfahren.

2.3.9 SDS-PAGE

SDS-PAGE ist die Abkürzung für Natriumdodezylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) und bezeichnet eine Methode zur Trennung von Proteinen nach ihrer Molekülmasse in einem elektrischen Feld. Als Trennmedium dient ein diskontinuierliches Gel auf der Grundlage von Polyacrylamid und SDS. Das anionische Detergenz SDS wird hierbei im Überschuss eingesetzt, um die Eigenladung der Proteine zu überdecken und die Proteine einzuhüllen. Somit weisen die Proteine durchgängig eine negative Ladung auf und wandern alle in dieselbe Richtung. Durch das zusätzliche Denaturieren der Lysate werden Sekundär- und Tertiärstrukturen wie auch Wasserstoffbrücken aufgebrochen. Die Proteine laufen infolgedessen als linearisierte Moleküle im Gel. Da nun bei allen Proteinen das gleiche Ladung-Masse-Verhältnis vorliegt und die Wanderung im elektrischen Feld nicht mehr von der Ladung abhängt, ermöglicht die *SDS-PAGE* die Auftrennung der Proteine nach der Molekülgröße bzw. ihrer Kettenlänge.

Als Gelmatrix wird Polyacrylamid verwendet. Polyacrylamid wird aus den giftigen Monomeren Acrylamid und N,N'-Methylen-bisacrylamid, sowie aus N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED, als Katalysator) und Ammoniumperoxidsulfat (APS) hergestellt. In einer radikalischen Reaktion mit APS als Auslöser wird ein vernetztes Polymer gebildet. Der Vernetzungs-

grad und damit die Porengröße sind hauptsächlich von der Acrylamid-Konzentration des Gels abhängig.

Arbeitet man unter reduzierenden Bedingungen (Erhitzen, Zugabe von DTT), so werden die Disulfid-Brücken der Proteine gespalten. Man spricht von einer reduzierenden *SDS-PAGE*. In der Denaturierung besteht der Nachteil der Methode, denn dadurch gehen die spezifischen Eigenschaften der Proteine verloren und darauf beruhende Nachweismethoden (z.B. Aktivitätstests) können nicht mehr durchgeführt werden.

Diskontinuierliche Protein-Elektrophorese im SDS-Polyacrylamid-Gel

Um die Trennschärfe zu erhöhen, wird häufig mit einem diskontinuierlichen Trenn-Medium gearbeitet. Hierbei werden zwei verschiedene Gele verwendet, Sammelgel und Trenngel, und drei verschiedene Puffer, Sammel-, Trenn- und Elektroden-Puffer.

Die Probe wird hierbei nicht direkt in das Trenngel aufgetragen, sondern in ein zweites, aufpolymerisiertes Sammelgel. Dieses Sammelgel mit großer Polyacrylamid-Porenweite dient der Vortrennung und Aufkonzentration der Proteine. Der Sammelgel-Puffer (TrisHCl pH=6.8) enthält Chlorid-Ionen als negativ geladene Leit-Ionen, deren elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit höher ist als die der Proteinprobe. Der Elektroden-Puffer enthält Glyzin-Ionen (als Zwitterion vorliegendes, neutrales Folge-Ion), deren elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit niedriger ist. Das Aufkonzentrieren der Proteine zwischen den Chlorid-Ionen hoher Mobilität und Glyzin-Ionen niedriger Mobilität entsprechend ihrer Geschwindigkeit im Feldstärke-Gradienten bezeichnet man als *stacking*. Die SDS-Protein-Komplexe besitzen eine mittlere Mobilität: Sie wandern alle in einer scharfen Bande zwischen den Leit- und Folge-Ionen, mit gleicher Geschwindigkeit zum Trenngel. Bei Erreichen des Trenngels ändern sich der pH (auf 8.8), die Porengröße und die Salzkonzentration. Die großen Proteine werden an der Gelgrenze vorläufig zurückgehalten, sodass die Glyzin-Ionen passieren können: Aufgrund der pH-Änderung liegt das Glyzin hier nun negativ geladen vor, so dass es die Proteine überholt und das *stacking* aufgehoben wird. Entsprechend der Porengröße wandern die SDS-Protein-Komplexe im Trenngel unterschiedlich schnell und werden durch den Siebeffekt nach ihrer molekularen Größe aufgetrennt.

Gießen eines SDS-Gels zur Auftrennung der Proteine

Es wurde das Gelelektrophorese-System der Firma *BIO-RAD (Mini PROTEAN Tetra System 165-8001EDU)* genutzt. Dessen Glasplatten wurden mit Steril-Wasser gereinigt, mit Ethanol entfettet und in die dafür vorgesehene Gel-*Casting*-Apparatur geklemmt.

Für das Trenngel wurden 10 oder 12%ige Acrylamid-Lösung folgendermaßen vorbereitet: Acrylamidlösung, Trenngel-Puffer sowie Wasser wurden in einem 50 ml-*Falcon* zusammengegeben. Dann fügte man SDS, APS (Aliquots bei -20°C) sowie TEMED (zuletzt) hinzu. Die Lösung wurde nun vorsichtig gemischt, zwischen die Glas-Platten gegossen und sofort mit Isopropanol (6752.4, *Roth*) zur Ausbildung einer scharfen Grenzfläche überschichtet. Die Lösung ließ man zirka 30 min bei RT auspolymerisieren. Hernach wurde die über dem Gel befindliche Flüssigkeit abgegossen und mit Wasser gespült. Nun wurde die Sammelgel-Lösung zubereitet, auf das Trenngel gefüllt und der Kamm (1653359, *BIO-RAD*) eingesetzt. Das Sammelgel wird zur Polymerisation ebenfalls zirka 30 min bei RT stehen gelassen.

Trenngel-Lösung (Ansatz für 4 kleine Gele)	10 %	12 %	%
• Wasser	12,3	9,9	ml
• Acrylamid/ N, N'-Methylen-bisacrylamid (<i>Roth A124.2</i>)	10,3	12,0	ml
• 1,5 M Tris pH 8.8 (<i>Trizma base® Sigma T1503-1KG,</i>)	7,7	7,7	ml
• 10 % SDS (<i>Roth CN30.2</i>)	310	310	µl
• TEMED (<i>Roth 2367.3</i>)	23	23	µl
• 10 % APS (<i>Roth 9592.2</i>)	310	310	µl

Sammelgel-Lösung

• Wasser	15,6	ml
• Acrylamid/ N, N'-Methylen-bisacrylamid	3,9	ml
• 1,5 M Tris pH 6.8	2,9	ml
• 10 % SDS	230	µl
• TEMED	23	µl
• 10 % APS	230	µl

Probenauftrag und Gellauf

Die hitze-denaturierten Proben (2.3.7) wurden vor dem Auftragen auf das Gel für 5 min bei 10.000 g zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile abzutrennen. Der Kamm wurde aus dem polymerisierten Gel vorsichtig entfernt. Als MW-Vergleich wurde pro Gel mindestens in einer Spur eine Standard-Proteinmischung (2,5 µl, *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder*, 26619, *Thermo Scientific*) aufgetragen. Entsprechend den Herstellerangaben wurde die Gel-Kassette in die Elektrophorese-Apparatur eingebaut. Die Elektroden-Kammern füllt man mit 1x SDS-Elektroden-Puffer.

Herstellung von 10x SDS-Elektroden-Puffer:	ad 1	1 H₂O
• Tris	30	g
• Glyzin (<i>Roth 3790.3</i>)	150	g
• SDS	10	g

Luftblasen in den Probentaschen entfernte man mit einer *Hamilton*-Spritze. Die Proben wurden durch den Elektroden-Puffer hindurch mittels Pipetten mit Einmalspitzen (*Gel Load Pipette*

Tips 770 290, Greiner Bio-One) in die Taschen eingetragen. Nicht benötigte Probenaschen wurden mit gleichem Volumen *Lämmli*-Puffer beladen, um ein Ausbreiten der Proben in benachbarte Spuren zu vermeiden. Abschließend wurden die Elektroden mit dem Stromversorgungsgerät (*Consort E835*) verbunden: Die Elektrophorese wurde zunächst bei 20 mA pro Gel (bzw. 80 V) gestartet. Nach beginnender Auftrennung des Standards erhöhte man die Spannung auf 120 V. Sobald die Bromphenolblau-Front den unteren Gelrand erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet. Das Gel wurde vorsichtig aus der Kammer und den Glasplatten entnommen und zum Transfer der Proteine auf eine Membran verwendet (2.3.10).

2.3.10 Transfer der Proteine auf eine Membran im *Western Blot*-Verfahren

Als *Western Blotten* bezeichnet man den Transfer von Proteinen aus der Gelmatrix auf eine Trägermembran aus Polyvinylidenfluorid (PVDF), Nylon, Glasfaser oder wie hier aus Nitrozellulose (*PROTRAN BA 85, 045 µm, Whatman*). Der Transfer erfolgt durch das Anlegen einer Spannung in Puffertanks als *Tank Blot* oder im halbtrockenen *semi-dry Blot* mit puffergesättigten Filterpapieren. Der *Western Blot* ermöglicht es, Proteine mit Antikörpern, die an die immobilisierten Proteine binden, zu identifizieren.

In dieser Arbeit wurde mit dem *Tank Blot*-Verfahren gearbeitet. Der Transfer erfolgte in einem vertikalen Puffertank zwischen Elektroden, die an den Seitenwänden befestigt waren. Es wurde ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt, wodurch die zu transferierenden Moleküle sich im Puffer lösten und in dessen Strom in Richtung der Anode wanderten. Das elektrische Feld zog die geladenen Moleküle aus der Gelmatrix auf die Nitrozellulose-Membran. Die Proteine hafteten dort durch ionische und polare Wechselwirkungen.

Aufbau eines *Blot-Sandwiches*

Der *Western Blot*-Puffer nach *Bjerrum Schaefer-Nielsen* enthält Tris, Glyzin und Methanol. Methanol aktiviert die Membran und erhöht deren Bindungskapazität. Glyzin ist durch seine Ladung ein gutes Laufmittel und Tris stabilisiert den pH-Wert.

Herstellung von 10x Transfer-Puffer

ad 1 1 H₂O

- | | | | | | |
|--|--|------|---|-----|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • Tris • Glyzin | <table border="0"> <tr> <td style="padding-right: 10px;">30,3</td> <td style="padding-right: 10px;">g</td> </tr> <tr> <td>144</td> <td>g</td> </tr> </table> | 30,3 | g | 144 | g |
| 30,3 | g | | | | |
| 144 | g | | | | |

Zuerst wurde der 1x Transfer-Puffer (100 ml Methanol (*Roth 8388.6*), 100 ml 10x Transfer-Puffer, 800 ml Wasser) vorbereitet und für einige Stunden kalt gestellt. Das Gel wurde nach der Elektrophorese aus den Glasplatten gelöst, das Sammelgel abgetrennt. Die Transfer-Kassette wurde in eine flache Schale mit 1x Transfer-Puffer hineingelegt. Nun wurden 2 Blatt Filterpapier (*Gel Blotting Papier GB 004 426994, Schleicher & Schuell*) mit Transfer-Puffer getränkt

und auf die schwarze, später der Kathode zugewandten Seite gelegt. Darauf wurde das Gel platziert. Die Transfer-Membran wurde erst in Wasser, dann in Transfer-Puffer kurz äquilibriert und schließlich luftblasenfrei auf das Gel geschichtet. Darauf legte man 2 Lagen in 1x Transfer-Puffer getränktes Filterpapier. Dieses *Blot Sandwich* wurde nun geschlossen und unter Beachtung der korrekten Orientierung der Kassette in die *Blot*-Apparatur eingesetzt (Anode weiß; Kathode schwarz: die negativ geladenen Proteine wandern von der Kathode in Richtung Anode). Der 1x Transfer-Puffer und ein *cooling pack* wurden daraufhin eingefüllt. Eine homogene Temperatur innerhalb der Puffer-Kammer konnte erreicht werden, wenn der *Blot* auf Eis unter Rühren durchgeführt wird. Die Apparatur wurde mit 110 V für 1 h 10 min an den Stromversorger angeschlossen. Nach Beendigung des Protein-Übertrags wurde die Transfer-Kassette geöffnet und die Membran blockiert.

Blockieren der Membran

Um die freien, unspezifischen Protein-Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren, (Die Antikörper würden sich sonst auch an diese Bindungsstellen heften und einen spezifischen Nachweis der Antigene unmöglich machen würden.) wurde die Membran mittels Pinzette in eine Blocklösung aus 5 % Milchpulver (*Roth T145.3*) in PBS-T überführt. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 4° C und sanftem Schütteln inkubiert.

Herstellung von 20x PBS:

- NaCl
- KCl
- Na₂HPO₄ * 2H₂O
- KH₂PO₄

ad 1 1 H₂O

160,2	g
4	g
35,6	g
5,4	g

Herstellung von 1x PBS:

- 50 ml 20x PBS ad 1 l H₂O, pH 7.4 (pH-Meter: 761 *Calimatic, Knick*)

Herstellung von 1x PBS-T:

- 1 l 1x PBS + 500 µl Tween20 (A4974,0250, *AppliChem*)

2.3.11 Markierung von Proteinen auf der Membran (*Immunoblot*)

Zur Detektion von Proteinen auf der Membran lassen sich verschiedene Verfahren verwenden, die entweder auf der spezifischen Bindung eines Antikörpers an das gesuchte Protein (*Immunoblot*) oder dem Anfärben aller Proteine auf der Membran basieren. Proteine können auch *in vivo* oder *in vitro* radioaktiv markiert und nach dem Transfer durch das Auflegen eines Röntgenfilms visualisiert werden. Hier wurden *Immunoblots* durchgeführt.

Die *Blot*-Membran wurde mit einer verdünnten Primär-Antikörper-Lösung behandelt, wobei jeder Antikörper spezifisch gegen ein Protein auf der Membran gerichtet war. Es wurden folgende Verdünnungen der Primär-Antikörper (2.3.1) in PBS-T angesetzt:

• Pres-GFP	α -GFP-Antikörper	1:200
• Cav-1	α -Cav-1-Antikörper	1:1000
• Aktin	α - β Aktin-Antikörper	1:200
• KCNQ4	α -KCNQ4-Antikörper	1:200

Die Inkubation mit den Antikörpern erfolgte in einem Volumen von 1,5 ml für 2 h in 50 ml-*Falcons* unter Rotation im Rolltaumler (RM5-80V, CAT, Zipperer) bei RT. Anschließend wusch man den *Blot* 3 Mal für 5 min in PBS-T unter sanftem Schwenken (*UNIMAX 1010DT*, 543 12310 00 0, *Heidolph*), um unspezifisch gebundene oder schwächer haftende Antikörper von der Membran zu entfernen.

Danach wurde die Sekundär-Antikörper-Lösung auf die Membran gegeben. Diese Antikörper sind spezifisch gegen bestimmte Bereiche des ersten Antikörpers gerichtet, in der Regel die F_c-Region des Antikörpers. Die *IRDye 800CW*-Sekundär-Antikörper (2.3.1) wurden folgendermaßen im PBS-T verdünnt:

Primär-Antikörper	Sekundär-Antikörper	Verdünnung
• α Cav-1	<i>IRDye 800CW</i> α -Kaninchen	1:10.000
• α GFP (Pres-GFP)	<i>IRDye 800CW</i> α -Kaninchen	1:10.000
• α KCNQ4	<i>IRDye 800CW</i> α -Kaninchen	1:10.000
• $\alpha\beta$ Akt	<i>IRDye 800CW</i> α -Maus	1:10.000

Die Inkubation erfolgte ebenfalls im Dunkeln für 2 h bei RT. Folgend wurde die Membran erneut 3 Mal in PBS-T und einmal in PBS gewaschen. Abschließend wurde sie getrocknet und bis zur Visualisierung dunkel gelagert.

Visualisierung der Proteine auf der *Blot*-Membran via *Li-cor*

Die Detektion erfolgte im *Odyssey Sa Infrared Imaging System* (OSA-0136, *Li-cor*) mittels Infrarot(IR)-Fluoreszenz. Starke und schwache Proteinbanden können hier auf dem gleichen *Blot* nachgewiesen werden, ohne Mehrfach-Belichtungen durchführen zu müssen. Ein weiterer Vorteil des Systems liegt in seiner hohen Sensitivität, denn die Membran wie auch Biomoleküle (z.B. die Blockmilch-Proteine) weisen im IR-Bereich eine extrem geringe Autofluoreszenz auf. Die verwendeten Sekundär-Antikörper waren direkt mit IR-Fluorophoren gekoppelt, dem *IRDye800CW* mit einer Exzitation bei 778 nm und einer Emission bei 806 nm. Der Protein-Standard *PageRuler Plus Protein Ladder* (*Thermo Scientific*, 26619) trägt blaue (außer 70 kDa und 25 kDa) und orange-farbene Chromophoren (70 kDa- und 25 kDa-Referenzbande). Diese Farbstoffe werden beim *Blot* ebenfalls auf die Membran übertragen. Die blauen Farbstoffe kön-

nen im IR-Bereich angeregt und mit dem *Li-cor-Scanner* über den Kanal IR700 detektiert werden.

Zur Visualisierung wurde die Membran in den *Li-cor-Scanner* eingelegt (Protein-Seite nach unten), das *Odyssey*-Programm gestartet und die Detektionskanäle IR700 und IR800 gewählt. Es wurde mit 5 Intensitäts-Einheiten gestartet und bei Bedarf angepasst.

2.3.12 Immunhistochemie

In der Immunhistochemie (IHC) nutzt man die Spezifität von Antikörpern, um die Verteilung von bestimmten Antigenen an histologischen Präparaten sichtbar zu machen. Wenn man ein histologisches Gewebe mit einem Primär-Antikörper inkubiert, binden die Antikörper dort hoch affin, wo sich das passende Antigen befindet. Um diese Bindung nachzuweisen, muss der Primär-Antikörper mittels enzym-gekoppelten oder fluoreszenz-markiertem Sekundär-Antikörper sichtbar gemacht werden.

Gewebepräparation für murine Kochlea-Querschnitte (*Cross sections*)

Die Mäuse (Alter P40) anästhesierte man mit 500 µl Isofluran (*Forene® B506 Abbvie*) in einem Becherglas und dekapitierte sie. Der Kopf der Maus wurde anschließend halbiert und das Gehirn entfernt. Aus den Schädelhälften wurden die Kochleae in PBS-Lösung freipräpariert. In den Apex der Kochleae wurde mittels Pinzette ein feines Loch gestoßen, um die Fixierung in 2 % iger PFA-Lösung (+ 125 mM Saccharose in 100 mM PBS) für 2 h bei 4° C durchzuführen. Danach erfolgte die Dekalzifizierung der kochleären Knochenstrukturen für 5 bis 45 min (in Abhängigkeit von Verknöcherungszustand und Alter der Maus) in *Rapid Bone Decalcifier (TBD-1 Shandon, Thermo Scientific 6764001)* bei RT. Um den Präparaten für das spätere Einfrieren das Wasser zu entziehen, erfolgte nun die Übernacht-Inkubation in 25 % Saccharose-PBS-Lösung unter sanftem Schwenken bei 4° C. Danach wurden die Kochleae in *Tissue-Tek O.C.T Compound (4583, Sakura)* eingebettet und für die Kryosektion auf Trockeneis eingefroren (5 min). Hiernach erfolgte das Schneiden des Gewebes im Kryostaten.

Herstellung von Kryo-Kochlea-Schnitten

Die eingebetteten Kochleae wurden in einem Kryo-Mikrotom (Temperatureinstellung $K_T = -22^\circ\text{C}$; $O_T = -20^\circ\text{C}$) mit Erlaubnis von Prof. Dr. Eberhard Weihe, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Uni Marburg, geschnitten. Die Stärke der Schnitte betrug 12 µm. Die Gewebeschnitte wurden auf Objektträger (*Super frost plus microscope slides, 4951PLUS4, Thermo Scientific*) übertragen und 10 min antrocknen gelassen. Danach wurden sie direkt für die Färbung weiterverwendet oder bei -20° C gelagert.

Färbung von Kryo-Kochlea-Schnitten

In dieser Arbeit wurde die indirekte fluorophor-gekoppelte Immunfärbung angewendet.

Um unspezifische Bindungen der nachzuweisenden Antikörper zu unterbinden, versucht man, die Klebrigkeit von Proteinen vorher durch andere Proteine mittels Blockern abzusättigen. Im Blocker sind neben Serumproteinen auch Antikörper vorhanden, die an Antigene im Gewebeschnitt binden könnten. Häufig eingesetzte Blocker sind Milchpulver, Gelatine, Albumin oder Normalserum. Der optimale Blocker muss für jede Antikörper-Applikation getestet werden. In dieser Arbeit wurde folgende Blocker-Lösung verwendet: 1 % BSA in 1x PBS. Diese wurde 1 h bei RT unter sanftem Schwenken mit den Gewebepreparaten inkubiert. Danach erfolgte die Übernacht-Inkubation der Schnitte mit den Primär-Antikörper-Verdünnungen (2.3.1) in 0,5 % BSA in 1x PBS bei 4°:

- α Pres (aus Ziege) 1:800
- α Cav-1 (aus Kaninchen) 1:400

Daraufhin wurden die Schnitte für dreimal 10 min in 1x PBS gewaschen und für 1 h bei RT mit dem Sekundär-Antikörper (2.3.1) 0,5 % BSA in 1x PBS inkubiert. Diesen Lösungen wurde zur Darstellung der Zellkerne 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, in PBS gelöst) in einer Verdünnung von 1: 5000 zugesetzt.

- α Ziege Alexa-Fluor 568 (gegen Pres-Antikörper) 1:200
- α Kaninchen Alexa-Fluor 488 (gegen Cav-1-Antikörper) 1:200

Die Kochlea-Schnitte wusch man unter sanftem Schwenken zweimal für 10 min in 1x PBS und einmal in PB bei RT.

PB (phosphate buffer 240 mM):

ad 1 Liter H₂O

- Na₂HPO 427,52 g
- NaH₂PO₄ 5,52 g

Die Präparate konnten direkt für die Visualisierung am Konfokal-Mikroskop verwendet oder in *Mowiol*-Medium (0713, *Roth*) für die Aufbewahrung eingebettet werden.

2.4 Fluoreszenz-Mikroskopie

Die Fluoreszenz-Mikroskopie ist eine Methode der Licht-Mikroskopie. Das Prinzip der Fluoreszenz basiert auf der Absorption von kurzwelligem Licht durch Fluorochrome und der Emission von Licht größerer Wellenlänge: Die Elektronen der Fluoreszenz-Moleküle absorbieren Photonen des Anregungslicht und gelangen auf ein höheres Energie-Niveau (*excited state*). Da die

Elektronen sich nicht lange auf diesem Niveau halten können, fallen sie auf ihr ursprüngliches Energie-Niveau zurück und setzen dabei Energie frei. Ein Teil der Energie wird als Fluoreszenz emittiert.

2.4.1 *Ground State Depletion followed by Individual Molecule Return (GSdim)-Mikroskopie*

Die *GSdim*-Technologie ist eine super hoch auflösende Nanoskopie jenseits der klassischen Auflösungsgrenze basierend auf der Lokalisation von fluoreszierenden Einzelmolekülen. Die Fluorophore zuerst müssen vorübergehend getrennt werden, um eine präzise Detektion der Einzelmoleküle zu bewirken: Dafür werden die Fluorophore mittels hoher Lichtintensitäten (i.d.R. ein Hochenergie-Laser) temporär in einen nicht-fluoreszierenden Dunkel-*off*-Zustand transferiert, von wo aus die Einzelmoleküle zufällig in den Grundzustand zurückkehren. Während dieser Rückkehr emittieren die Moleküle Photonen (das sogenannte Blinken im *on*-Zustand), die eingefangen und detektiert werden. Aus mehreren tausend Einzelaufnahmen werden die Positionsinformationen aller Fluorophore gesammelt. Über einen Software-Algorithmus (Jedes Blinken wird lokalisiert. Die Schwerpunkt-Koordinaten werden mittels Anpassung der *Point-Spread-Funktion* (PSF) an eine *Gaußsche* Funktion ermittelt.) können daraus die Koordinaten der einzelnen Fluorophore bestimmt und als super hoch auflösendes Bild rekonstruiert werden. Je mehr Schwerpunkt-Koordinaten eines Fluorophors überlappen, desto stärker erscheinen die Signale im Bild und entsprechen der realen Position des Moleküls. Eine laterale Auflösung von bis zu 20 nm ist mit dieser Technologie erreichbar, dabei ist die Auflösung von den Eigenschaften des Fluorophors und vom Einbett-Medium abhängig.

Es wurde mit einem *Leica SR GSD Widefield Superresolution* Mikroskop (*Leica Microsystems*, Wetzlar) der *Bioimaging Facility* des SFB 593 der Universität Marburg gearbeitet. Bei dem Mikroskop handelte es sich um ein *DMI 6000 B TIRF* mit einer *Andor iXon DU-897 EM CCD*-Kamera und einem *HCX PL APO 100.0x1.47 OIL*-Objektiv. Das System war mit diesen Lasern ausgestattet:

- 488 nm *solid-state laser* (300 mW)
- 532 nm *solid-state laser* (500 mW)
- 642 nm *solid-state laser* (500 mW)
- 405 nm *solid-state laser* (30 mW)

Zur Aufnahme und Analyse der Bilder wurde die Software *LAS AF* von *Leica Microsystems* genutzt (Fölling et al. 2008; <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/step-by-step-guide-to-the-molecular-basics-of-gsdim-microscopy>). Der 488 nm-Laser wurde mit einer Intensität von 5 Einheiten eingesetzt, der *gain* betrug 5.0, der *EM gain* 300 *units*. Die Expositionszeit der Aufnahmen war 10 msec. Folgend wurden 12539 Einzelaufnahmen in 2 min 13,362 sec von

rPres-YFP und 3353 Einzelaufnahmen in 35,615 sec von zPres-YFP aufgenommen (i.d.R. zwischen 2000 und 15000 Einzelaufnahmen).

Um die Wahrscheinlichkeit der Fluorophore zu erhöhen, einen möglichst langlebigen *off*-Zustand zu erreichen, erfolgte die Einbettung der Probe unter reduzierenden Bedingungen in einem Spezialmedium nach den Angaben des Herstellers. Für die Verwendung von YFP-markierten Konstrukten (als Fusionsprotein) wurde ein PBS-Puffer (pH 7.4) mit folgenden Endkonzentrationen optimiert:

- | | | |
|--|-----|--------|
| • Katalase (<i>Sigma C1345</i>) | 40 | µg/ ml |
| • Glukose-Oxidase (<i>Sigma G2133</i>) | 0,5 | mg/ ml |
| • Glukose (<i>Roth 6780.1</i>) | 10 | mM |
| • β-Mercaptoethylamin (MEA = Cysteamin, <i>Sigma 30070-10G</i>) | 1 | mM |

Die Zellen ließ man auf Standard-Deckgläschen (Ø 18 mm, P 233.1, *Roth*) bis 60 % Konfluenz wachsen und transfizierte sie mit den YFP-markierten Pres-Konstrukten. 48 h später wurden sie mit PFA bei RT fixiert (siehe 2.1.7) und für die *GSdim*-Mikroskopie genutzt.

2.4.2 Totale Interne Reflexions-Fluoreszenz-Mikroskopie (TIRFM)

Die *Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy* ist eine Methode der Licht-Mikroskopie, die ein evaneszentes Lichtfeld (auch Anregungsfeld genannt) nutzt, um selektiv Fluorophore an der Grenzschicht vom Präparat zum Glas anzuregen. Die Erzeugung dieses evaneszenten Feldes basiert auf der Totalreflexion des flach einfallenden Lichtstrahls an dieser Grenzschicht (von einem Medium mit höherem Brechungsindex zu einem Medium mit niedrigerem Brechungsindex) und erreicht maximal 200 nm. Die Intensität des evaneszenten Feldes fällt mit wachsendem Abstand von der Grenzfläche exponentiell ab. Befinden sich in diesem Feld Fluoreszenz-Moleküle, die das Licht der eingestrahnten Wellenlänge absorbieren können, so werden sie zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt. Der Vorteil der TIRFM liegt im geringen Signal-Rausch-Verhältnis in der Fokusebene, welches durch die vollständige Unterdrückung der Fluoreszenzanregung außerhalb dieses Feldes bewirkt wird. Man ist aber auf diese Ebene an der Grenzschicht zwischen Glas und Flüssigkeit festgelegt. Damit ermöglicht die TIRFM die selektive Visualisierung der grenzschicht-nahen Bereiche wie der Plasmamembran und eng angrenzender zytoplasmatischer Regionen.

Das in dieser Arbeit genutzte TIRF-Mikroskop vom Modell *Leica DMI 6000 B* wurde durch die *Bioimaging Facility* des SFB 593 der Universität Marburg zur Verfügung gestellt. Für die Aufnahme der Bilder wurde ein TIRF-100x-Öl-Objektiv (HCX PL APO 100.0x1.47 *OIL*) eingesetzt mit einer DFC350FXR2-095583305-Kamera. Die Software *LAS AF* des Herstellers *Leica Microsystems* wurde verwendet. Es wurde mit Laser-Intensitäten zwischen 3 und 5 Einheiten gear-

beitet, die Expositionszeit lag i.d.R. zwischen 500 und 1500 msec, der *gain* wurde auf 10.0 Units eingestellt. Für YFP (für rPres-YFP und zPres-YFP) und RFP- (für cPres-RFP) spezifische Standard-Filter-Einstellungen wurden nach Herstellervorschlägen genutzt. Das Mikroskop war mit 4 verschiedenen Dioden-Lasern ausgestattet:

- 405 nm
- 488 nm
- 561 nm
- 633 nm

Die Zellen ließ man auf Glasboden-Schälchen (HBSt-5040, *WillCo Wells*) bis 60 % Konfluenz wachsen und transfizierte sie mit Fluoreszenz-Fusionsprotein-Konstrukten. 48 h später wurden sie mit PFA (siehe 2.1.7) bei RT fixiert und visualisiert.

2.4.3 Konfokale *Laser-Scanning-Mikroskopie* (CLSM)

Die *Confocal Laser Scanning Microscopy*, auch Konfokal-Mikroskopie genannt, zeichnet sich dadurch aus, dass nicht das gesamte Präparat beleuchtet wird, sondern zu jedem Zeitpunkt nur ein Bruchteil des abzubildenden Bereiches von einem fokussierten Lichtpunkt abgetastet (*abgescannt*) wird. Dabei entsteht im Mikroskop selbst zu keinem Zeitpunkt ein vollständiges Bild, dieses wird erst mit Hilfe einer Software rekonstruiert. Die Fluoreszenz wird immer nur an einer Stelle angeregt und somit die Entstehung von Streulicht im Umfeld minimiert. Man unterscheidet die hier genutzte *punktscannende konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie* von der *Nipkow-Rotations-Scheiben-Mikroskopie*, wo mehrere Lochblenden spiralförmig angeordnet sind. Bei allen Konfokal-Mikroskopen gibt es vor dem Detektor, in der hinteren Brenn-Ebene, eine zusätzliche Lochblende, das sogenannte *pinhole*. Dieses blendet das Licht von außerhalb der Objektebene aus, so dass nur Licht aus dem scharf abgebildeten Bereich durchgelassen wird. Durch diesen Aufbau kann nur das Licht aus der Objekt-Ebene den Detektor erreichen. Dies ermöglicht eine hochgradige Kontrast-Erzeugung.

Die konfokalen Aufnahmen wurden mit einem *LSM 710 AXIO Examiner Z1*-Mikroskop der Firma *Zeiss* mit *ZEN*-Software (2009) und folgender Ausstattung genutzt:

Laser:

- DPSS 561-10 (561 nm)
- Argon-Multiline 25 mW (458, 488, 514 nm)
- He/ Ne633 (633 nm)
- Diode laser 405-30 (405 nm)

Filter:

• 47 CFP	Exzitation 436/ 20	Emission 480/ 40
• 38 endow GFP	Exzitation 470/ 40	Emission 525/ 50
• 46 YFP	Exzitation 500/ 20	Emission 535/ 30
• 63 HE mRFP	Exzitation 572/ 25	Emission 620/ 62

Objektive:

- W Plan Apochromat 20 x / 1,0 DIC M27 75 mm
- W Plan Apochromat 63 x / 1,0 M27

Die Zellen ließ man auf Coverslips (\varnothing 12 mm, *Roth* P231.2) bis 60 % Konfluenz wachsen und transfizierte sie mit den gewünschten Fluoreszenz-Konstrukten. 24 h, 48 h oder 72 h nach der Transfektion wurden sie bei einer Standard-Einstellung von 2 bis 15 %-Laser-Intensität, einem Verstärkungsfaktor von ≤ 800 und einem *pine hole* von 1 AU konfokal visualisiert und analysiert. Wenn keine Angabe der Zeit der Aufnahmen angegeben wurde, so erfolgte die Konfokal-Aufzeichnung 36 bis 48 h nach der Transfektion.

Applikationen und Prä-Inkubationen/ Temperatur-Modifikationen

Die Applikation von LatA (2.1.10) erfolgte über ein eigens hergestelltes Applikationssystem bestehend aus einer Applikationsspitze (*Microfil 28 AWG, MF28G67-5, World Precision Instruments*), die über Fein-Schläuche (*Fine Bore Polythene Tubing 0,28 mm ID, 0,61 mmOD, 800/100/100, Smith Medical ASD*) mit einem 10 ml-Reservoir (*Omnifix 10 ml/ Luer Lock Solo, 4617100V, Braun*) für die Applikationslösung verbunden war und über einen Mikromanipulator (*Display SM-5 Remote Control System 877-T0821, Luigs & Neumann*) gesteuert wurde. Zusätzlich erfolgte eine Perfusion mit Ex-0 über ein Zuleitungs-Abpump-System (*Infusionsgerät Air G, 74.4101, Sarstedt*; *Rotilabo-Silikonschlauch \varnothing innen: 1 mm, \varnothing außen 3 mm, 9556.1, Roth*). Diese Systeme wurden über 3-Wege-Hähne (*74.4410.001, Sarstedt*) kontrolliert. Über einen derartigen Aufbau erfolgte auch die Applikation der Ex-0-Lösungen mit den verschiedenen pH-Werten (6,5 und 8,5).

Die Prä-Inkubation mit Zytochalin D (2.1.9), Kolchizin (2.1.11) β -Methyl-Zyklodextrin (2.1.13) sind in den indizierten Abschnitten nachzulesen.

Die Temperaturmodifikationen der Pres-transfizierten Zellen erfolgten über einen Mikro-Inkubator mit Peltier-Element. Die Coverslips mit den Zellen wurden zügig aus dem Zellkultur-Inkubator in die vorgewärmten 37° C-warmen Lösungen des Mikro-Inkubators umgesetzt. Nach 10-minütiger Inkubationszeit wurde das GFP-Fluoreszenzsignal aufgezeichnet. Anschließend wurde die Temperatur auf 22° C eingestellt, erneut 10 min inkubiert und anschließend die Fluoreszenz aufgezeichnet. Nun wurde die Temperatur zurück auf 37° C gestellt. Nach 10 min Inku-

bationszeit zeichnete man die Fluoreszenz nochmals auf. Für diesen Schritt wurden auch Inkubationszeiten bis zu 2 h getestet. Über ein Perfusionssystem (*Infusionsgerät Air G*, 74.4101, *Sarstedt*; *Rotilabo-Silikonschlauch* Ø innen: 1 mm, Ø außen 3 mm, 9556.1, *Roth*) wurden die Zellen mit Extrazellulär-Lösung bzw. CHO-Nährmedium umspült.

2.5 Bildbearbeitung

Die mikroskopischen Aufnahmen wurden zur besseren optischen Wiedergabe der Bildinformation nachbearbeitet: Mittels des Bildbearbeitungs-Programms *ImageJ* wurden Kontrast- und Helligkeitsmodifikationen vorgenommen. Zur besseren Wiedergabe als Abbildung wurde die Fluoreszenz (wie jeweils indiziert) falsch-farben dargestellt.

2.6 Statistik

2.6.1 Pearson-Korrelation

Mit einer Korrelation misst man den Grad eines linearen Zusammenhangs zwischen zwei Variablen. Der Korrelationskoeffizient nach *Pearson* Rr ist eine standardisierte Version der Kovarianz zweier Merkmale. Rr wird verwendet, wenn beide Variablen annähernd normalverteilt sind und es einen linearen Zusammenhang zwischen den beiden Variablen gibt. Er gibt Stärke und Richtung des Zusammenhangs an und berechnet sich nach der Formel:

$$Rr = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} * \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

\bar{x} : Mittelwert für Variable x

\bar{y} : Mittelwert für Variable y

Die Angaben des *Pearson*-Korrelationskoeffizienten wurden mit Hilfe der *Zen 2009*-Software von *Zeiss* aus den CLSM-Aufnahmen ausgelesen. Durch die pixelweise Auftragung der Intensitäten in einem Streudiagramm (*Scatter Plot*) kann auf einen positiven oder negativen linearen Zusammenhang getestet werden: Auf der x-Achse wurden die Intensitäten pixelweise aus dem GFP-Kanal aufgetragen, auf der y-Achse die aus dem CFP-Kanal. Diese Betrachtungen bezogen sich auf eine *region of interest* (ROI), die i.d.R. der Gesamtzelle entsprach.

Der Rr -Wert kann zwischen -1 und 1 liegen und wurde als positive ($Rr > 0$) oder negative Korrelation ($Rr < 0$) nach den folgenden Richtlinien interpretiert (Mukaka 2012):

Korrelationskoeffizient Rr

- $1,0 = |Rr|$
- $0,9 \leq |Rr| < 1,0$

Interpretation

perfekte Korrelation
sehr strenge Korrelation

- $0,7 \leq |Rr| < 0,9$ strenge Korrelation
- $0,5 \leq |Rr| < 0,7$ moderat strenge Korrelation
- $0,3 \leq |Rr| < 0,5$ schwache Korrelation
- $0,0 < |Rr| < 0,3$ geringfügige bis vernachlässigbare Korrelation
- $0,0 = Rr$ keine Korrelation

Bei einer perfekten Korrelation liegen die Messwerte auf einer Geraden, die ansteigt bei $Rr = +1$ bzw. die sinkt bei $Rr = -1$. Zum statistischen Vergleich gemessener Unterschiede zweier Rr -Werte wurde anschließend der t-Test eingesetzt (2.6.2).

2.6.2 t-Test

Um die Unterschiede zwischen empirisch gefundenen Mittelwerten der Pearson-Korrelationskoeffizienten Rr zweier Gruppen statistisch miteinander zu vergleichen, wurde der unpaarige t-Test eingesetzt. Er liefert die Entscheidungshilfe dafür, ob es sich bei dem Mittelwerts-Unterschied um einen systematischen Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen handelt oder ob der Unterschied zufällig entstanden ist. Dieses parametrische Verfahren arbeitet mit Populationsparametern (Streuung, arithmetisches Mittel), die mit Hilfe einer Stichprobe geschätzt werden. Der t-Test prüft damit, ob eine statistische Hypothese zutrifft: Die Null-Hypothese H_0 nimmt an, dass die berechnete Mittelwerts-Differenz zufällig entstanden ist, d.h., dass die Differenz zwischen den betrachteten Gruppen gleich 0 ist. Voraussetzung ist eine Normalverteilung der Mittelwerts-Differenzen mit dem arithmetischen Mittel 0 und einer von den Stichprobenumfängen und der Populationsstreuung abhängigen Streuung. Diese Verteilung heißt Stichprobenkennwerte-Verteilung von Mittelwerts-Differenzen unter H_0 . Ihre Streuung nennt man Standardfehler der Mittelwerts-Differenzen (SEM). Diese Verteilung ermöglicht die Bestimmung der Auftretens-Wahrscheinlichkeit des Bereiches einer Differenz, um die gefundene Differenz bewerten zu können. Für die Beurteilung der Auftretens-Wahrscheinlichkeit einer empirisch gefundenen Differenz wird ein standardisiertes Maß für die Mittelwerts-Differenz verwendet. Die standardisierten Stichprobenkennwerte heißen t-Werte. Die standardisierten Verteilungen werden t- oder *Student*-Verteilungen genannt. Anhand der t-Verteilung kann einem empirischen t-Wert eine Wahrscheinlichkeit zugewiesen werden, mit der exakt dieser oder ein größerer t-Wert unter der Annahme der H_0 eintritt.

Aus den Korrelationskoeffizienten der Einzel-Zellen einer Gruppe wurden in einem ersten Schritt der Mittelwert, die Standardabweichung (SD) und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) der Gruppe bestimmt. Die Differenz der Gruppenmittelwerte bildet den Stichprobenkennwert t:

$$t = \frac{\text{Mittelwert von Stichprobe 1} - \text{Mittelwert von Stichprobe 2}}{\text{Standardfehler der Differenzen beider Mittelwerte}}$$

Der P-Wert des Tests ist definiert als das kleinste Signifikanzniveau, bei dem der Test gerade H_0 noch verwirft. Der t-Wert gilt als signifikant, wenn seine Wahrscheinlichkeit kleiner als das festgesetzte Signifikanzniveau α (i.d.R. 0,05) ist. Mit Hilfe der *graphpad*-Software (<http://graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm>) wurden das 95 %-Konfidenzintervall und der zweiseitige P-Wert ermittelt, um daraus die H_0 abzulehnen (H_0 -Signifikanztest ergibt eine sehr geringe Wahrscheinlichkeit, d.h., die Mittelwerte sind ungleich) oder anzunehmen (Mittelwerte sind gleich) und abschließend auf die Signifikanz des berechneten Unterschieds der Mittelwerte zu schließen:

- $P < \alpha$: H_0 verwerfen: Der Unterschied gilt als statistisch signifikant.
- $P \geq \alpha$: H_0 annehmen: Der Unterschied ist nicht signifikant.

2.6.3 Darstellung von Diagrammen

Sämtliche Balken-Diagramme mit Quantifikationsdaten wurden mit *Microsoft Office Excel 2007* erstellt. Auf der x-Achse wurden die analysierten Ansätze/ Gruppen aufgetragen, auf der y-Achse die Pearson-Korrelationskoeffizienten R_r als Mittelwert über die indizierte Anzahl von Zellen. Für jede Gruppe wurde der zweiseitige Standardfehler des Mittelwertes im Balkendiagramm eingezeichnet (*error of the mean*, SEM).

$$SEM = \frac{\text{Standardabweichung}}{\sqrt{\text{Anzahl}}}$$

Die Quantifikation der Ko-Lokalisation über den *Scatter Plot* (2.6.1) wurde aus der *Zen 2009*-Software von *Zeiss* aus den CLSM-Daten ausgelesen und extrahiert. Zur Darstellung des *Line Plots* wurden die entsprechenden Intensitätsdaten über die betrachtete Strecke aus der *Zen*-Software in den *Editor* exportiert, in *Microsoft Office Excel 2007* importiert und mit Hilfe des *Diagramm-Tools* als *Line Plot* dargestellt. Die Daten beziehen sich auf die gezeigte Zelle.

2.7 Elektrophysiologie¹

Prinzip der *Whole Cell Patch Clamp*-Technik

Die *Patch Clamp*-Technik liefert die Möglichkeit, Zellpotenziale und Ströme über Zellmembranen direkt zu messen und wurde 1976 von Erwin Neher und Bert Sakmann entwickelt (Neher &

¹ Das Kapitel „Elektrophysiologie“ wurde mit Genehmigung aus der Bachelor-Arbeit „Einfluss von Membranmikrodomänen und Aktin-Cytoskelett auf die Funktion von Prestin“ (eingereicht August 2013) von Charlotte Köhne weitestgehend übernommen. Charlotte Köhne führte die zugehörigen elektrophysiologischen Experimente zur Zytoskelett-Manipulation von Pres-transfizierten Zellen durch. Dmitry Gorbunov führte die funktionellen Messungen der rPres-cPres-Chimären nach diesen Protokollen durch.

Sakmann 1976). Durch die elektrische Isolation eines kleinen Membranausschnitts (*patch*) mit Hilfe einer Mikroelektroden-Pipette entsteht eine Verbindung (*seal*) zwischen Pipettenöffnung und Membran, die durch einen hohen Widerstand charakterisiert ist. In der *Whole Cell*-Konfiguration, die hier eingesetzt wurde, können Ströme über multiple Kanäle der gesamten Zellmembran gemessen werden.

Eine mit Intrazellulär-Lösung (ICS) befüllte Glasmikropipette mit Elektrode (chlorierter Silberdraht) wurde unter optischer Kontrolle durch ein Mikroskop bei leichtem Überdruck in der Pipette so nah an eine Zelle herangeführt, dass nach Umschalten auf leichten Unterdruck eine sehr dichte Verbindung zwischen Pipette und Zelle entsteht (*Giga-seal*). Durch die Verbindung entstand ein hoher elektrischer Widerstand im Giga-Ohm Bereich zwischen dem Inneren der Pipette und der Ex-0-Lösung, die die Zelle umspült. Dies wird als *on-cell*-Konfiguration bezeichnet. Nun wurde durch leichtes Saugen oder durch die Injektion von kleinen Strömen (*zapping*) der Membranfleck, der sich innerhalb der Öffnung der Pipette befindet, aufgerissen, so dass die Pipette die Membran abschließt und das Pipetteninnere mit dem Zytosol in Verbindung steht. In dieser *Whole-Cell*-Konfiguration wurde die Intrazellulär-Lösung der Zelle durch die ICS-Pipettenlösung ersetzt, da das Volumen der Pipette ungleich größer ist als das Zellvolumen. Somit werden die intrazellulären und extrazellulären Ionenkonzentrationen durch ICS bzw. Ex-0 vorgegeben. Die Zusammensetzung der Experimental-Lösungen glich den physiologischen Lösungen. Nun wurden Summenströme über die Membran, sowie das Membranpotenzial gemessen, da ein geschlossener Stromkreis zwischen der Elektrode in der Pipette und einer weiteren Elektrode in der Badlösung bestand. Außerdem konnte das Potenzial der Zelle verändert werden und konstant auf einem bestimmten Wert gehalten werden (*Whole-Cell-Voltage-Clamp*). Der Stromkreis über die Zellmembran ist vergleichbar mit einer Parallelschaltung aus einem Widerstand und einem Kondensator (RC-Glied). Soll nun die Spannung der Zelle verändert werden, muss dafür die komplette Zellmembran umgeladen werden, was jeweils zu kapazitiven Strömen führt, die kompensiert werden. Zusätzlich zu diesem RC-Glied ist in Reihe ein Serienwiderstand R_S geschaltet, welcher am Übergang von der Pipettenöffnung zur Zelle entsteht und sich aus dem Pipettenwiderstand, sowie einem Zugangswiderstand zusammensetzt. Der Serienwiderstand ist ein Maß für die Qualität des Zellzugangs und sollte möglichst gering sein.

Versuchsaufbau und Durchführung

Alle Messungen erfolgten bei Raumtemperatur (22 - 25°C) an einem inversen Lichtmikroskop (Eclipse TE2000-U, *Nikon Corporation*, Tokio, Japan) mit einer in den Objektisch eingelassenen Plexiglas-Messkammer. Das Mikroskop stand auf einem schwingungsgedämpften Tisch (TMC 63-534, *Technical Manufacturing Corporation*, Peabody MA, USA). Zusätzlich wurde der Messaufbau elektrisch mit Hilfe eines Faraday'schen Käfigs (aus der universitäts-eigenen

Werkstatt) abgeschirmt, um das Signal-Rausch-Verhältnis zu optimieren. Die Fluoreszenzanregung erfolgte mit einer externen Lichtquelle (Oligochrome, *TILL Photonics GmbH*, München, Deutschland) und zwei Filtersets (GFP: Anregungsbandpass: 465 – 495 nm, Strahlenteiler: 505 nm, Emissionsbandpass: 515 - 555 nm; CFP: Anregungsbandpass: 418 - 442, Strahlenteiler: 455, Emissionsbandpass: 460-500; *AHF Analysetechnik AG*, Tübingen). Weiterhin wurden zwei Mikromanipulatoren (MINI 25 ZR, *Luigs & Neumann GmbH*, Ratingen) mit Steuerung (SM-5, *Luigs & Neumann GmbH*) und ein *Patch-Clamp*-Verstärker (EPC 10 USB Patch-Clamp Amplifier, *HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH*, Lambrecht) verwendet. Als Elektroden wurde chlorierter Silberdraht genutzt. Alle Experimente wurden bei einer *sampling rate* von 20 kHz durchgeführt und über 5 kHz gefiltert. Die Aufzeichnung der Daten und die Kontrolle des *Patch-Clamp*-Verstärkers wurde an einem Mac mini (*Apple Inc.*, Cupertino, USA) durch eine Software (Patchmaster v2x32, *HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH*) ermöglicht.

An jedem Versuchstag wurden zunächst ausreichend Pipetten mit Hilfe eines horizontalen Pipettenzieh-Geräts (P-2000, *Sutter Instruments Co.*, Novato CA, USA) aus Borosilikat-*Glaskapillaren* (GB100T-8P, Maße: 0,78 x 1,00 x 80mm, *Science Products*, Hofheim) hergestellt. Um einen konstanten Flüssigkeitsaustausch zu gewährleisten, wurde mit einem Zuleitsystem konstant Ex-0 in die Messkammer geleitet werden, die mittels einer Pumpe (*Otto E. Kobe KG.*) abgesaugt wurde. Für Versuche mit β -Methyl- *Zyklodextrin* wurde ein eigens gebautes Applikationssystem vorbereitet, welches aus einer Applikationsspitze (MF28G67-5, *World Precision Instruments Inc.*, Sarasota, USA) bestand, die mit dünnen Schläuchen (*Smiths Medical International Ltd.*, Kent, UK) versehen war. Indem die Applikationsspitze mit einem Mikromanipulator noch vor Heranfahren der *Patch-Clamp*-Pipette in unmittelbarer Nähe der Zelle positioniert wurde, konnte Lösung durch hydrostatischen Druck auf die zu untersuchende Zelle fließen. Die Applikation wurde mit 3-Wege-Hähnen kontrolliert.

Ein Deckglas mit CHO-Zellen wurde in die Messkammer gelegt und zunächst eine Zelle ausgewählt. Dies geschah unter optischer Kontrolle durch lichtmikroskopische Betrachtung (40x Vergrößerung). Hierbei wurden nur Zellen ausgewählt, die gut sichtbare Abgrenzungen zeigten, nicht abgerundet waren und keine offensichtlichen Einschluss-Körperchen im Zytoplasma zeigten. Zusätzlich wurde anhand der jeweiligen Fluoreszenz der Fusionsproteine überprüft, ob die Zielproteine membranständig exprimiert waren. Angrenzende Zellen oder Membranreste neben der gewählten Zelle wurden abgesaugt, um eine elektrische Kopplung zu unterbinden. Es wurde eine frische Pipette mittels eines Sterilfilters (*TPP Techno Plastic Products AG*, Trasadingen, Schweiz) mit ICS befüllt und auf die Elektrode am Mikromanipulator gesteckt. Mit angelegtem Überdruck (Regulator PR 10, *ALA Science*, Farmingdale, USA) wurde die Pipette in die Badlösung getaucht und nun der Pipettenwiderstand überprüft, der bei allen Messungen zwischen 1,8 und 2,9 M Ω lag. Weiterhin wurde die Pipette an die Zelle herangefahren, wobei die Berührung

der Zelle sowohl optisch durch das Mikroskop als Eindellung der Zellmembran, als auch anhand steigenden Pipettenwiderstands überprüft werden konnte. Durch Ablassen des Überdrucks auf der Pipette und gegebenenfalls mit zusätzlichem Ansaugen wurde das *Giga-seal* erreicht (i.d.R. $\geq 1,2 \text{ G}\Omega$). Während der *On-Cell*-Konfiguration wurden kapazitive Ströme der Pipette kompensiert. Daraufhin wurde die Zelle geöffnet und wiederum auftretende kapazitive Ströme der Zellmembran kompensiert. Nur wenn der Serienwiderstand unter $10 \text{ M}\Omega$ lag, wurde die Messung fortgesetzt. Falls nicht bereits während der *Giga-seal*-Formation geschehen, wurde außerdem das Membranpotenzial auf -40 mV geklemmt.

Ex-0-Standard: pH 7.4 (NaOH), $\approx 310 \text{ mOsm/kg}$ ad 1 l Aqua dest.

- 5.8 mM KCl (*Roth 6781.1*) 0,432 g
- 144 mM NaCl (*Sigma S9888-2.5KG*) 8,415 g
- 0.9 mM MgCl₂ (*Merck 1.05832.1000*) 0,9 ml (0,183 g)
- 1.3 mM CaCl₂ (*Fluka 21114-11*) 1,3 ml
- 0.7 mM NaH₂PO₄ (*Roth T878.1*) 0,097 g
- 5.6 mM D-Glukose (*Roth 6780.1*) 1,110 g
- 10 mM HEPES (*Sigma S9888-2.5KG*) 10 ml (2,383 g)

Ex-0-low Chloride: pH 7.4 (NaOH), $\approx 310 \text{ mOsm/kg}$ ad 1 l Aqua dest.

- 10 mM NaCl (*Sigma S9888-2.5KG*) 0,5844 g
- 150 mM Na-Aspartat (*Sigma 11195-100G*) 25,965 g
- 10 mM HEPES/NaOH (*Sigma S9888-2.5KG*) 10 ml (2,383 g)

Ex-0-low Chloride + Oxalate: pH 7.4 (NaOH), $\approx 310 \text{ mOsm/kg}$, ad 1 l Aqua dest.

- 10 mM NaCl (*Sigma S9888-2.5KG*) 0,5844 g
- 10 mM Na₂-Oxalat (*Fluka 75700*) 1,261 g
- 145 mM Na-Aspartat (*Sigma 11195-100G*) 25,099 g
- 10 mM HEPES/NaOH (*Sigma S9888-2.5KG*) 10 ml (2,383 g)

ICS-Standard: pH 7.3 (KOH), $\approx 295 \text{ mOsm/kg}$; ad 100 ml Aqua dest.

- 160 mM CsCl (*Sigma 31807-100G*) 2,694 g
- 1 mM K₂-EGTA (*Fluka 03779-50G*) 0,038 g
- 1 mM HEPES/CsOH (*Sigma H3375-1KG; 516988-25G*) 0,024 g

ICS-low chloride + Oxalate: pH 7.3 (KOH), $\approx 295 \text{ mOsm/kg}$; ad 100 ml Aqua dest.

- 10 mM CsCl (*Sigma 31807-100G*) 0,168 g
- 10 mM Na₂-Oxalat (*Fluka 75700*) 0,126 g
- 135 mM Na-Aspartat (*Sigma 11195-100G*) 0,173 g
- 1 mM K₂-EGTA (*Fluka 03779-50G*) 0,038 g
- 1 mM HEPES/NaOH (*Sigma H3375-1KG*) 0,024 g

NLC-Messung (*non-linear capacitance*)

Um die spannungsabhängige Änderung der NLC zu messen, wurde die Software im *lock in*-Modus verwendet (siehe *HEKA* Tutorial 2.71). Hierbei gab man der Zelle eine Spannungsrampe vor, auf welche ein Sinus addiert wurde. Dadurch wurde ein sinus-förmiger Strom hervorgerufen, der in Phase und Frequenz mit dem Spannungssinus korrelierte. Aus diesen Parametern des resultierenden Stroms ließ sich die Kapazität der Zelle berechnen und die schnellen Änderungen der NLC wurden registriert. Diese Messmethode ist relativ unempfindlich gegenüber Störungen. Für den Spannungssinus wurde eine Frequenz von 2 kHz verwendet und eine Amplitude von 10 mV. Die Spannungsrampe verlief in 300 ms von -120 mV bis +120 mV.

Eingesetzte Lösungen	intrazellulär	extrazellulär
NLC-Messung von rPres	ICS-Standard	Ex-0-Standard
NLC-Messung von rPres mit Prä-Inkubation von LatA	ICS-Standard	Ex-0-Standard
rPres–cPres-Chimären NLC	ICS-Standard	Ex-0-Standard

Auswertung

Zur Auswertung der Rohdaten aus der *Patchmaster* Software wurde das Programm *Igor Pro* in der Version 6.3.2.1 (*WaveMetrics*) genutzt. Statistische Berechnungen erfolgten ebenfalls mit *Igor Pro* und *Microsoft Office Excel*. Die spannungsabhängigen Kapazitätskurven wurden auf die erste Ableitung der *Boltzmann*-Funktion angepasst, so dass eine *gefittete* Kurve entstand:

- Ableitung der *Boltzmann*-Funktion:

$$C(V) = C_{lin} + C_{nonlin} + \frac{Q_{max}}{a * e^{\frac{(v-v_{1/2})}{a}} * \left(1 + e^{-\left(\frac{v-v_{1/2}}{a}\right)}\right)^2}$$

Die Gesamtkapazität setzt sich aus C_{lin} , also der linearen Kapazität und der NLC zusammen. Q_{max} bezeichnet die maximale Ladung, die während der Spannungsänderung durch die Zellmembran bewegt wird. $V_{1/2}$ ist der Spannungswert, an dem die Ladungsbewegung halbmaximal ist und ist somit ein Parameter, um in der Ableitung die maximale Kapazität zu berechnen, wobei bei $\frac{Q_{max}}{\alpha * 4}$ der maximalen NLC (NLC_{max}) entspricht. Im *fit* wird die NLC normalisiert dargestellt, also nach Abzug der linearen Kapazität.

- Berechnung der maximalen Kapazität:

$$c\left(\frac{v_1}{2}\right) = c_{lin} + \frac{Q_{max}}{\alpha * 4}$$

Mit Hilfe der relativen maximalen Kapazität kann die Dichte des funktionellen Pres in der Membran abgeschätzt werden, da hier die NLC auf die lineare Kapazität bezogen wird, welche proportional zur Membranfläche ist.

- Berechnung der relativen NLC:

$$NLC_{rel} = \frac{NLC_{max}}{C_{lin}}$$

Der Faktor α ist ein Maß für die Steilheit der Änderung der Spannungsabhängigkeit der NLC und wird daher als *slope*-Faktor bezeichnet. Je größer α ist, desto kleiner ist der Anstieg bzw. der Abfall der NLC im Verlauf der Spannungsänderung.

Für alle Messdaten einer Zelle wurden die Mittelwerte von $V_{1/2}$, α und der relativen Kapazität ermittelt. Zum Vergleich der Werte wurde ein t-Test durchgeführt, wenn die Varianzen sich nicht unterschieden. Ein signifikanter Unterschied der Populationen wurde angenommen, wenn $p \leq 0,05$.

Messung des Transports von Anionen

Der Anionen-Transport wurde als Transport-Strom in Antwort auf Spannungsrampen von -100 bis +100 mV gemessen und gegen das Membranpotenzial grafische darstellt. Durch die intrazelluläre oder extrazelluläre Applikation von Transport-Substraten in Form von divalenten Anionen (Oxalat) wurde die Transportfunktion von Pres bestimmt. Zur Quantifikation der Transport-Aktivität über die indizierte Anzahl von Zellen wurden die gemittelten Ströme als Stromdichte in pA/ pF angegeben. Die Stromdichte wurde auf die Membrankapazität, als Messgröße für die Fläche der Membran, normalisiert. Als Bad-Elektrode wurde eine Agarose-Brücke eingesetzt, wenn die extrazellulären Anionen ausgetauscht wurden. Folgende Lösungen wurden appliziert:

Eingesetzte Lösungen	intrazellulär	extrazellulär
rPres–cPres-Chimären Transport	ICS-Standard ICS-low chloride+Oxalate	Ex-0 Ex-0-low Chloride Ex-0-low Chloride+Oxalate

2.8 Verwendete Software

Tab. 3: Eingesetzte Programme:

- | | |
|---|---|
| • Bildbearbeitung und -Analyse | <i>ImageJ, IrfanView</i> |
| • <i>Blast: Basic Local Alignment Search Tool</i> | http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi |
| • Elektrophysiologische Messungen | <i>Patchmaster</i> |
| • Erstellen von Diagrammen (Statistik) | <i>Microsoft Office Excel 2007</i> |
| • Erstellen von Grafiken | <i>Adobe Illustrator CS3</i> |
| • Erstellen von Präsentationen | <i>Microsoft Office PowerPoint 2007</i> |
| • Genetische Karten, Klonierungs-Strategie | <i>VectorNTI Advance (Invitrogen)</i> |

- Auswertung der *Patch*-Daten/ deren Statistik *Igor Pro 6.3.2.1 (WaveMetrics)*
- Internet-Recherche allgemein *http://www.google.de*
- Konfokal-Aufnahmen *Zen 2009 (Zeiss)*
- Literatur-Recherche *http://www.ncbi.nlm.nih.gov*
- Multiples Sequenz-Alignment *http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2*
- *pdf*-Reader *Adobe Reader X*
- Primer-Design, Berechnung der T_m *http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html*
- Referenz- und Literatur-Manager *Mendeley*
- Scan der *Western Blots* *Odyssey Sa Infrared Imaging System (Li-cor)*
- Schreibprogramm *Microsoft Office Word 2007*
- Statistik *http://graphpad.com/quickcalcs*
- Tabellenkalkulation *Microsoft Office Excel 2007*
- TIRFM/ GSdim-Aufnahmen *LAS AF (Leica)*

2.9 Wiederholt eingesetzte Chemikalien

Tab. 4: Verwendete Chemikalien:

Chemikalie	Firma	Bestell-Nummer
Agar-Agar	<i>Roth</i>	2266.2
Agarose	<i>Roth</i>	3810.4
Albumin	<i>AppliChem</i>	A1391.0025
Ampizillin-Natriumsalz	<i>Roth</i>	K029.1
Baktolin-Handwaschlösung	<i>Hartmann</i>	981328
D+Glukose-Monohydrat	<i>Merck</i>	1.08342
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄)	<i>Roth</i>	4984.1
Dithiothreitol (DTT)	<i>Thermo Scientific</i>	R0861
DMSO (C ₂ H ₆ OS)	<i>Roth</i>	A994.2
Ethanol absolut (C ₂ H ₆ O)	<i>Roth</i>	5054.5
Glyzerol	<i>Roth</i>	3783.1
Glyzin	<i>Roth</i>	3790.3
Isopropanol (C ₃ H ₈ O)	<i>Roth</i>	6752.4
Kaliumchlorid (KCl)	<i>Roth</i>	6781.1
Kaliumhydroxid-Lösung (KOH)	<i>Merck</i>	1091081000
Kanamzinsulfat	<i>Roth</i>	T832.1
LB-Medium	<i>MP</i>	3002-041
Mercaptoethanol	<i>Roth</i>	4227.1
Methanol (CH ₄ O)	<i>Roth</i>	8388.6
Milchpulver	<i>Roth</i>	T145.3
Natriumacetat (C ₂ H ₃ NaO ₂)	<i>Roth</i>	6773.1
Natriumchlorid (NaCl)	<i>Sigma</i>	S9888
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (NaH ₂ PO ₄)	<i>Roth</i>	T878.1
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	<i>Merck</i>	6329.1000

Natriumhydroxid-Lösung (NaOH)	<i>Fluka</i>	71463-1L
Natriumhydroxid-Pellets	<i>Baker</i>	0402
ortho-Phosphorsäure	<i>Roth</i>	9079.1
<i>Parafilm M</i>	<i>Pechiney</i>	PM-996
pH-Meter-Kalibrier-Lösung pH 4, 7, 9	<i>Merck</i>	1094750500, 1094770500, 1094760500
<i>MilliQ-Wasser+Quantum-Kartusche Ex</i>	<i>Millipore</i>	QTUM000EX
Saccharose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	<i>Merck</i>	1.07687.1000
Salzsäure (1 mol/ l; 1N) (HCl)	<i>Merck</i>	1090571000
Salzsäure, rauchend (HCl)	<i>Fluka</i>	84426
SDS-Pellets	<i>Roth</i>	CN302
SOB-Medium	<i>Roth</i>	AE27.1
<i>Sterillium Classic pure</i>	<i>Bode</i>	975512
Steril-Wasser	<i>Sigma</i>	W3500
TAE (50x)	<i>Thermo Scientific</i>	B49
Triton X-100	<i>Roth</i>	3051.3
<i>Trizma base</i>	<i>Sigma</i>	T1503-1KG
Trypton/ Pepton aus Casein	<i>Roth</i>	8952.1
Tween 20	<i>AppliChem</i>	A4974

2.10 Verbrauchsartikel

Tab. 5: Verbrauchsmaterial:

Verbrauchs-Artikel	Firma	Bestell-Nummer
Pipettenspitzen:		
10µl-Spitzen	<i>Greiner bio-one</i>	771250
250µl-Spitzen	<i>Sarstedt</i>	70.760.001
1250µl-Spitzen	<i>Greiner bio-one</i>	750.250
5ml-Spitzen	<i>Eppendorf</i>	0030.000.979
10ml-Spitzen	<i>Eppendorf</i>	0030.000.765
Reaktionsgefäße:		
0,5ml-Reaktionsgefäße	<i>Sarstedt</i>	72.699.001 - 005
1,5ml-Reaktionsgefäße	<i>Sarstedt</i>	72.690.001
2,0ml-Reaktionsgefäße	<i>Sarstedt</i>	72.691; 72.695
Serologische Pipetten:		
1ml-serologische Pipette	<i>Sarstedt</i>	861.251.001
5ml-serologische Pipette	<i>Sarstedt</i>	861.253.025
10ml-serologische Pipette	<i>Sarstedt</i>	861.254.025
25ml-serologische Pipette	<i>Greiner bio-one</i>	760.180
Tücher:		
Einmal-Tücher	<i>Clean und Clever</i>	2054692
Schutzhandschuhe:		
Handschuhe Größe S (Latex)	<i>Roth</i>	L949.1
Handschuhe Größe S (Nitril)	<i>VWR</i>	112-2371

Zellkultur-Flaschen:		
25 cm ² -Zellkultur-Flasche	<i>Sarstedt</i>	83.1810, 83.1810.002
75 cm ² -Zellkultur-Flasche	<i>Sarstedt</i>	83.3911
Zellkultur-Schalen:		
3cm-Zellkultur-Schalen	<i>Greiner bio-one</i>	627.160
6cm-Zellkultur-Schalen	<i>Greiner bio-one</i>	628.160
10cm-Zellkultur-Schalen	<i>Greiner bio-one</i>	664.160
15cm-Zellkultur-Schalen	<i>Sarstedt</i>	83.1803
Glasboden-Schälchen	<i>WillCo</i>	HBSSt-5040
Zentrifugen-Röhrchen:		
15ml-Röhrchen	<i>Greiner bio-one</i>	188.1661, 188.162
50ml-Röhrchen	<i>Greiner bio-one, Sarstedt</i>	227.261, 62.559.001

Sämtliche Glasartikel (Flaschen, Messzylinder, Messbecher, Erlenmeyer-Kolben) wurden aus *Schott*-Glas gefertigt und über die Firma *Roth* bezogen. Wiederverwendbare Kunststoff-Waren (Messzylinder, Messbecher, etc.) wurden ebenfalls bei *Roth* eingekauft.

3 ERGEBNISSE

3.1 Analyse der Pres-Lokalisation in Kulturzellen

3.1.1 Fluoreszenz-mikroskopische Charakterisierung von Pres-Clustern

Es ist bekannt, dass Pres aus Nagern in der Plasmamembran von HEK293-Zellen in punktierten Foci lokalisiert ist (Sturm et al. 2007; Rajagopalan et al. 2007). Um die Pres-Orthologen aus Ratte (*Rattus norvegicus*, rPres), Zebrafisch (*Danio rerio*, zPres) und Huhn (*Gallus gallus*; cPres) in ihrer Lokalisation in Säuger-Zelllinien umfänglich zu charakterisieren, sollten drei hoch auflösende Fluoreszenz-Mikroskopie-Techniken eingesetzt werden.

Die konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (*confocal laser scanning microscopy*, CLSM) wurde verwendet, um die Verteilung von Pres in den Zellen darzustellen. Die Totale Interne Reflexions-Fluoreszenz-Mikroskopie (*total internal reflection fluorescence microscopy*, TIRFM), die eine besonders hohe Auflösung entlang der optischen z-Achse liefert, erlaubte es, Pres in seiner Membran-Lokalisation zu beschreiben. In der klassischen Lichtmikroskopie ist die erreichbare Auflösung durch Beugung begrenzt (Auflösungsgrenze). So lassen sich Strukturen bis zu einer Größe von 200 nm auflösen. Eine Auflösung deutlich jenseits dieser Grenze erzielt die *super-resolution* GSdim-Mikroskopie (*ground state depletion followed by individual molecule return*) mit einer lateralen Auflösung von bis zu 20 nm (<http://www.leica-microsystems.com/de/produkte/super-resolution/details/product/leica-sr-gsd-3d>). Der Einsatz dieser Technik bot die Möglichkeit, in diesem Höchstauflösungssystem Lokisationsaufnahmen subzellulärer Membran-Bereiche mit Pres zu erstellen. Die GSdim-Darstellungen von Pres sollten sowohl einer differenzierten Beschreibung der Cluster dienen als auch ihrer anschließenden Größen-Quantifizierung.

Für diesen experimentellen Ansatz wurden sowohl CHO- wie auch HEK-Zellen transient mit Pres-Fluoreszenz-Konstrukten aus Ratte, Zebrafisch und Huhn transfiziert (rPres-GFP/ YFP; zPres-GFP/ YFP; cPres-GFP/ RFP) und 48 h später mit den genannten Techniken mikroskopisch untersucht.

Der Fluoreszenz-Marker beeinflusste die grundsätzliche Membran-Lokalisation und das Clusterbildungsvermögen von Pres nicht, d.h., in diesen Zellen erfolgte eine normale Faltung und Prozessierung der rekombinanten Pres-Proteine. Die Fluoreszenz-Signale der Orthologen repräsentativer HEK-Zellen sind für eine bessere Darstellbarkeit in Abb. 7 falsch-farben (gelb) abgebildet.

Die konfokal-mikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass die Pres-Orthologen aus Ratte, Zebrafisch und Huhn bei heterologer Expression als Fluoreszenz-Fusionsproteine in HEK- (Abb. 7A) und CHO-Zellkulturen (nicht gezeigt) markante Unterschiede in ihrer Verteilung aufwiesen. Das Fluoreszenz-Signal von cPres war homogen verteilt. Durch eine ungleichmäßige, vielmehr punkt-förmige Verteilung zeichneten sich rPres und zPres aus. Mit der vorliegenden konfokalen Aufzeichnung von rPres und zPres konnte die von Sturm et al. (2007) und Rajagopalan et al. (2007) beschriebene geclusterte Verteilung des Nager-Pres in Kulturzellen bestätigt werden.

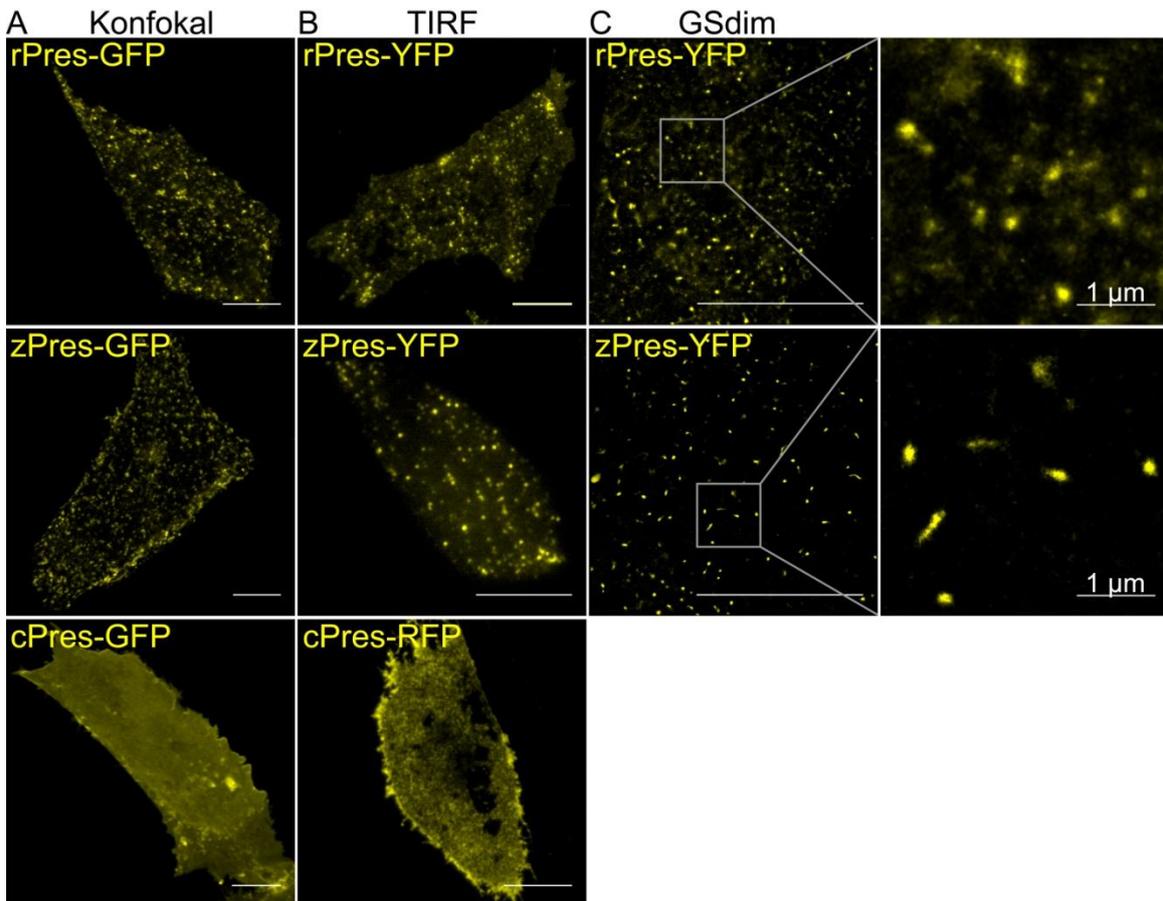


Abb. 7: Charakterisierung der Lokalisation der Pres-Orthologen aus Ratte, Zebrafisch und Huhn: **A)** Konfokal-Aufnahmen (>6 voneinander unabhängige Transfektionen mit rPres n~150, zPres n~150, cPres n~100; Marker: GFP); **B)** TIRFM-Aufnahmen (3 Transfektionen mit rPres n=9, zPres n=13, cPres n=10; Marker: YFP für rPres und zPres; RFP für cPres); **C)** GSdim-Aufnahmen mit Vergrößerungen (rechts) (2 Transfektionen mit rPres n=7, zPres n=6, Marker: YFP); HEK; Maßstab-Skala: 10 μm, wenn nicht anders angegeben

Die TIRFM-Aufnahmen dokumentieren (Abb. 7B), dass das Pres-Orthologe aus Huhn gleichmäßig in der Plasmamembran lokalisiert war. Die Orthologen aus Zebrafisch und Ratte bildeten Cluster innerhalb der Membran aus. Damit wird belegt, dass alle untersuchten Orthologen von Pres in HEK- (Abb. 7B) und CHO- (nicht gezeigt) Zellen eine membran-ständige Lokalisation ausbildeten und dass die Cluster in der Membran lagen.

Die GSdim-Einzelmolekül-Technologie gestattete es, die Membran-Cluster von rPres und zPres hinsichtlich ihrer Form und Größe weiter zu untersuchen (Abb. 7C, Abb. 8). So konnte bereits im optischen Größenvergleich der Cluster beobachtet werden, dass der Großteil der rPres-Cluster kleiner als die zPres-Cluster war (Abb. 7C). Die Länge und Breite der Cluster wurde anschließend mit Hilfe der *LAS AF Lite-Software* von *Leica Microsystems* ausgemessen. Das Messen erfolgte an zufällig ausgewählten Bereichen in jeweils drei repräsentativen GSdim-Aufnahmen pro Orthologe (Abb. 8).

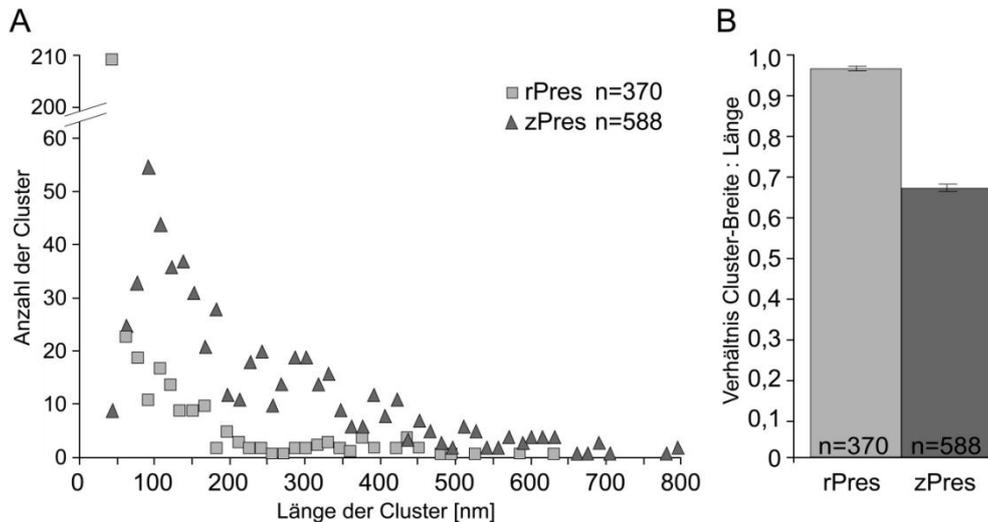


Abb. 8: Darstellung des Größenspektrums (A) und der Form (B) der Pres-Cluster

Die GSdim-Aufnahmen zeigen, dass rPres-Cluster größtenteils rundlich und zPres-Cluster länglich waren (Abb. 7C). Der Vergleich der ausgemessenen rPres- mit den zPres-Clustern deckte ein geringeres Größenspektrum der rPres Cluster (Abb. 8A: hellgraue Quadrate vs. dunkelgraue Dreiecke) auf. 57 % der rPres-Cluster waren 45 x 45 nm groß (210 der ausgemessenen 370 rPres-Cluster). Das verbleibende Fluoreszenz-Signal verteilte sich auf Cluster mit einer Länge zwischen 60 und 630 nm. Über 200 nm lange Cluster traten nur vereinzelt auf. Das berechnete Verhältnis der gemessenen Breite zur Länge von 0,96 untermauerte die Beobachtung der runden Clusterform (Abb. 8B). Zwischen den rPres-Clustern lagen diffuse Pres-Signale (Abb. 7C).

Die Größe der zPres-Cluster variierte stärker als die von rPres (Abb. 7C). Die kleinsten zPres-Cluster waren 45 nm lang, die größten erreichten 800 nm, wobei Cluster über 450 nm nur vereinzelt auftraten (Abb. 8A). Die Kalkulation der Breite-Länge-Relation mit einem Wert von 0,66 bestätigte die Beobachtung der länglichen Form der Cluster (Abb. 8B). Der Großteil des Fluoreszenz-Signals wurde von den Clustern getragen; es wurde deutlich weniger Hintergrund als bei rPres beobachtet (Abb. 7C).

Mit der hoch auflösenden Darstellung von Pres konnte die Cluster-Bildung des Ratten- und des Zebrafisch-Orthologen gezeigt werden. Die Clusterform war spezifisch für jedes Orthologe.

3.1.2 Analyse des Ko-Clusterings von Pres-Orthologen

Nun sollte der Frage nachgegangen werden, ob trotz der unterschiedlichen Verteilung der Pres-Orthologen gemeinsame Cluster ausgebildet werden können. Dafür sollte herausgearbeitet werden, inwiefern homogen verteiltes cPres in Anwesenheit eines cluster-bildenden Orthologen ebenfalls Cluster formieren kann und ob rPres und zPres gemeinsame Cluster (Ko-Cluster) ausbilden können. HEK-Zellen wurden mit jeweils 2 verschiedenen Pres-Orthologen ko-transfiziert. 48 h später wurde die Clusterbildung konfokal-mikroskopisch analysiert (Abb. 9).

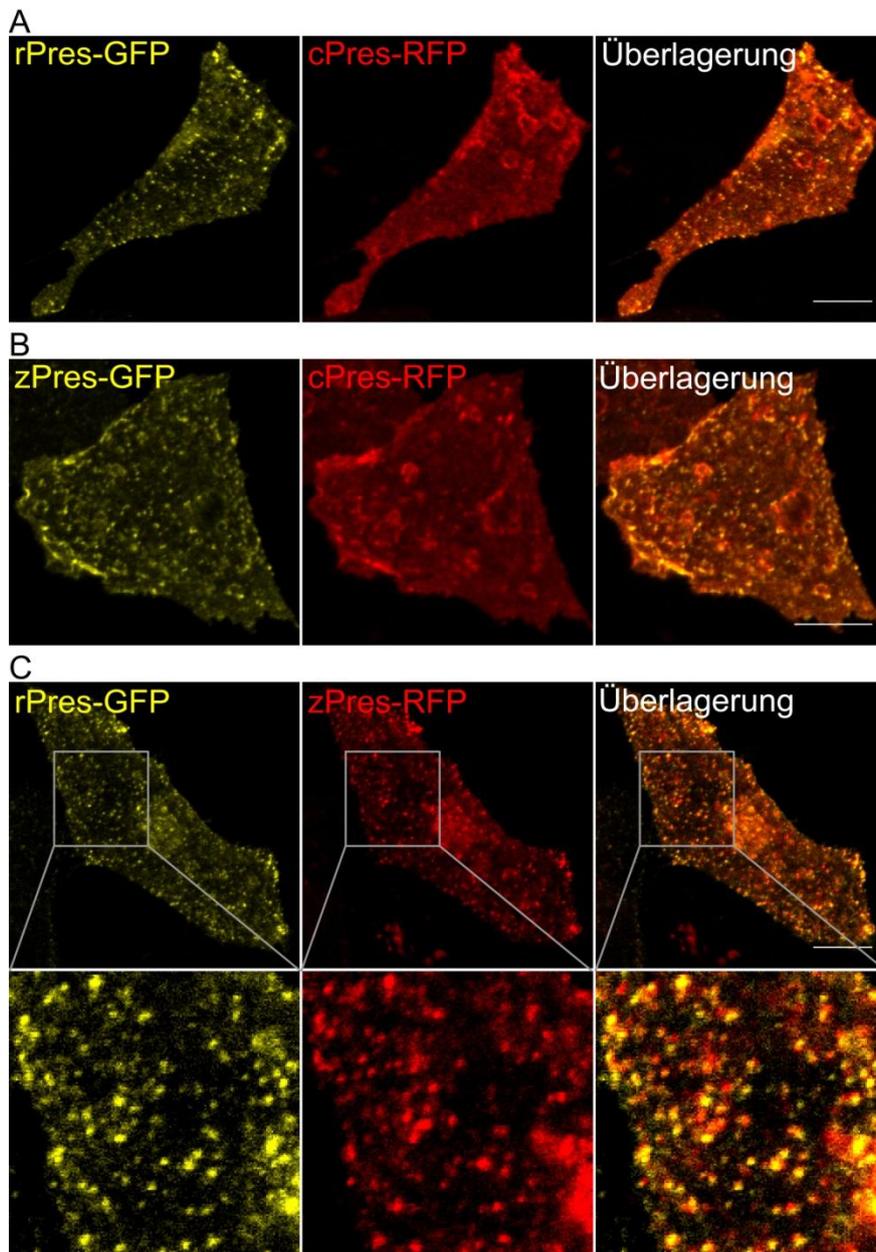


Abb. 9: Ko-Lokalisations-Analyse der Pres-Orthologen: cPres bildet keine Cluster mit rPres (A) oder zPres (B); rPres und zPres formen Ko-Cluster (C). In diesen repräsentativen CLSM-Aufnahmen von HEK293-Zellen wurde ein Pres-Orthologe als GFP- und eines als RFP-Fusionsprotein ko-exprimiert. Die GFP-Fluoreszenz wurde gelb abgebildet. Das RFP-Konstrukte wurden rot dargestellt (für jede Pres-Orthologen-Kombination jeweils 6 Transfektionen; cPres-rPres n=43, cPres-zPres n=42, rPres-zPres n=86 Zellen). Maßstab-Skala: 10µm

Wurde eine Zelle mit cPres und einem der clusternden Orthologen aus Ratte oder Zebrafisch in ko-transfiziert, so bildete cPres eine homogene Verteilung in der Membran aus; es wurde keine Cluster-Bildung von cPres beobachtet (Abb. 9A und B). Die cluster-formierenden Orthologen brachten in Gegenwart von cPres ihre charakteristischen Membran-Punkte hervor.

Wurde eine Zelle mit den beiden clusternden Pres-Orthologen rPres und zPres ko-transfiziert, so ließ sich eine partielle Ko-Lokalisation der beiden Fluoreszenz-Signale beobachten (Abb. 9C). Teilweise bildeten zPres und rPres Ko-Cluster aus (Vergrößerungen in Abb. 9C unten). Grundsätzlich fiel in dieser Ko-Expressionsstudie auf, dass die Orthologen aus Ratte und Zebrafisch gemeinsam ein geringeres Punktierungsmuster zeigten als bei getrennter Expression, denn ein Teil des rPres- besonders aber des zPres-Fluoreszenz-Signals erschien gleichmäßig verteilt in der Plasmamembran.

Da cPres in Gegenwart clusternder Orthologe nicht an der Cluster-Bildung beteiligt war, weist dieser Versuch darauf hin, dass das Merkmal des Clusterings durch intrinsische Eigenschaften des Pres-Proteins vermittelt wird, die nicht in cPres, wohl aber bei rPres und zPres vorliegen. Aus der partiellen Ko-Lokalisation von rPres- und zPres-Clustern folgt, dass die Proteine dieser Orthologen gemeinsame Cluster ausbilden können und folglich -zumindest teilweise- in der gleichen Membran-Domäne existieren, während cPres nicht in diesen Domänen lokalisiert ist. Die Assoziation zu Clustern erfolgt orthologen-spezifisch. Das geringer ausgeprägte Clustering nach der Überexpression der zwei clusternden Pres-Konstrukten lässt vermuten, dass eine Sättigung von Proteinen in den von Pres besetzten Domänen in der Plasmamembran vorherrschte.

3.2 Bestimmung der Verteilungsdeterminante und ihrer Lokalisation im Pres-Protein

Das differentielle Clustering der Pres-Orthologen erlaubte eine experimentelle Bestimmung der Determinanten des Cluster-Verhaltens. Da die Basis der Clusterbildung vermutlich intermolekulare Wechselwirkungen sind, die entweder über die terminalen Enden oder durch die TMD von Pres vermittelt werden, wurden die Termini von cPres und rPres ausgetauscht. Die entstandenen Chimären wurden mittels Konfokal-Mikroskopie auf ihre Verteilung untersucht. *Patch clamp*-Messungen wurden eingesetzt, um die funktionelle Aktivität der Chimären zu analysieren.

Als Ausgangsmaterial für die Klonierungen dienten Wildtyp-Konstrukte vom homogen verteilten cPres und dem cluster-formierenden rPres (Abb. 10A und C) mit GFP-Fluoreszenz-Marker. Die intrazellulär lokalisierten N- und/ oder C-Termini des einen Orthologen wurden molekularbiologisch mittels Fusions-PCR oder über das Einfügen von Restriktionsstellen auf die TMD des jeweils anderen Orthologen übertragen (Abb. 10B1-B3, D1-D3; siehe auch 2.2.11 „Strate-

gien zur Klonierung der Chimären“). Die Vorhersage der Membran-Topologie von Pres basierte auf Gorbunov et al. (2014) und Geertsma et al. (2015). Die resultierenden Chimären wurden entsprechend der Herkunft ihrer orthologen Abschnitte, also der beiden Termini bzw. der TMD, mit einem dreiteiligen Namen benannt (in Abb. 10: R = Ratte = *rat*; C = Huhn = *chicken*).

CHO- (Abb. 10) und HEK-Zellen (nicht gezeigt) wurden mit den 6 Chimären als GFP-Fusionskonstrukte transfiziert und 48 h später fluoreszenz-mikroskopisch mit CLSM (Abb. 10) und TIRFM (nicht gezeigt) auf ihre strukturelle Intaktheit und die Verteilung in der Membran analysiert. Für die bessere Darstellung wurde die GFP-Fluoreszenz der Chimären je einer repräsentativen CHO-Zelle in Abb. 10 falsch-farben wiedergegeben: Die auf der rPres-TMD basierenden Chimären wurden gelb abgebildet, die auf der cPres-TMD basierenden Chimären rot.

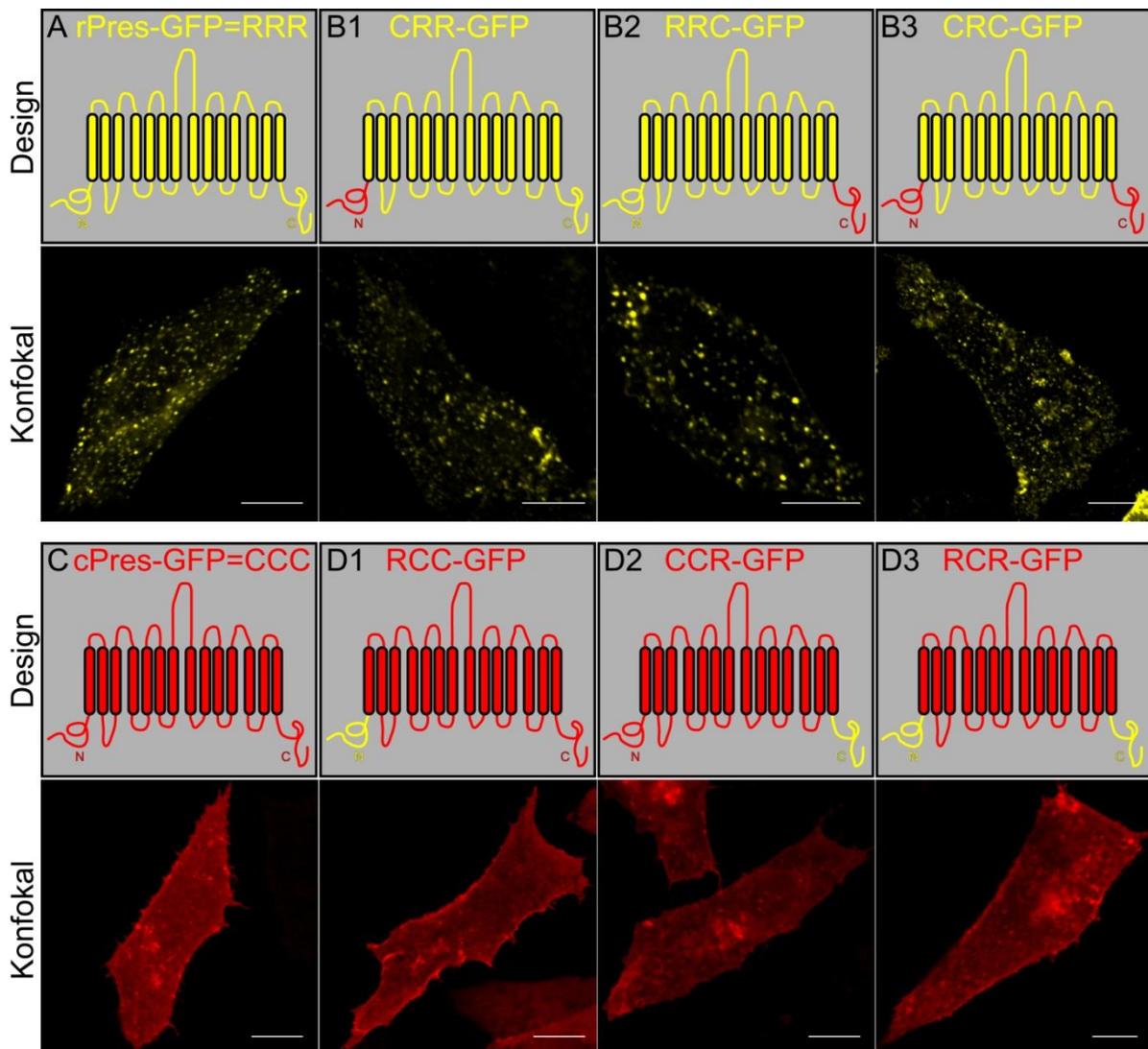


Abb. 10: Charakterisierung der rPres-cPres-Chimären hinsichtlich ihrer Membran-Verteilung in CHO-Zellen: Schematische Membran-Topologie und jeweils eine repräsentative Konfokal-Aufnahme von **A)** rPres; **B1-B3)** Chimären mit rPres-TMD (CRR n=32, RRC n=25 und CRC n=37 Zellen); **C)** cPres; **D1-D3)** Chimären mit der TMD von cPres (RCC n=32, CCR n=80 und RCR n=77 Zellen); je 3 Transfektionen; Maßstab-Skala: 10 μ m; Der C-terminale GFP-Marker jedes Konstrukts ist im Schema nicht dargestellt.

Die drei cPres-rPres-Chimären CRR, RRC und CRC mit der zentralen rPres-TMD demonstrieren eine punkt-förmige Verteilung des GFP-Fluoreszenz-Signals in der Plasmamembran (Abb. 10B1 bis B3). Die mit RCC, CCR und RCR bezeichneten Konstrukte beruhen auf der TMD von cPres und wiesen eine gleichmäßige Verteilung des GFP-Signals in der Plasmamembran auf (Abb. 10D1 bis D3). Daraus wird abgeleitet, dass alle Chimären strukturell intakt waren. Aus der Verteilung der Chimären wird weiterhin die Schlussfolgerung gezogen, dass die Eigenschaften der TMD das Verteilungs-Verhalten von Pres bei heterologer Expression grundlegend determinieren. An der Entstehung der Cluster sind die Termini nicht wesentlich beteiligt.

Dmitry Gorbunov führte elektrophysiologische *patch clamp*-Messungen der Chimären in CHO-Zellen durch. Im Vergleich mit den Wildtyp-Pres-Orthologen bestimmte er die NLC und den Transport von divalenten Anionen, wie am Beispiel von Oxalat gezeigt (Anhang-Abb. A). Die NLC bzw. der Transport konnten erwartungsgemäß ermittelt werden. Auf der rPres-TMD basierende Chimären bildeten NLC aus (Anhang-Abb. A obere Zeile). Einen elektrogenen Anionen-Transport (Schaechinger & Oliver 2007) zeigten die Chimären mit cPres-TMD (Anhang-Abb. A untere Zeile). Mit diesen Messungen wurde festgestellt, dass die Chimären funktionell intakt waren.

3.3 Physiko-chemische Bedingungen des Pres-Clusterings

3.3.1 Cholesterol-Abhängigkeit

Die Aggregation von Pres-Molekülen zu den Membran-Clustern scheint eine intrinsische Qualität des Pres-Proteins selbst zu sein (Abb. 9), die durch die TMD vermittelt wird (Abb. 10). Es gibt Daten, die darauf hindeuten, dass Pres aus Mongolischer Rennmaus sowohl funktionell (Sturm et al. 2007; Rajagopalan et al. 2007), in seiner Lokalisation in den Membran-Clustern (Rajagopalan et al. 2007) und in seiner Diffusion innerhalb der Membran (Kamar et al. 2012) von Cholesterol beeinflusst wird. Es sollte nun genauer untersucht werden, ob auch die Lokalisation von rPres in seinen Clustern vom Cholesterol-Gehalt der Zelle bestimmt wird. Weiterhin sollte der Einfluss einer Cholesterol-Depletion auf die Lokalisation von cPres analysiert werden.

Für diesen experimentellen Ansatz wurden stabil rPres-GFP und stabil cPres-GFP transfizierte HEK-Zellen 48 h nach dem Ausplattieren konfokal-mikroskopisch aufgezeichnet. Zur Extraktion des Membran-Cholesterols wurde β -Methyl-Zyklodextrin (β MCD) in einer Konzentration von 10 mM dem Kulturmedium der HEK-Zellen zugegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Für Abb. 11 wurden repräsentative unbehandelte und behandelte Zellen ausgewählt. Das GFP-Fluoreszenz-Signal wurde gelb dargestellt.

Stabil-Pres-GFP transfizierte HEK-Zellen bildeten das gleiche Verteilungsmuster aus wie rPres bzw. cPres bei transienter Transfektion (vgl. Abb. 7 mit Abb. 11A1, B1). Nach der Depletion von Cholesterol verteilte sich das rPres-Fluoreszenz-Signal weitestgehend uniform in der Membran (Abb. 11A2). Die Verteilung von cPres veränderte sich durch die β MCD-Behandlung nicht (Abb. 11B2).

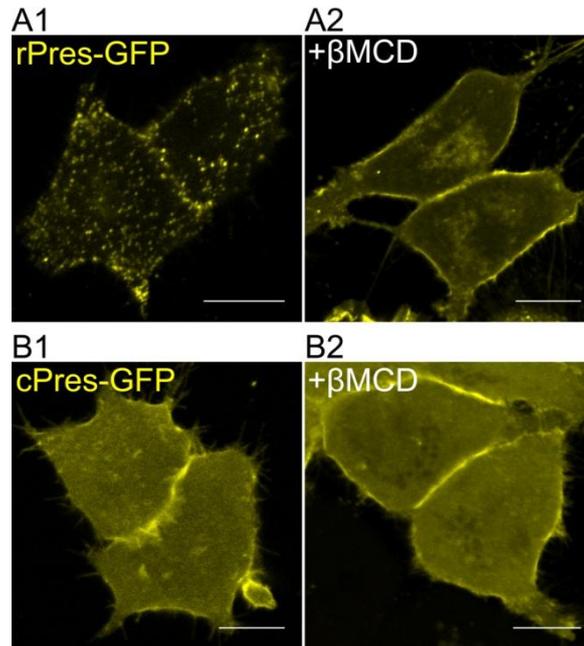


Abb. 11: Untersuchung der Cholesterol-Abhängigkeit der Pres-Verteilung: Repräsentative CLSM-Aufnahmen unbehandelter (A1: rPres n=21, B1: cPres n=10) und mit β MCD-behandelter Pres-GFP-HEK293-Zellen (A2: rPres n=10, B2: cPres n=9); je zwei voneinander unabhängige Ausplattierungen; β MCD= β -Methyl-Zyklodextrin: 10 mM, 30 min; RT; Maßstab-Skala: 10 μ m

Aus der Auflösbarkeit der mikroskopisch sichtbaren rPres-Cluster durch Depletion des Cholesterols kann geschlussfolgert werden, dass für die Verteilung von rPres in den fokalen Clustern neben den intrinsischen Eigenschaften des Pres-Proteins auch Cholesterol notwendig ist. Demgemäß ist die Lokalisation von rPres in den Clustern cholesterol-abhängig. Mit Hilfe dieser Ergebnisse können die von Rajagopalan et al. (2007) gezeigten Daten bestätigt werden, dass Pres in cholesterol-reichen Membran-Clustern in Säugerzelllinien lokalisiert ist.

3.3.2 Temperatur-Abhängigkeit

Sorgfältige mikroskopische Beobachtungen Pres-exprimierender Zellen zeigten, dass nach der Entnahme der Kulturen aus dem Zellkultur-Inkubator die Pres-Cluster allmählich verstärkt entstanden. Der sich am stärksten ändernde Umwelt-Faktor bei einer Entnahme ist die Temperatur. Der initiale Eindruck der Abhängigkeit der Lokalisation von Pres in den punkt-förmigen Clustern von der Umgebungstemperatur sollte überprüft werden.

Die Applikation von verschiedenen Temperaturen erfolgte über einen Mikro-Inkubator mit Pel-tier-Element, einen elektro-thermischen Wandler. Transient Pres-GFP transfizierte CHO-Zellen wurden zirka 48 h nach der Transfektion zügig aus dem Zellkultur-Inkubator in die vorgewärmten Lösungen (1. Extrazellulär-Lösung; 2. Nährmedium; je 37° C) des Mikro-Inkubators gesetzt. Nach jeweils 10-minütiger Inkubationszeit der unterschiedlichen Temperaturen (37° C - 22° C - 37° C) wurde die räumliche Verteilung von Pres an den lebenden Zellen konfokal-mikroskopisch untersucht. Die Fluoreszenz des Pres-GFP-Fusionsproteins wurde gelb wieder-gegeben (Abb. 12).

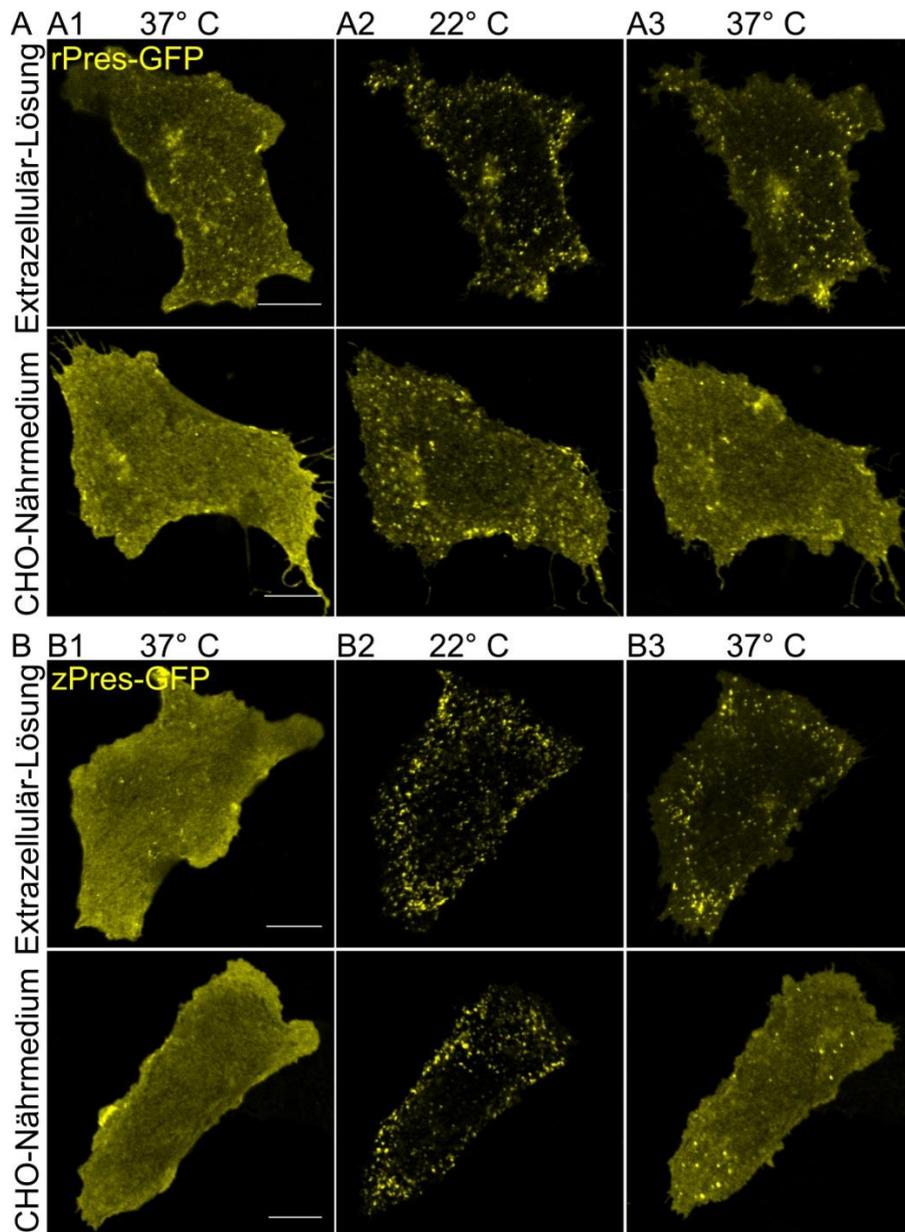


Abb. 12: Analyse der Temperatur-Abhängigkeit der Pres-Verteilung: Repräsentative CLSM-Aufnahmen Pres-transfizierter CHO-Zellen bei Applikation der indizierten Temperaturen (in Extrazellulär-Lösung rPres n=17 (A) und zPres n=35 (B); in Nährmedium rPres n=8 (A) und zPres n=14 Zellen (B)); Maßstab-Skala: 10 µm

In Extrazellulär-Lösung bei 37° C lag das Fluoreszenz-Signal von rPres und zPres überwiegend gleichmäßig verteilt in der Plasmamembran vor (Abb. 12A1 und B1 obere Zeile). Nur wenige Pres-Cluster traten als abgegrenzte Punkte mit Fluoreszenz-Maxima hervor. Nach Absenkung der Temperatur auf 22° C für 10 Min zeigte sich bei beiden Pres-Orthologen eine weniger homogen verteilte Fluoreszenz (A2 und B2). Das Clustering verstärkte sich, denn die Anzahl der Cluster und die Fluoreszenz-Intensität in den Clustern hatten merklich zugenommen. Dieser Effekt war für zPres stärker ausgeprägt als für das Säuger-Orthologe, da bei zPres nur ein sehr geringer Anteil des Fluoreszenz-Signals als homogener Hintergrund zwischen den Clustern lokalisierte, aber zwischen den rPres-Clustern eine vergleichsweise hohe gleichmäßige Verteilung verblieb (vgl. A2 und B2). Anschließend wurde die Temperatur für mindestens 10 min wieder auf 37° C erhöht. Die Cluster-Anzahl verminderte sich bei beiden Pres-Orthologen, während die gleichmäßige Verteilung der Fluoreszenz in der Membran wieder zunahm (Abb. 12A3 und B3). Die initiale Verteilung wurde jedoch auch nach längerer Inkubation bei 37° C (bis zu 2 h wurden getestet: für rPres n=5 und für zPres n=5) nicht vollständig erreicht.

Das nicht-cluster-bildende cPres blieb in seiner gleichmäßigen Verteilung von Temperatur-Veränderungen unbeeinflusst (n=14; nicht gezeigt).

Mit der Entnahme der Proben aus dem Zellkultur-Inkubator wurde das Umgebungsmedium der Zellen von CHO-Nährmedium auf Extrazellulär-Lösung gewechselt (Abb. 12A und B je obere Zeile). Die verwendete Extrazellulär-Lösung war frei von Wachstumsfaktoren. Um einen Einfluss dieser Inhaltsstoffe auf das Cluster-Verhalten von Pres zu testen, wurden transfizierte Zellen vor der mikroskopischen Studie für 2 h in Extrazellulär-Lösung im Zellkultur-Brutschrank inkubiert. Unter dem Entzug der Wachstumsfaktoren verblieben rPres und zPres bei 37° C weitestgehend gleichmäßig in der Membran verteilt (prä-inkubierte Zellen: rPres n=5, für zPres n=4; nicht gezeigt) und zeigten anschließend den oben beschriebenen Temperatur-Effekt in vergleichbarem Ausmaß. Weiterhin wurde das Temperatur-Protokoll an Zellen in Zellkultur-Nährmedium ausgeführt (Abb. 12A und B, jeweils zweite Zeile). Den oben beschriebenen Translokationseffekt bei Modifikation der Temperatur zeigten sie gleichermaßen.

Sowohl mit dem Flüssigkeitsmedien-Wechsel als auch mit der Entnahme aus dem Zellkultur-Inkubator können pH-Schwankungen einhergehen. Änderungen des extrazellulären pH führten nicht zur Beeinflussung des Lokalisationsverhalten von Pres innerhalb der Plasmamembran (pH 6.5, 7.5 und 8.5; Inkubation für jeweils 10 min; für rPres n=9, für zPres n=7; nicht gezeigt).

Das Fazit dieser Beobachtungen ist, dass die Lokalisation von Pres in den Plasmamembran-Clustern auch durch die Temperatur beeinflussbar ist. Weitere analysierte Faktoren, wie Wachstumsfaktoren oder der pH-Wert des Umgebungsmediums veränderten die Cluster-Bildung von Pres nicht. Da der Effekt aber nicht vollständig umkehrbar war, sind wahrscheinlich weitere

Faktoren an der Bildung der Pres-Cluster beteiligt. Der Versuchsergebnisse weisen zudem auf eine Mobilität der Pres-Moleküle innerhalb der Plasmamembran hin.

3.4 Ko-Lokalisationsanalyse des mikrodomänen-assoziierten Cav-1 mit Pres

Es wird vermutet, dass Interaktionen mit weiteren Proteinen an der Lokalisation und Funktion von Pres in den ÄHZ beteiligt sind. Wenn die Cluster *in vitro* einen Bezug zur Pres-Domäne der ÄHZ haben, dann ist es aufschlussreich zu sehen, ob weitere Proteine mit den rekombinanten Pres-Clustern assoziieren.

Ein interessanter Kandidat ist Caveolin-1 (Cav-1), für das bereits eine cholesterol-abhängige Assoziation mit Pres gezeigt wurde (Rajagopalan et al. 2010). Speziell organisieren die Caveoline cholesterol-reiche Domänen, die Caveolae (Rothberg et al. 1992; Murata et al. 1995; Parton & Simons 2007). Die resultierenden mikroskopisch sichtbaren Cav-Cluster weisen eine hohe Ähnlichkeit mit den Pres-Clustern auf.

3.4.1 Verteilung von Cav-1 in der Plasmamembran

Kennzeichnend für Cav-1 ist eine inhomogene, punkt-förmige Lokalisation in der Plasmamembran (Abb. 13A, n~50; Mundy et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde das Säuger-Cav-1 aus Haushund (*Canis lupus familiaris*) heterolog exprimiert, denn die endogenen Cav-1-Level in CHO- und in HEK293-Zellen wurden als sehr gering beschrieben (Wang et al. 2003; Yu et al. 2004; Wharton et al. 2005; Bernatchez et al. 2011; siehe auch Abb. 38).

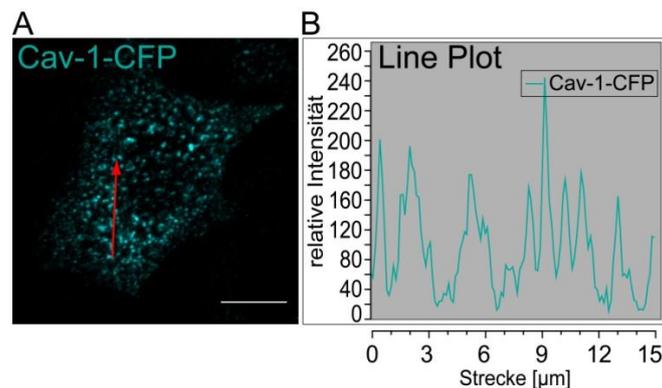


Abb. 13: Cav-1-Verteilung in der Plasmamembran: **A)** Diese repräsentative CLSM-Aufnahme einer CHO-Zelle zeigt die inhomogene, punkt-förmige Verteilung von heterolog exprimiertem Cav-1-CFP (n~50; CFP-Fluoreszenz: cyan-farben). **B)** Die Intensitätsanalyse über die in A1 eingezeichnete Strecke (roter Pfeil) verdeutlicht die ungleichmäßige Verteilung von Cav-1. Maßstab-Skala: 10 µm

Cav-1 reagiert, ähnlich wie Pres (Abb. 11), sensitiv auf Cholesterol-Modifikationen (Frank et al. 2002). Es bindet direkt Cholesterol (Murata et al. 1995; Thiele et al. 2000) und ist mit cholesterol-reichen Mikrodomänen-assoziert (Rothberg et al. 1992). Basierend auf diesen Daten und der Beobachtung, dass Cav-1 ein ähnliches Verteilungsmuster in der Membran ausbildet wie Pres (Abb. 13) entstand die Hypothese, dass Cav-1 an der spezifischen Verteilung von Pres beteiligt sein könnte. Um der Frage nachzugehen, ob Cav-1 in das cholesterol-abhängige Clustering von Pres involviert ist, wurde im heterologen Expressionssystem die Ko-Lokalisation von Cav-1 mit den verschiedenen Pres-Orthologen konfokal-mikroskopisch untersucht.

3.4.2 Selektion geeigneter Fluoreszenzmarker

Um geeignete fluoreszierende Fusionsproteine für die Ko-Lokalisationsstudie zu identifizieren, wurde Cav-1 mit verschiedenen Fluorophoren als Marker fusioniert. Cav-1-RFP verblieb größtenteils auf dem sekretorischen Weg im Golgi-Apparat und wurde nicht bis in die Membran transportiert, so dass aufgrund des gestörten *traffickings* bzw. *targetings* von einer fehlerhaften Prozessierung von Cav-1-RFP ausgegangen wurde. Das Cav-1-CFP- wie auch das -YFP-Konstrukt ko-lokalisierten partiell mit dem homogen verteilten Membran-Marker Lyn (nicht gezeigt) und bildeten in der Plasmamembran eine inhomogene, punktförmige Verteilung aus wie sie in der Literatur sowohl für endogenes als auch für heterolog exprimiertes (markiertes) Cav-1 beschrieben wurde (Mundy et al. 2002). Aus dieser Beobachtung (Abb. 13) wurde auf eine normale Faltung, Prozessierung und *targeting* der Cav-1-Proteine mit dem CFP- bzw. dem YFP-Marker geschlossen. Die Verwendung des Cav-1-YFP-Fusionsproteins gemeinsam mit Pres-GFP in einer Probe schied aufgrund der großflächigen Überschneidung der Anregungswellenlänge aus.

Das Pres-Protein wurde ebenfalls mit verschiedenen Fluorophoren fusioniert. Ein geringerer Anteil von rPres-RFP und zPres-RFP gelangte im Vergleich mit den GFP-markierten Fusionsproteinen (Pres-GFP für CLSM eingesetzt: Abb. 7A) bei vergleichbarem Transfektionsansatz in die Membran von CHO- und HEK-Zellen. Dort bildete Pres-RFP Membran-Punkte aus, die nicht der charakteristischen Größe und Anzahl der Cluster entsprachen. Dieses Ergebnis konnte unabhängig von einer N-oder C-terminalen Fusion von RFP mit rPres und zPres gezeigt werden. Somit schieden die Pres-RFP-Konstrukte für die geplante Analyse aus. Als CFP-Fusionskonstrukt wurde Pres in nur sehr wenigen Zellen in der Membran exprimiert und aufgrund dessen als ungeeignet eingestuft. Ein weiteres Pres-YFP-Fusionskonstrukt (für die TIRF- und die GSdim-Mikroskopie verwendet: Abb. 7B und C) wurde in der Plasmamembran exprimiert und bildete das typische Clustering-Muster aus. Die Verwendung dieses Konstrukts wurde als ungünstig bewertet, da das YFP in der Konfokal-Mikroskopie im Vergleich mit GFP schnell

ausblich. Aus diesen Gründen wurde in der Ko-Lokalisationsstudie die ungewöhnliche Fluorophor-Kombination Cav-1-CFP - Pres-GFP genutzt.

3.4.3 Abschätzung des *cross talks* des Fluorophor-Paares CFP - GFP

Da ein Fluorophor nicht nur am Anregungsmaximum angeregt wird, sondern über einen relativ breiten, aber definierten und fluorophor-spezifischen Bereich um das Maximum herum, kann es beim Einsatz zweier Fluorophore zur gleichzeitigen Anregung beider Fluoreszenz-Farbstoffe kommen. In der Regel spielt diese *cross excitation*-Komponente eine untergeordnete Rolle, da jedes Fluorophor selbst nur Licht mit einer spezifischen Wellenlänge emittieren kann. Um *cross excitation*-Artefakte auszuschließen, wurde in dieser Arbeit durchgängig mit zwei Kanälen, sogenannten *tracks*, gearbeitet, d.h., dass nur ein Laser und der zugehörige Detektor zu einem Zeitpunkt eingeschaltet wurden. Mit der sequenziellen Anregung von CFP und GFP wurden nacheinander die beiden Fluorophore mit ihrem korrespondierenden Laser-Strahl angeregt: erst das CFP bei 405 nm und anschließend das GFP bei einer Wellenlänge von 488 nm. Da der sequenzielle *Scan*-Modus zwischen den Aufnahmen der beiden *tracks* eine zeitliche Verzögerung (≤ 30 sec) generiert, wurden sämtliche Aufnahmen an fixierten Zellen wiederholt. Falsch positive Ko-Lokalisationen, die auf Bewegungen von Zellbestandteilen (z.B. der Membran-Cluster oder der Membran selbst) oder der Gesamtzelle beruhten, konnten über den Vergleich mit unfixiertem Material ausgeschlossen werden. In dieser Arbeit wurden diese Kontrollen stets umfangreich durchgeführt (i.d.R. mindestens 2 unabhängige Transfektionen mit 2 unabhängigen PFA-Fixierungen). Es wurden keine falsch positiven Ko-Lokalisationen durch die Verwendung der zwei *tracks* in sequentieller Anregungsweise ermittelt, d.h., das fixierte Material zeigte die gleichen Ergebnisse wie die Lebend-Zell-Mikroskopie.

Weitaus häufiger und komplexer stellen sich *cross emission*-Artefakte in der Fluoreszenz-Mikroskopie dar. Wenn die Emissionsspektren der eingesetzten Farbstoffe überlappen, so kann sich die Emission des einen Fluorophors in den jeweils anderen Detektionskanal erstrecken, d.h., die Fluoreszenz-Farbstoffe werden vom Photomultiplier durch ungenügende Trennung der Emissionswellenlängen nicht mehr unterschieden. *Cross emission* verursacht neben falsch positiven Ko-Lokalisationsergebnissen auch falsche Intensitätsdaten. Um die *cross emission*-Komponente zu umgehen, mussten die CLSM-Parameter wie beispielsweise der spektrometrische Detektionsbereich, die Laser-Intensität und die Verstärkung, der sogenannte *gain*, für die Anwendung optimiert werden: Mit den folgenden Standard-Einstellung wurde gearbeitet: 2 bis 15 %-Laser-Intensität; Verstärkungsfaktor von ≤ 800 ; *pine hole* von 1 AU; Detektion: CFP: 480+/-40 nm, GFP: 525+/-50 nm, YFP: 535+/-30 nm, RFP: 620+/-62 nm.

Zusätzlich wurden Kontrollexperimente ausgeführt, um die *cross emission*-Komponente im Vorhinein abzuschätzen. Einzelfärbungen eigneten sich hier zur Referenzmessung (Abb. 14). Zur experimentellen Bestimmung des eventuellen *cross talks* des Fluoreszenz-Paares CFP-GFP wurden CHO-Zellen mit GFP-markiertem Pres transfiziert und das Signal ausgemessen, welches bei 405 nm-Anregung mit 2 %-Laser-Intensität unter ansteigender Verstärkung (*gain*: 600, 1000, 1200) in Bereich 480 +/- 40 nm (blauer Kanal) detektiert wurde (Abb. 14A, Abb. 15).

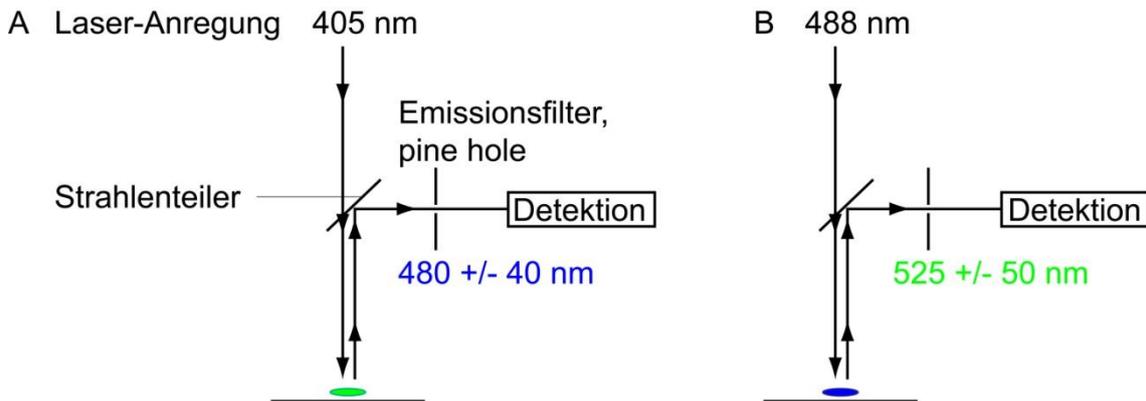


Abb. 14: Schematische Darstellung von Anregung und Detektion zur Abschätzung der *cross emission* von GFP- (A) und CFP- (B) transfizierten CHO-Zellen: In A wurde konfokal die GFP-Fluoreszenz detektiert, in B das CFP-Signal.

Bei einer Verstärkung von Faktor 600 wurde kein CFP-Signal detektiert, welches aus der GFP-Fluoreszenz hervorging (Abb. 15 zweite Zeile). Ein deutliches Signal wurde aber ab einer Verstärkung von Faktor 1000 ermittelt (A1, A2 und A3: stark leuchtende Punkte in dritter und besonders in vierter Zeile bei allen drei Orthologen). Dies resultierte nur geringfügig aus der Fluoreszenz des GFPs (wie z.B. bei zPres in B1 vierte Zeile), da die Signale häufig außerhalb der Zelle lokalisiert waren (vierte Reihe A1 und C1: rote Pfeile) oder keineswegs mit der Fluoreszenz des GFPs im Zusammenhang standen (blaue Pfeile). Die Laser-Anregung des CFP-Fluorophors erfolgte (mit einer Wellenlänge von 405 nm) nahe dem UV-Bereich, in dem Proteine mit aromatischen Aminosäure-Resten (280 nm) und die Peptid-Bindung (205 nm) eine hohe Absorption von ultraviolettem Licht zeigen. Folglich war eine starke Autofluoreszenz von Zelltrümmern ursächlich für den Großteil des detektierten Signals im CFP-Bereich.

Die Festlegung einer *region of interest* (ROI) bot die Möglichkeit, solche Signalüberlagerungen (z.B. von außerhalb der Zelle) weitestgehend von den Betrachtungen auszuschließen. Parallel zur visuell-mikroskopischen Aufzeichnung der Fluoreszenz der Zelle wurde in Abb. 15A2, B2 und C2 der korrespondierende *Scatter Plot* dargestellt, der sich durch die Festlegung der ROI ausschließlich auf die jeweilig dargestellte Zelle bezieht, d.h., die Fläche der ROI ist i.d.R. identisch mit der Fläche der Zelle. Um Ko-Lokalisationen semi-quantitativ abzuschätzen, wurden in dieser objektiven Darstellungsweise die einzelnen Pixel des detektierten CFP-Fluoreszenz-Signals auf der x-Achse intensitäts-abhängig aufgetragen.

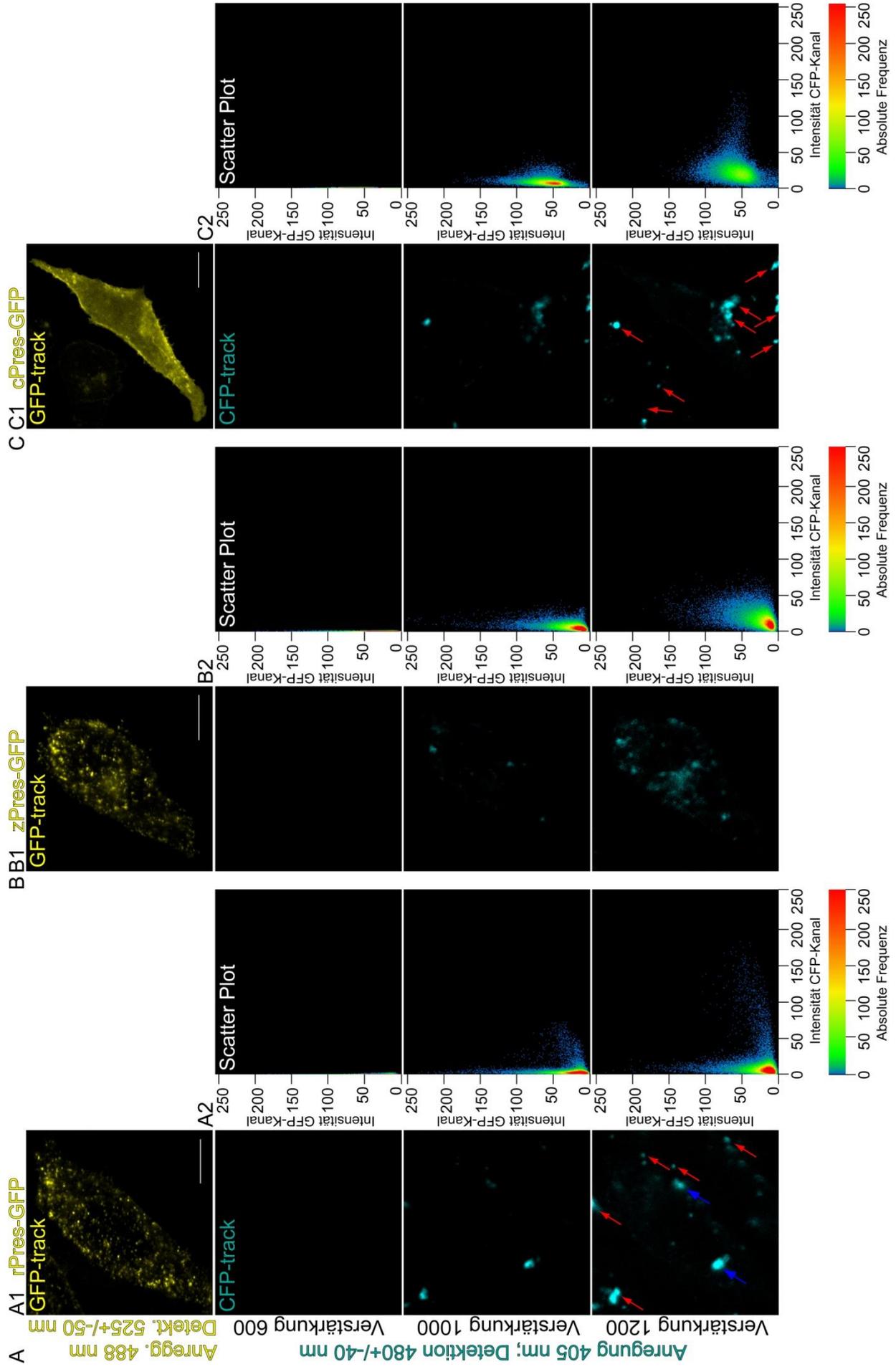


Abb. 15: Darstellung des ungewollten Anteils der GFP-Emission von rPres (A), zPres (B) und cPres (C) im CFP-Detektionsbereich in der CLSM bei verschiedenen Verstärkereinstellungen: Die GFP-Fluoreszenz je einer ausgewählten Zelle wurde gelb wiedergegeben, das CFP-Signal cyan-farben (für jedes Orthologe 3 unabhängige Transfektionen mit je n=6 Zellen). CHO; Maßstab-Skala: 10 μ m

Ebenso wurde mit den Pixeln der GFP-Fluoreszenz auf der Y-Achse verfahren. Bilden die aufgetragenen Punkte aus der CFP- und GFP-Fluoreszenz im *Scatter Plot* annähernd eine Gerade, so konnte von einem linearen Zusammenhang der Intensitäten der untersuchten Pixel ausgegangen werden. Weiterhin ermöglichte diese Art der Darstellung, die absolute Frequenz des Auftretens der Bildpunkte farbkodiert zu erfassen, um die Häufigkeiten der Pixel einer Ko-Lokalisation einschätzen zu können. Die *Scatter Plots* für den *cross talk* von Pres-GFP in den CFP-Kanal hinein zeigen die Fluoreszenz-Intensitäten der Bildpunkte, die sowohl aus der *cross emission* der Pres-GFP-Fluoreszenz wie auch aus der Autofluoreszenz im Bereich der betrachteten Zelle resultierte (A2, B2, C2 dritte und vierte Zeile). Aus diesen *Scatter Plots* kann abgelesen werden, dass bei hoher Verstärkung (\geq Faktor 1000) durchaus mit *cross emission* von GFP-Proteinen in den CFP-Kanal zu rechnen war. Bei einer Verstärkung von Faktor 800, mit der in dieser Arbeit maximal mikroskopiert wurde, traten aber weder UV- noch GFP-basierte *cross emissions* in beachtenswertem Ausmaß in Erscheinung.

Trotz der sehr geringen *cross emission* der GFP-Fluoreszenz in den CFP-Detektionsbereich hinein sollte dieser Fehler nachfolgend mit Hilfe von Kontrollmessungen quantitativ berechnet und veranschaulicht werden. Dafür wurde die Ko-Lokalisation von Cav-1-CFP mit dem homogen verteilten Membran-Marker Lyn-GFP der Ko-Lokalisation von Cav-1-CFP mit Lyn-RFP gegenübergestellt. Die Spektren von CFP und RFP liegen so weit auseinander, dass zwischen diesen Fluorophoren ein *cross talk* auszuschließen ist. Es wurden die drei verschiedenen Zeitpunkte 24 h, 48 h, und 72 h nach der Transfektion vergleichend betrachtet (Abb. 16). Eine Quantifizierung dieser Ko-Lokalisation erfolgte über die Kalkulation von Pearson's Ko-Lokalisationskoeffizienten R_r . Dieser ist ein Maß für den Grad eines linearen Zusammenhangs zweier Variablen. Hier basierte R_r auf den *Scatter Plots* und beschreibt die Korrelation der Pixel der GFP-Fluoreszenz von Pres und der CFP-Fluoreszenz von Cav-1. Ein R_r -Wert von 1 repräsentiert eine perfekte Korrelation der Variablen, währenddessen 0 auf eine zufällige Verteilung und -1 einen perfekten inversen, d.h. negativen Zusammenhang (Antikorrelation) der Variablen schließen lässt. Die angegebenen R_r -Mittelwerte beziehen sich auf ROIs, die jeweils identisch mit den Einzel-Zellen waren und auf die indizierte n-Zahl an analysierten Zellen. Die berechneten Korrelationskoeffizienten-Mittelwerte wurden anschließend nach den Richtlinien von Mukaka (2012) ausgelegt.

Für die Ko-Lokalisation von Cav-1-CFP + Lyn-GFP errechnete sich 24 h nach der Transfektion ein R_r -Mittelwert von 0,32. R_r wurde 48 h nach der Transfektion ebenfalls auf 0,32 kalkuliert.

Nach 72 h erreichte er 0,31. Über die Zeit variierte der R_r -Korrelationskoeffizient-Mittelwert der Ko-Expression von Cav-1-CFP + Lyn-RFP von 0,29 nach 24 h, über 0,3 nach 48 h und 0,29 nach 72 h nach der Transfektion. Die Mittelwerte der nur minimal schwankenden Korrelationskoeffizienten R_r über die Zeit sind in Tab. 6 zusammengefasst. R_r -Werte von 0,3 deuteten auf eine schwach positive Korrelation, also einen geringen linearen Zusammenhang der Lokalisation von Cav-1 und Lyn-GFP. Die ermittelten R_r -Werte für Cav-1 mit Lyn-RFP unter 0,3 galten als vernachlässigbare Korrelation.

Tab. 6: Quantifizierung der Ko-Lokalisation von CFP-GFP- und CFP-RFP-markierten Konstrukten:

Pearson's Ko-Lokalisationskoeffizient R_r	Cav-1-CFP + Lyn-GFP	Cav-1-CFP + Lyn-RFP
24 h nach der Transfektion	0,3160 (n=15)	0,2860 (n=15)
48 h nach der Transfektion	0,3193 (n=15)	0,2953 (n=15)
72 h nach der Transfektion	0,3085 (n=13)	0,2947 (n=15)

Für den statistischen Vergleich der Ko-Lokalisationskoeffizienten R_r (Tab. 6) wurde der unpaarige t-Test eingesetzt, mit dessen Hilfe ein Unterschied zwischen empirisch gefundenen Mittelwerten zweier Gruppen näher analysiert werden kann. Im Vergleich der R_r -Werte 24 h nach der Transfektion von Cav-1-CFP + Lyn-GFP und Cav-1-CFP + Lyn-RFP errechnete sich kein signifikanter Unterschied (zweiseitiger P-Wert 0,1619). 48 h (zweiseitiger P-Wert 0,0566) und 72 h nach der Transfektion (zweiseitiger P-Wert 0,5046) war der Unterschied ebenfalls nicht signifikant (Abb. 16). Die statistische Auswertung bestätigte, dass bei Verwendung des Fluorophor-Paares CFP-GFP im Vergleich mit CFP-RFP nicht mit einem signifikant höherem *cross talk* durch spektrale Überlappungen gerechnet werden musste (Abb. 16).

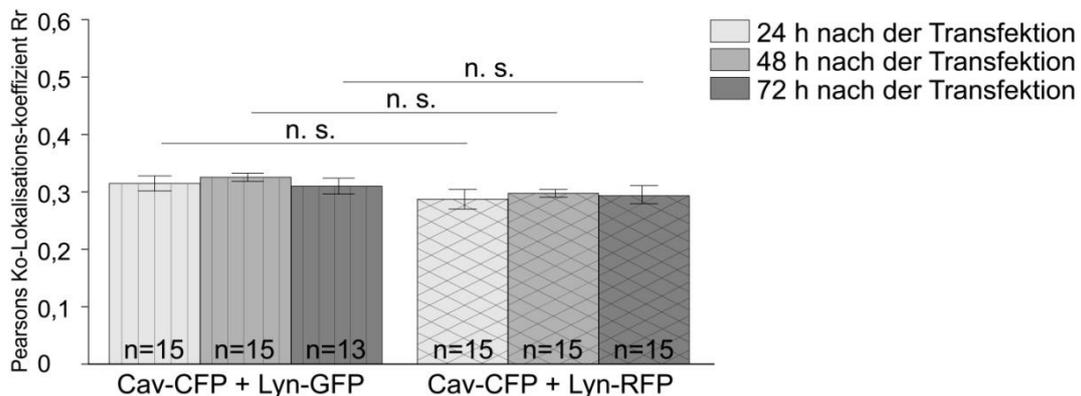


Abb. 16: Vergleich der Ko-Lokalisation von CFP-GFP- und CFP-RFP-markierten Konstrukten: Das Kürzel n.s. indiziert einen nicht signifikanten Unterschied der verglichenen Gruppen im unpaarigen t-Test (jeweils 3 Transfektionen: Cav-1-CFP + Lyn-GFP und Cav-1-CFP + Lyn-RFP je n= 15 (24 h, 48 h), Cav-1-CFP + Lyn-GFP n=13 (72 h), Cav-1-CFP + Lyn-RFP n=15 (72 h)).

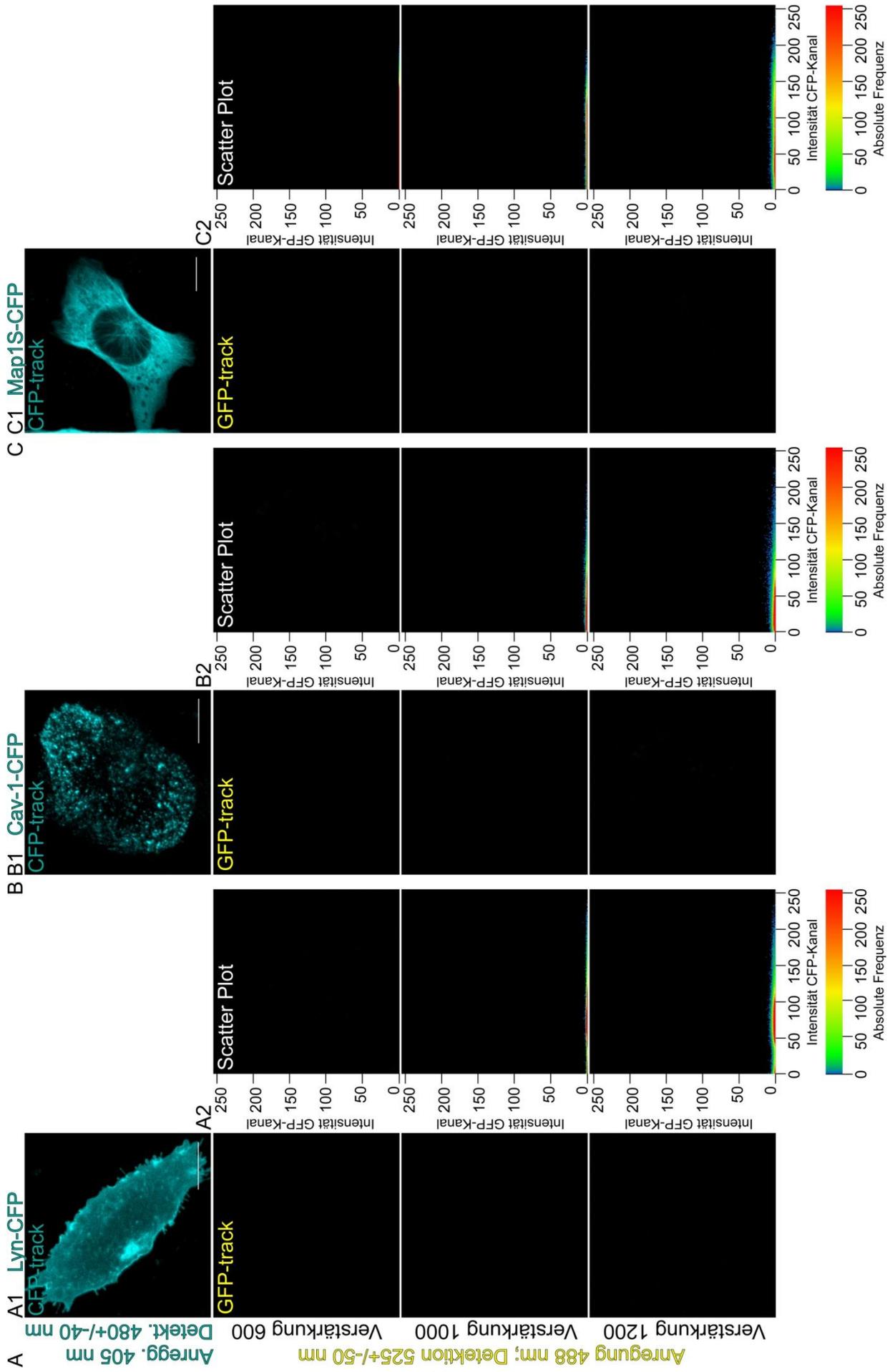


Abb. 17: Analyse der *cross emission* von CFP-Fusionskonstrukten in den GFP-Kanal in der CLSM bei verschiedenen Verstärker-Einstellung: CFP-Fluoreszenz: cyan-farben, GFP-Signal gelb; repräsentative Zellen aus 2 unabhängigen Transfektionen mit $n=10$ für jedes eingesezte CFP-Konstrukt; CHO; Maßstab-Skala: $10\ \mu\text{m}$

In einem weiteren Kontroll-Experiment wurde die *cross emission* von CFP in den GFP-Bereich bei den gewählten Standard-Einstellungen erfasst (Abb. 14B). Hierfür wurden drei CFP-Konstrukte mit unterschiedlicher Verteilung in CHO-Zellen ausgewählt: der Membran-Marker Lyn, das zytoskelett-assoziierte Map1S und Cav-1 (Abb. 17). Lyn-CFP verteilte sich gleichmäßig in der Plasmamembran (A1 erste Zeile), Map1S-CFP lag überwiegend netzwerk-artig verteilt vor (B1 erste Zeile) und Cav-1-CFP bildete punkt-förmige Strukturen aus (C1 erste Zeile).

Die visuell-mikroskopische Analyse der Konfokal-Aufnahmen der drei CFP-Konstrukte ergab bei allen getesteten Verstärkungen kein GFP-Signal (Abb. 17A1, B1, C1 zweite bis vierte Zeile). Im *Scatter Plot* lagen sämtliche Punkte bei einem Verstärkungsfaktor von 600 auf der x-Achse. Aufgrund der äußerst geringen GFP-Fluoreszenz der drei CFP-Proteine lagen auch bei den höheren Verstärkungen die Punkte achsennah (A2, B2, C2).

Angesichts dieser vernachlässigbar geringen Fluoreszenz war eine relevante CFP-*cross emission* in den GFP-Bereich auszuschließen. Diese *cross talk*-Analyse hatte zur Folge, dass in der CLSM unter Verwendung der hier gewählten Filter-Parameter zwei Fluoreszenzfusions-Konstrukte mit CFP- und GFP-Marker ohne substantielle Fehler zur Ko-Expression eingesetzt werden konnten.

3.4.4 Analyse und Darstellung der Lokalisationsdaten

Für die Wiedergabe der Lokalisationsdaten wurden verschiedene Darstellungsweisen gewählt. Zuerst sind die Konfokal-Aufnahmen aus den Einzel-*tracks* abgebildet. In der Überlagerung erscheinen die Informationen aus beiden *tracks* in einem Bild. Diese Abbildung der Fluoreszenz lieferte eine qualitative Information über die räumliche Nähe der gemessenen Signale. Des Weiteren ermöglichte die Auftragung der Fluoreszenz-Intensitäten über eine definierte Strecke (von zirka $15\ \mu\text{m}$, eingezeichnet als roter Pfeil in den Überlagerungs-Bildern) als *Line Plot* eine erste quantitative Analyse der Ko-Lokalisation. Schließlich erfolgt die Darstellung der Pixel-für-Pixel-Korrelation der Fluoreszenz-Intensitäten beider Kanäle in Form des *Scatter Plots*, um die räumliche Korrelation quantitativ zu erfassen. Basierend auf dieser pixel-weisen Korrelation wurde Pearson's Ko-Lokalisationskoeffizient R_r über die ROI berechnet, um objektiv-quantitative Angaben zur Ko-Lokalisation aus beiden Fluoreszenz-Kanälen zu erhalten. Die ermittelten R_r -Mittelwerte über die indizierte Anzahl der analysierten Zellen wurden nach der Pearson-Korrelationskoeffizient-Interpretations-Richtlinie von Mukaka (2012) eingeordnet. Der

statistische Vergleich der berechneten Mittelwerte der Ko-Lokalisationskoeffizienten R_r von Cav-1 mit jedem Pres-Orthologen (Tab. 7) wurde mit einem unpaarigen t-Test durchgeführt.

3.4.5 Ko-Lokalisationsanalyse von rPres und Cav-1

CHO- und HEK-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden für Cav-1-CFP und einem der drei Pres-GFP-Orthologen (rPres, zPres und cPres) transient ko-transfiziert. 24 h, 48 h und 72 h nach der Transfektion wurde die Fluoreszenz beider Kanäle konfokal-mikroskopisch analysiert.

Die Fluoreszenz-Signale der Ko-Expression von Cav-1-CFP und rPres-GFP ausgewählter CHO-Zellen sind in Abb. 18 wiedergegeben. 24 h nach der Transfektion lag rPres in seiner charakteristischen Verteilung als Membran-Cluster vor (A). Cav-1 war ebenfalls inhomogen verteilt (B). Die Signale beider Proteine überlappten partiell (C). Mit der Zeit nach der Transfektion nahm die Häufigkeit naher und überlappender Signale deutlich zu (C erste bis dritte Zeile). Der *Line Plot* verdeutlicht die räumliche Nähe der Fluoreszenz-Signale und ihre Zunahme über die Zeit (D), denn mit den Intensitäts-Maxima von rPres ko-lokalisieren 24 h nach der Transfektion einige Intensitätsspitzen von Cav-1; 72 h nach der Transfektion ko-lokalisieren mit jedem Fluoreszenz-Maximum von Pres ein Cav-1-Maximum. Der *Scatter Plot* (E) nach 24 h zeigt eine breite Streuung der Signale, die sich nach 48 h merklich verdichtet. 72 h nach der Transfektion bildeten die aufgetragenen Pixel-Intensitäten annähernd eine Gerade aus. Dies zeigt, dass eine zunehmende Korrelation der Intensitäten der Fluoreszenz-Signale aus beiden gemessenen Kanälen bestand, d.h., mit der Zeit nach der Transfektion verstärkte sich der lineare Zusammenhang zwischen rPres und Cav-1.

Die beobachtete zunehmende räumliche Ko-Lokalisation und die aus den *Scatter Plots* abgeleitete Zunahme der Korrelation von rPres und Cav wurde durch den Anstieg der gemessenen R_r -Mittelwerte über die drei Zeitpunkte nach der Transfektion (Tab. 7) weiter gestützt: Nach 24 h war der Korrelationskoeffizient R_r 0,59 und nach 48 h 0,68. Bis 72 h nach der Transfektion erhöhte sich der R_r -Wert auf 0,78. Somit nahm die Korrelation der Bildpunkte von moderat positiv korreliert (24 h, 48 h) zu streng positiv korreliert (72 h) zu.

Die Zunahme der ermittelten R_r -Werte von 24 h zu 48 h nach der Transfektion war statistisch sehr signifikant (zweiseitiger P-Wert = 0,001; Abb. 21). Der Unterschied zwischen dem 48 h- und dem 72 h-Wert war statistisch extrem signifikant (zweiseitiger P-Wert < 0,0001; Abb. 21).

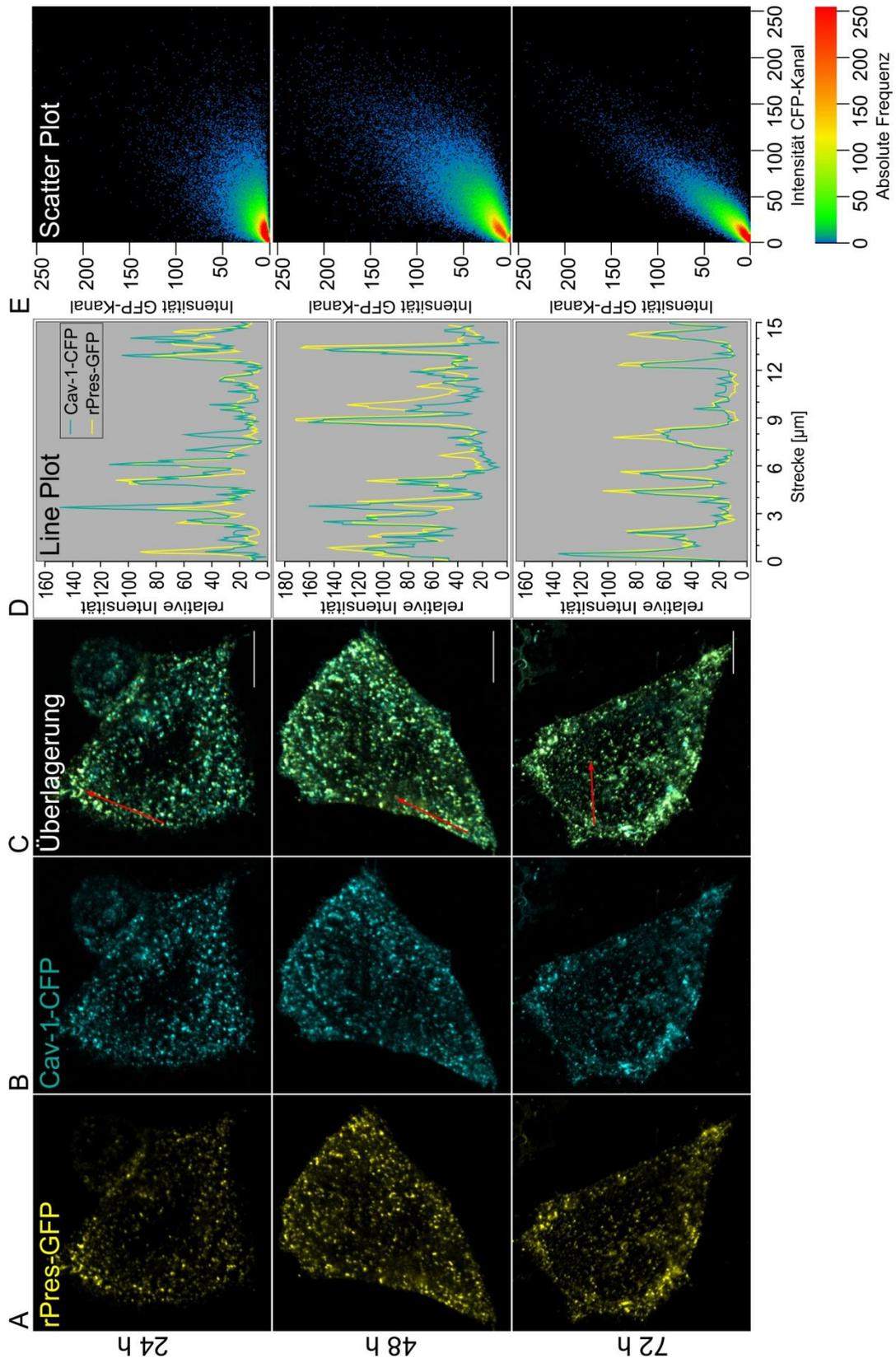


Abb. 18: Repräsentative Konfokal-Aufnahmen der Ko-Expression von rPres und Cav-1 in CHO-Zellen: Die Lokalisation von rPres und Cav-1 überlappt und nimmt mit der Zeit nach der Transfektion zu (24 h nach der Transfektion n=12, nach 48 h n=31 und nach 72 h n=14; je 3 unabhängige Transfektionen). Maßstab-Skala: 10 µm

3.4.6 Ko-Lokalisationsanalyse von zPres und Cav-1

Die konfokalen Lokisationsaufnahmen von zPres und Cav-1 (Abb. 19) zeigen 24 h nach der Transfektion ebenfalls (vergl. Abb. 18) eine räumliche Nähe der Fluoreszenz-Signale. 24 h nach der Transfektion bildete sowohl zPres wie auch Cav-1 die typische inhomogene Verteilung aus (Abb. 19A und B). Bei der visuellen Analyse der Überlagerungsbilder (C) fiel auch hier auf, dass sich die Überlappung der Fluoreszenz-Signale der beiden Proteine mit zunehmender Zeit nach der Transfektion verstärkte, denn von 24 h bis 72 h nach der Transfektion nimmt die Häufigkeit ko-lokalisierender Signale prägnant zu. Im *Line Plot* (D) treten 24 h nach der Transfektion mehrere Intensitätsspitzen von zPres gemeinsam mit Maxima von Cav-1 auf. Die Häufigkeit solcher lokal zusammen eintretender Maxima erhöhte sich, so dass 72 h nach der Transfektion jedes Maximum von zPres mit einem Fluoreszenz-Maximum von Cav-1 ko-lokalisierte. Die zugehörigen *Scatter Plots* zeigen eine zunehmende Korrelation der Intensitäten der Bildpunkte aus den beiden Fluoreszenz-Kanälen (E).

Die Mittelwerte der Korrelationskoeffizienten R_r nahmen von 24 h bis 72 h nach der Transfektion von 0,58 (n=17) über 0,67 (n=26) zu 0,8 (n=14) sichtlich zu (Tab. 7). Die damit verbundene Korrelation der Pixel von zPres und Cav-1 stieg somit von moderat streng positiv korreliert (24 h, 48 h) zu streng positiv korreliert (72 h) an. Die Progression dieser positiven Korrelation zeigt einen stark zunehmenden Zusammenhang der Signalintensitäten pro Pixel von zPres und Cav-1 über die Zeit nach der Transfektion auf und stützt folglich die Beobachtung der ansteigenden räumliche Ko-Lokalisation der beiden Proteine.

Der Unterschied des 24 h- und des 48 h- R_r -Wertes von zPres und Cav-1 war statistisch extrem signifikant (zweiseitiger P-Wert = 0,0001; Abb. 21). Die Unterschied der R_r -Werte von 48 h und 72 h nach der Transfektion war ebenfalls statistisch extrem signifikant (zweiseitiger P-Wert < 0,0001; Abb. 21).

Tab. 7: Quantifizierungsdaten der Ko-Lokalisation von Cav-1 mit den Pres-Orthologen in Abhängigkeit von der Zeit:

Pearson's Ko-Lokalisationskoeffizient R_r	Cav-1 + rPres	Cav-1 + zPres	Cav-1 + cPres
24 h nach der Transfektion	0,5892 (n=12)	0,5776 (n=17)	0,2845 (n=11)
48 h nach der Transfektion	0,6781 (n=31)	0,6731 (n=26)	0,6825 (n=28)
72 h nach der Transfektion	0,7757 (n=14)	0,7979 (n=14)	0,7946 (n=13)

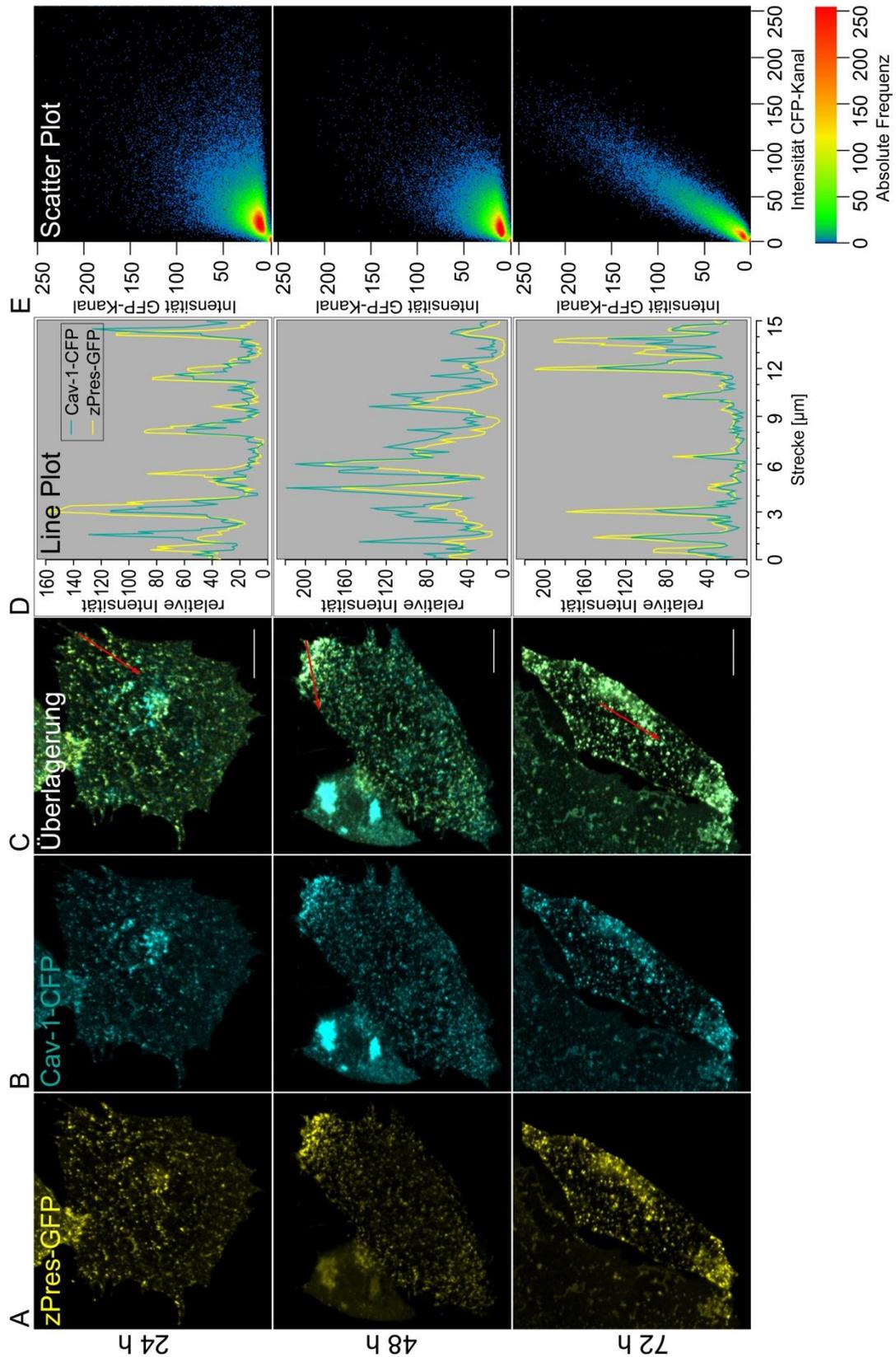


Abb. 19: Repräsentative Konfokal-Aufnahmen der Ko-Lokalisation von zPres und Cav-1 in CHO-Zellen: Die Ko-Lokalisation verstärkt sich mit der Zeit nach der Transfektion (24 h nach der Transfektion n=17, 48 h n=26, 72 h n=14 Zellen; je drei voneinander unabhängige Transfektionen); Maßstab-Skala: 10 µm

3.4.7 Ko-Lokalisationsanalyse von cPres und Cav-1

Das nicht cluster-bildende cPres lokalisierte 24 h nach der Transfektion homogen in der Plasmamembran und wies eine sehr geringe Ko-Lokalisation mit Cav-1 auf (Abb. 20A, B und C; Tab. 7). Nach 48 h war jedoch eine deutliche Zunahme der Überlappung beider Fluoreszenz-Signale zu verzeichnen, die sich bis 72 h nach der Transfektion weiter verstärkte. Dies zeigte sich durch eine ebenfalls punkt-förmige Verteilung von cPres (A erste bis dritte Zeile), wie sie in Gegenwart endogener Cav-1-Level nicht beobachtet wurde (Abb. 7 dritte Zeile). Die Verteilung von Cav-1 veränderte sich innerhalb der Membran nur geringfügig: Sie war minimal stärker punktiert bei weniger gleichmäßigem Hintergrund-Signal (vergl. Abb. 20B erste und zweite mit dritte Zeile). Der *Line Plot* spiegelt 24 h nach der Transfektion die homogene Verteilung von cPres durch gleichmäßige Intensitäten wider (D erste Zeile), währenddessen bei Cav-1 die typischen Maxima auftreten (D erste Zeile, vergl. auch Abb. 13). 48 h nach der Transfektion wurde die zunehmend ungleichmäßigere Verteilung von cPres ebenfalls durch Intensitätsspitzen repräsentiert (D zweite Zeile). Diese Intensitätsspitzen ko-lokalisieren örtlich mit Maxima von Cav-1. Nach 72 h hatte sich dieser Effekt weiter verstärkt (D dritte Zeile). Im *Line Plot* bildet sich die veränderte Verteilung von cPres und Cav-1 in Form von wenigen Maxima mit sehr geringer Fluoreszenz-Intensität zwischen diesen Maxima ab, wobei die auftretenden Intensitätsspitzen räumlich überlappten. Die 24 h-Aufnahme stellt sich im *Scatter Plot* als relativ breite Punktwolke dar (E erste Zeile), die sich bis 72 h nach der Transfektion merklich verengt (zweite Zeile). Diese voranschreitende Verengung der Punktwolke zur Geraden und damit die zunehmende Korrelation der Signalintensitäten pro Pixel von Cav-1 und cPres von 24 h bis 72 h nach der Transfektion lassen eine ansteigende räumliche Ko-Lokalisation ableiten (vgl. E erste bis dritte Zeile).

Die Mittelwerte der Ko-Lokalisationskoeffizienten über die Gesamtzahl an Einzelzellen (Tab. 7) nahmen von 0,29 (nach 24 h; vernachlässigbar korreliert) bei gleichmäßiger Verteilung von cPres über 0,68 (nach 48 h; moderat positiv korreliert) bei beginnender Überlagerung bis 0,8 nach 72 h nach der Transfektion (sehr streng positiv korreliert) prägnant zu. Aus der Zunahme der positiven Korrelation lässt sich ein sehr stark wachsender Zusammenhang der aufgetragenen Signalintensitäten pro Pixel von cPres und Cav-1 über die Zeit nach der Transfektion ableiten.

Die Zunahme der ermittelten R_r -Werte von 24 h zu 48 h nach der Transfektion war statistisch extrem signifikant (zweiseitiger P-Wert $< 0,0001$; Abb. 21). Der Vergleich der R_r -Mittelwerte von 48 h und 72 h ergab einen sehr signifikanten Unterschied (zweiseitiger P-Wert $< 0,0012$; Abb. 21).

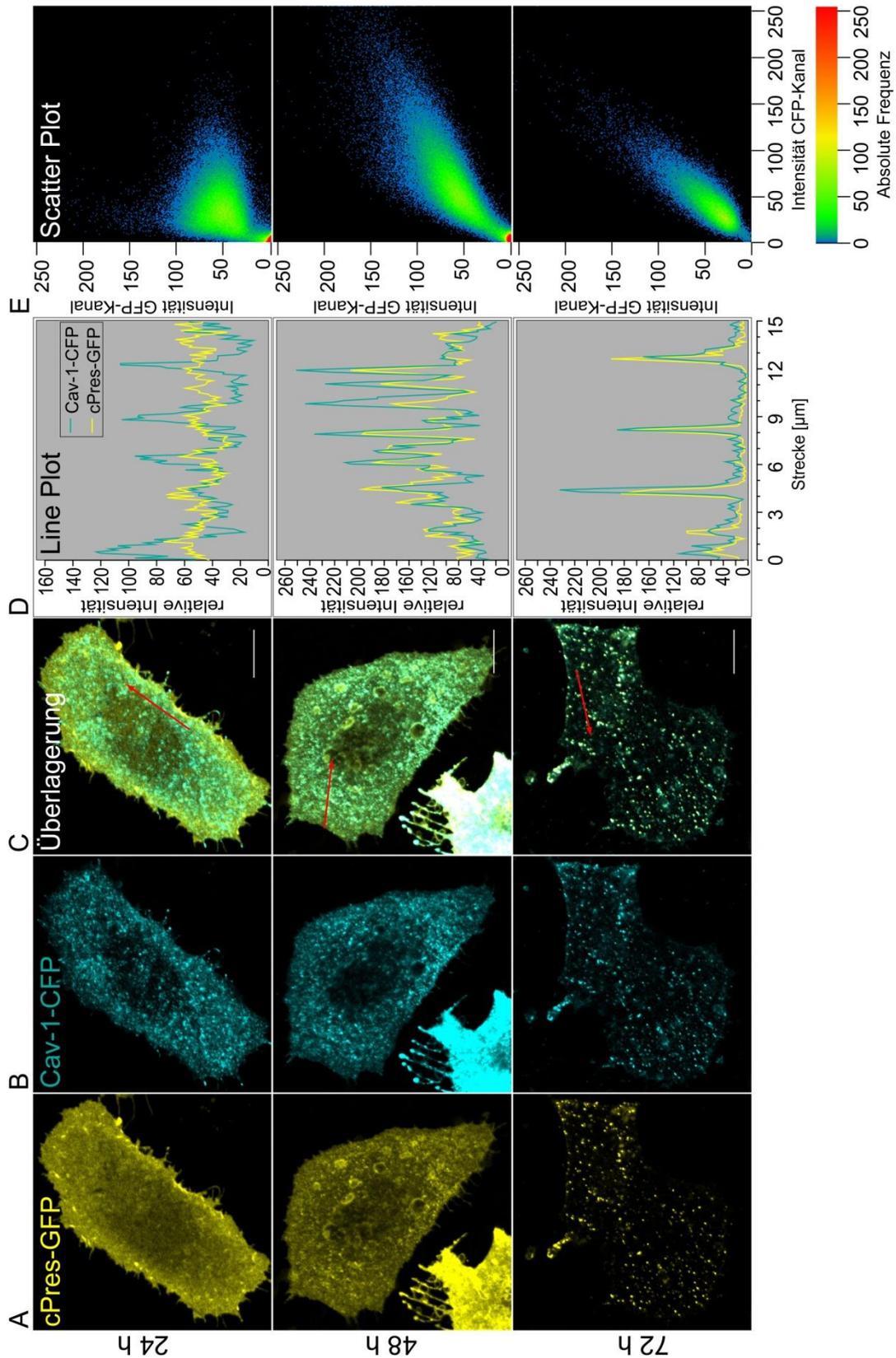


Abb. 20: Repräsentative CHO-Zellen der Ko-Expression von cPres und Cav-1: Die beiden Proteine ko-lokalisieren zunehmend mit der Zeit nach der Transfektion (24 h nach der Transfektion n=11, 48 h n=28, 72 h n=13 Zellen; jeweils mindestens 3 unabhängige Transfektionen). CLSM; Maßstab-Skala: 10 µm

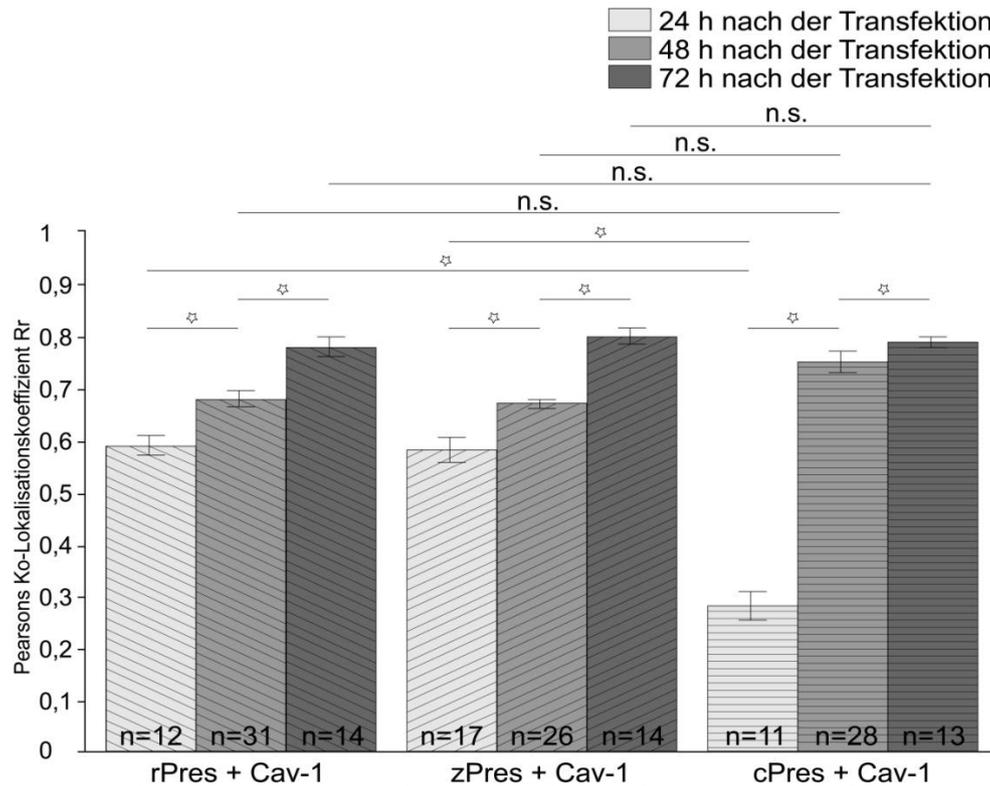


Abb. 21: Vergleich der Ko-Lokalisation der drei Pres-Orthologen mit Cav-1: Das Kürzel n.s. indiziert einen nicht signifikanten Unterschied der verglichenen Gruppen im unpaarigen t-Test. Der Stern markiert signifikante Unterschiede.

Der Unterschied der Rr-Werte zwischen rPres + Cav-1 und cPres + Cav-1 24 h nach der Transfektion war extrem signifikant (zweiseitiger P-Wert < 0,0001). Nicht signifikant hingegen war der Unterschied der Rr-Werte von rPres + Cav-1 und cPres + Cav-1 sowohl 48 h (zweiseitiger P-Wert = 0,8604) als auch 72 h (zweiseitiger P-Wert = 0,4112) nach der Transfektion (Abb. 21).

Der Unterschied der Korrelationskoeffizienten von zPres + Cav-1 und cPres + Cav-1 24 h nach der Transfektion wurde als extrem signifikant eingestuft (zweiseitiger P-Wert < 0,0001). Die Rr-Werte von zPres + Cav-1 und cPres + Cav-1 sowohl 48 h (zweiseitiger P-Wert = 0,6941) als auch 72 h (zweiseitiger P-Wert = 0,8729) nach der Transfektion unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

Mit diesen statistischen Daten wird gezeigt, dass sich die Ko-Lokalisation der clusternden Pres-Orthologen mit Cav-1 24 h nach der Transfektion von der Verteilung von cPres und Cav-1 grundsätzlich unterscheidet. 48 h und 72 h nach der Transfektion sind diese orthologenspezifischen Unterschiede nicht mehr nachweisbar.

3.4.8 Ko-Lokalisationsanalyse von Cav-1-CFP und Cav-1-YFP

Um zu kontrollieren, ob die Zunahme der Ko-Lokalisation der drei Pres-Orthologen mit Cav-1 (Abb. 21) auf unterschiedliche Expressionshöhen nach der Transfektion oder auf eine veränder-

te Lokalisation zurückzuführen war, wurde die Ko-Lokalisation zweier unterschiedlich markierter Cav-1-Konstrukte untersucht. Dazu wurden CHO-Zellen mit einem CFP-markiertem und einem YFP-markiertem Cav-1-Konstrukt ko-transfiziert und jeweils 24, 48 und 72 h nach der Transfektion analysiert. Zur Analyse der Ko-Lokalisation wurden die auf den *Scatter Plots* (nicht gezeigt) der Konfokal-Aufnahmen (nicht gezeigt) basierenden Korrelationskoeffizienten R_r berechnet und statistisch verglichen (Abb. 22).

Der Mittelwert des Korrelationskoeffizienten R_r von Cav-1-CFP und Cav-1-YFP zum Zeitpunkt 24 h nach der Transfektion berechnete sich auf 0,75 (n=18). 48 h nach der Transfektion erreichte R_r einen Wert von 0,74 (n=17), nach 72 h 0,77 (n=16). Zu allen drei Zeitpunkten ließen die Korrelationskoeffizienten auf eine streng positive Korrelation von Cav-1-CFP und Cav-1-YFP schließen.

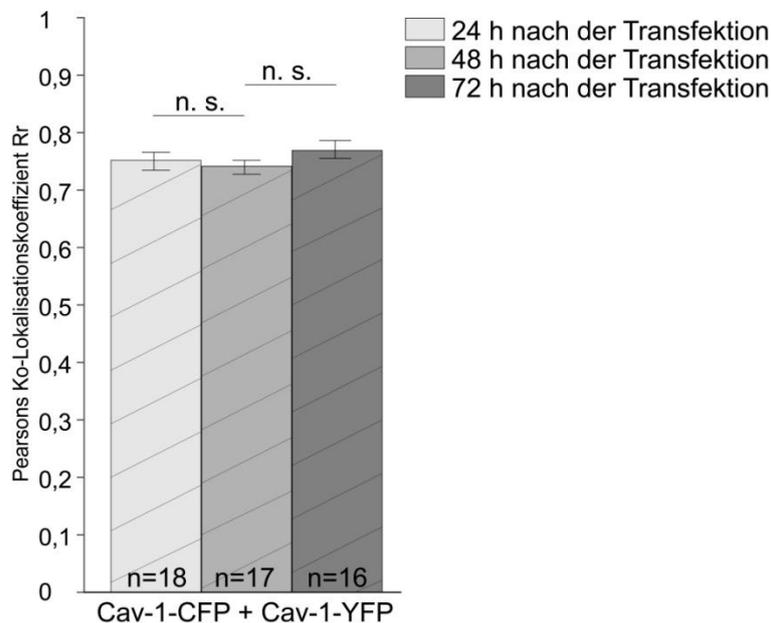


Abb. 22: Vergleich der Ko-Lokalisation von Cav-1-CFP mit Cav-1-YFP zu den drei Zeitpunkten nach der Transfektion: Das Kürzel n.s. indiziert einen nicht signifikanten Unterschied der verglichenen Gruppen unpaarigen im t-Test.

Der statistische Vergleich der R_r -Mittelwerte von Cav-1-YFP und Cav-1-CFP zu den Zeitpunkten 24 h und 48 h nach der Transfektion ergab keinen signifikanten Unterschied (zweiseitiger P-Wert = 0,5315; Abb. 22). Der Unterschied der R_r -Werte 48 h und 72 h nach der Transfektion war ebenfalls statistisch nicht signifikant (zweiseitiger P-Wert = 0,1308; Abb. 22).

Es besteht folglich kein signifikanter Unterschied der Ko-Lokalisationskoeffizienten der zwei Cav-1-Konstrukte zu den drei Zeitpunkten nach der Transfektion (24 h, 48 h, 72 h), d.h., es ist nicht mit unterschiedlichen Expressionshöhen zu diesen Zeitpunkten zu rechnen. Demzufolge ist wahrscheinlich auch die Zunahme der Ko-Lokalisation der Pres-Orthologen mit Cav-1 (Abb. 21) nicht auf einen Anstieg der Expressionshöhe der transfizierten Konstrukte zurückzuführen.

Die qualitative und quantitative Auswertung der Lokalisationsstudie der drei Pres-Orthologen mit Cav-1 dokumentiert eine ansteigende räumliche Überlappung der Proteine und damit eine signifikant zunehmende Ko-Lokalisation unabhängig von der initialen Clusterbildung der Pres-Orthologen. Die Ergebnisse deuten auf räumliche Translokationsprozesse der exprimierten Pres-Moleküle innerhalb der Membran hin. Dies betraf besonders initial homogen verteiltes cPres, während sich die Verteilung von Cav-1 nicht substantiell veränderte. In Gegenwart endogener Cav-1-Expressionslevel wurde dieser Translokationseffekt von cPres weder in CHO- noch in HEK-Zellen beobachtet (Abb. 7). Da Cav-1 mit der Ausbildung von Caveolae-Mikrodomänen assoziiert ist (Rothberg et al. 1992; Murata et al. 1995; Parton & Simons 2007), wurde aus der fortschreitenden Ko-Lokalisation von Cav-1 und Pres abgeleitet, dass Pres zunehmend in Caveolae lokalisieren kann.

3.5 Analyse des Verteilungsmusters von Pres in Cav-1-defizienten Zellen

Da heterolog exprimiertes Pres mit Cav-1 ko-lokalisierte (Abb. 18, Abb. 19, Abb. 20), stellte sich die nun Frage, ob die zugrunde liegenden Translokationsprozesse von Pres von einer Cav-1-Expression abhängig sind. Da sowohl die CHO- als auch die HEK-Zellen endogen Cav-1 exprimieren (Abb. 38; Wang et al. 2003; Yu et al. 2004; Wharton et al. 2005; Bernatchez et al. 2011), wurde die Lokalisation von Pres in zwei verschiedenen Cav-1-freien Säugerzelllinien untersucht. In der humanen hepatozellulären Krebszelllinie HepG2 (Fujimoto et al. 2000; Cokakli et al. 2009) wie auch in Cav-1-*knock out*-Mausembryofibroblasten (Cav-1^{-/-}MEFs) fehlen sämtliche endogene Cav-1-Proteine.

HepG2-Zellen und Cav-1^{-/-}MEFs wurden transient mit den Pres-Orthologen aus Ratte, Zebrafisch und Huhn als GFP-Fusionskonstrukte transfiziert und 48 h später analysiert. Zur besseren Darstellung der Fluoreszenz sind die Signale falsch-farben (gelb) abgebildet (Abb. 23).

Die untersuchten Pres-Orthologen aus Ratte, Zebrafisch und Huhn zeigten in den HepG2-Zellen eine Ko-Lokalisation mit dem Membran-Marker Lyn-RFP (nicht gezeigt). Daraus wird abgeleitet, dass Pres auch in Abwesenheit von Cav-1 plasmamembran-ständig lokalisiert ist (Abb. 23A). Das rPres und das zPres bildeten die charakteristischen Cluster aus. Das cPres hingegen war gleichmäßig in der Membran verteilt.

In den Cav-1^{-/-}MEFs wurde ebenfalls bei allen drei Pres-Orthologen eine membran-ständige Lokalisation beobachtet (partielle Ko-Lokalisation mit Lyn-RFP nicht gezeigt). Die Orthologen aus Ratte und Zebrafisch waren in der Plasmamembran geclustert verteilt, cPres zeigte eine homogene Verteilung (Abb. 23B). Daraus folgt, dass die transfizierten Pres-Konstrukte in beiden Zelllinien korrekt prozessiert und gefaltet wurden.

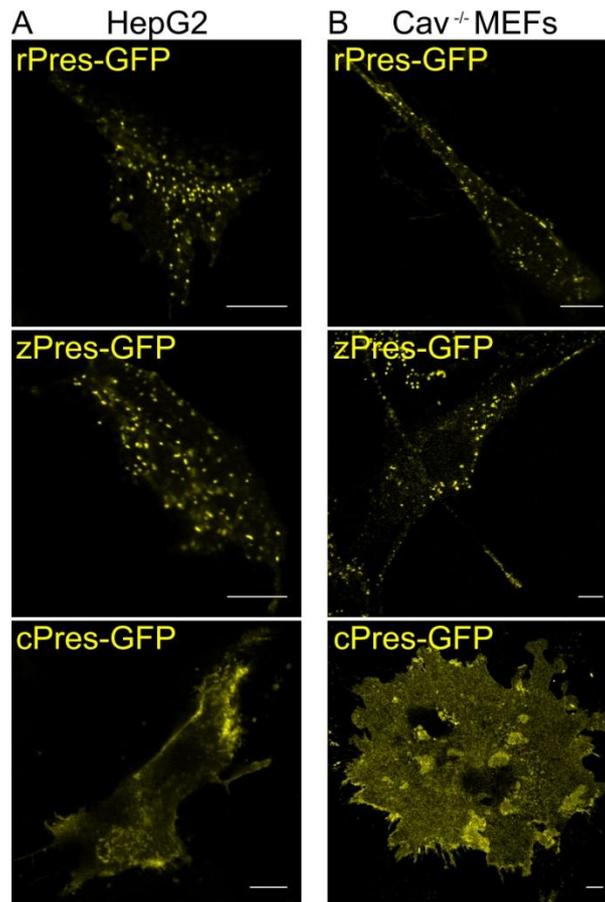


Abb. 23: Repräsentative Konfokal-Aufnahmen zur Verteilung der Pres-Orthologen in Cav-1-freien Zellen: rPres und zPres bilden in HepG2 (A) und in Cav-1-defizienten MEFs (B) Cluster; cPres verteilt sich homogen (HepG2: rPres n=16, zPres n=19, cPres n=15; Cav-1^{-/-} MEFs: rPres n=27, zPres n=16, cPres n=15; 3 voneinander unabhängige Transfektionen). Maßstab-Skala: 10 μ m

Alle drei untersuchten Pres-Orthologen lokalisierten in Cav-1-freien Zellen entsprechend ihrer charakteristischen Verteilung in der Membran wie in anderen bisher untersuchten Säugerzelllinien mit endogener Cav-1-Expression. Cav-1 war weder für die Lokalisation von Pres in der Plasmamembran noch für die Ausbildung der markanten Membran-Cluster des Ratten- und Zebrafisch-Orthologen essentiell.

3.6 Analyse der räumlichen Beziehung von Pres zum Zytoskelett

Für die besondere Funktion der ÄHZ spielt vermutlich die spezialisierte Zytoskelett-Struktur *cortical lattice* (CL) unterhalb der lateralen Plasmamembran eine essentielle Rolle (Jensen-Smith & Hallworth 2007; Legendre et al. 2008; He et al. 2010). Da der *knock out* von Pres den Verlust des CL in den ÄHZ nach sich zieht (He et al. 2010), könnte eine Wechselwirkung zwischen Zytoskelett-Elementen und Pres bestehen, die die Rekrutierung und die Lokalisation wechselseitig bestimmt. Im nächsten Abschnitt sollte daher untersucht werden, ob die Lokalisation von Pres im heterologen Expressionssystem in Abhängigkeit vom Zytoskelett erfolgt.

3.6.1 Darstellung der Aktin-Filamente

Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde das endogene exprimierte F-Aktin mit Hilfe von Phalloidin-Alexa Fluor 568 in CHO-Zellen 48 h nach dem Ausplattieren angefärbt.

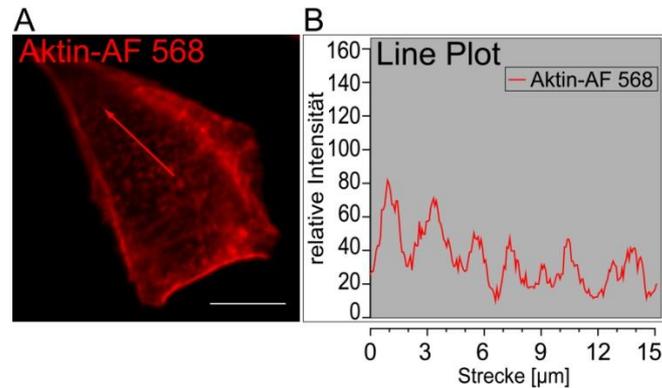


Abb. 24: Phalloidin-Färbung des Aktin-Zytoskeletts in CHO-Zellen: A) Es lassen sich Bündel-Strukturen und feinere Aktin-Punkte abbilden. B) Die Aktin-Punkte werden im *Line Plot* durch Maxima repräsentiert. Aktin-AF 568 = Aktin-Alexa Fluor 568; 2 Transfektionen mit $n=8$; CLSM; Maßstab-Skala: $10\mu\text{m}$

In den Konfokal-Aufnahmen erstreckten sich starke, lange Mikrofilament-Bündel über die gesamte Zelle (Abb. 24A). Zusätzlich wurden kleinere Aktin-Aggregate in Form von Punkten dargestellt.

3.6.2 Ko-Lokalisationsanalyse von Pres und Aktin

Im nächsten Schritt sollte die Ko-Lokalisation von Pres und Aktin untersucht werden. Dazu wurden CHO-Zellen transient mit Pres-GFP transfiziert. 48 h später wurde Aktin mit Phalloidin-Alexa Fluor 568 angefärbt.

Die konfokalen Lokalisationsaufnahmen zeigen eine partielle räumliche Überlappung der Fluoreszenz von rPres mit Aktin (Abb. 25A); dabei überlappen die rPres-Cluster mit den F-Aktin-Punkten, nicht aber mit den langgestreckten Aktin-Bündeln (siehe Vergrößerung A3). Im *Line Plot* (A4) ko-lokalisieren die rPres-Cluster, repräsentiert durch die Fluoreszenz-Maxima des gelben Profils, räumlich mit Intensitätsspitzen des roten Aktin-Fluoreszenz-Profiles. Die Ko-Lokalisation von Pres und Aktin wurde nicht über einen *Scatter Plot* und mit Pearson's Ko-Lokalisationskoeffizienten R_r quantifiziert, da die Ko-Lokalisation sich nur auf die Pres-Cluster mit den Aktin-Punkten beschränkte. Den Hauptanteil von Aktin formten aber die langen Aktin-Bündel, welche nicht mit Pres ko-lokalisierten. Der geringe Ko-Lokalisationsanteil über die Gesamtzelle kann weder als *Scatter Plot* noch über die R_r -Werte repräsentativ wiedergegeben werden.

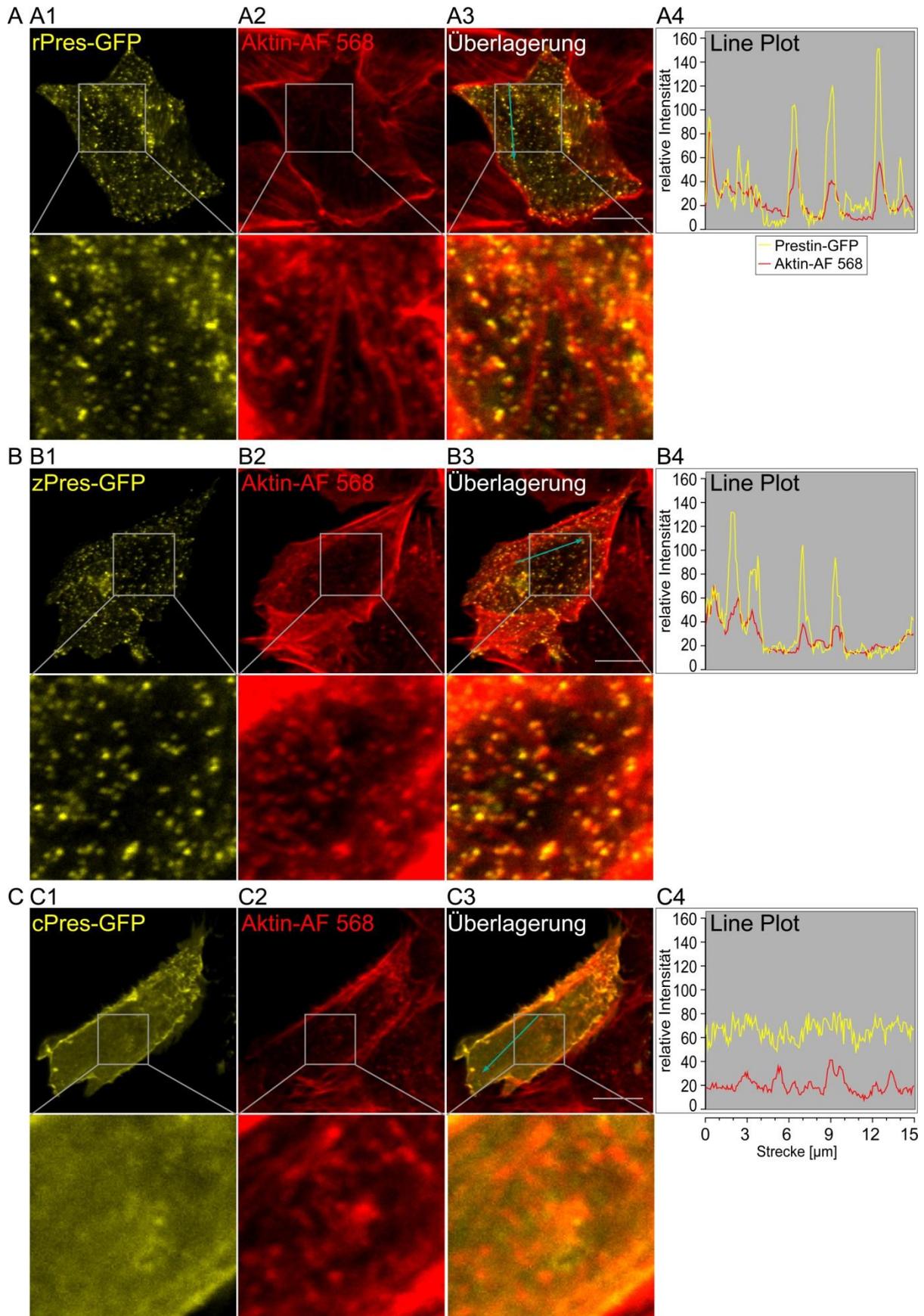


Abb. 25: Ko-Lokalisation von Pres und Aktin in CHO-Zellen: Die Cluster von rPres (A) und zPres (B) überlappen mit den Aktin-Punkten; cPres ko-lokalisiert aber nicht mit Aktin (C). Aktin-AF 568 = Alexa Fluor 568; n=15 für rPres, n=15 für zPres und n=15 für cPres; je 3 voneinander unabhängigen Transfektionen; CLSM; Maßstab-Skala: 10µm

In den Konfokal-Aufnahmen von zPres und Aktin wurde ebenfalls eine partielle räumliche Überlappung der Cluster mit den Aktin-Punkten beobachtet (Abb. 25B).

Die Ko-Lokalisation von rPres bzw. zPres mit Aktin veränderte sich nicht mit der Zeit nach der Transfektion von Pres (nicht gezeigt).

Die Überlagerung der Fluoreszenz-Signale von cPres und Aktin zeigen keine räumliche Überlappung (Abb. 25C). Aufgrund der gleichmäßigen Membran-Verteilung von cPres stellt der *Line Plot* auch keine Intensitätsmaxima dar (D). Aktin bildete in Gegenwart von cPres -neben den langen Bündeln- die Aktin-Punkte aus. Daraus wird die Schlussfolgerung gezogen, dass die Aktin-Punkte nicht durch Pres oder seine Cluster induziert wurden (vgl. auch Abb. 24).

Aus der Beobachtung der partiellen räumlichen Überlappung von rPres und zPres mit dem anteilig kleinen Pool an F-Aktin-Punkten (am gesamten darstellbaren F-Aktin) lässt sich ableiten, dass die Aktin-Punkte spezifisch eine hohe räumliche Nähe mit den Clustern von Pres ausbilden. Diese Ko-Lokalisation weist darauf hin, dass die Lokalisation der Pres-Cluster vermutlich eng mit F-Aktin verknüpft ist.

3.6.3 Abhängigkeit des Pres-Clusterings vom Aktin-Zytoskeletts

Aus den Pres-Aktin-Ko-Lokalisationsdaten (Abb. 25) ergab sich die Frage, ob die Lokalisation von Pres vom Aktin-Zytoskeletts abhängig ist. Folglich wurde das natürliche vorkommende Toxin Latrunkulin A (LatA) aus dem Schwamm *Negombata magnifica* eingesetzt. Es bindet monomeres G-Aktin in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 und verhindert die Polymerisation zu F-Aktin.

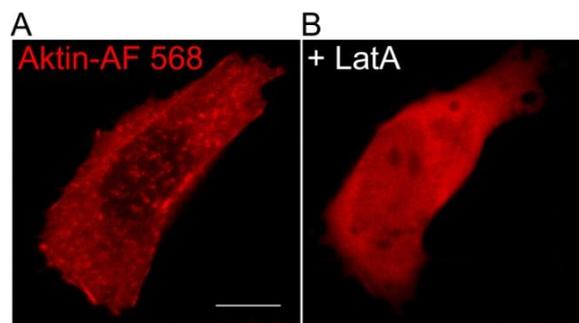


Abb. 26: Depolymerisation des Aktin-Zytoskeletts: Diese repräsentative CHO-Zelle (A) wurde mit 5 μM LatA für 30 min bei RT inkubiert (B); 3 unabhängige Transfektionen mit $n=21$; Aktin-AF 568 = Alexa Fluor 568; CLSM; Maßstab-Skala: 10 μm

Für diesen experimentellen Ansatz wurde zirka 48 h nach dem Ausplattieren das Aktin-Zytoskelett in CHO mittels Phalloidin-Alexa Fluor 568 angefärbt (Abb. 26A). Im nächsten Schritt wurden 5 μM LatA für 30 min bei RT mit den Zellen inkubiert (Abb. 26B).

Nach Zugabe des Inhibitors LatA löste sich das angefärbte Aktin-Netzwerk in den CHO-Zellen auf (Abb. 26B). Der Hauptteil des Aktins verteilte sich homogen im Zytoplasma. Die Aktin-Punkte wurden nicht mehr beobachtet.

Anschließend wurden transient Pres-GFP transfizierte CHO-Zellen nach mikroskopischer Kontrolle der normalen Expression und Lokalisation für 30 min mit 5 μM LatA bei RT inkubiert und konfokal-mikroskopisch untersucht (Abb. 27).

Die Inkubation der Zellen mit LatA löste die rPres-Cluster teilweise auf (Abb. 27B erste Zeile). Regelmäßig blieben einige wenige Cluster in der Peripherie der Zellen erhalten. Der Hauptteil der Fluoreszenz verteilte sich merklich gleichmäßiger in der Membran. Die Applikation von LatA auf zPres-exprimierende Zellen hingegen löste die Membran-Cluster vollständig auf (Abb. 27B zweite Zeile). Das gesamte Fluoreszenz-Signal verteilte sich homogen in der Plasmamembran. Daraus wird gefolgert, dass die Lokalisation von Pres in den Clustern vom Aktin-Zytoskeletts abhängig ist, wobei die Cluster-Formationen von zPres gegenüber LatA sensitiver sind als die rPres-Cluster. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass spezifisch zwischen den cluster-formierenden Pres-Orthologen und Aktin eine Protein-Protein-Wechselwirkung besteht.

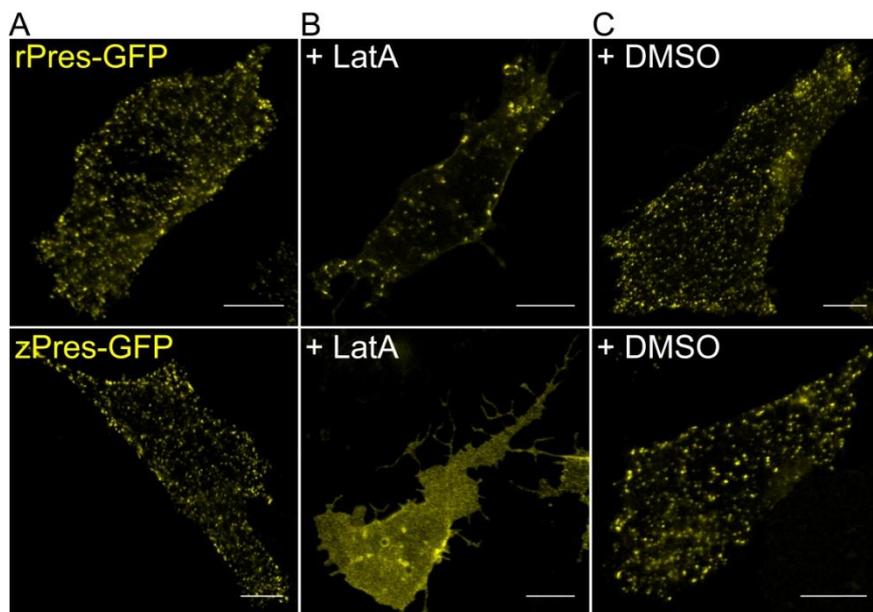


Abb. 27: Die Abhängigkeit der Pres-Cluster vom Aktin-Zytoskelett in CHO-Zellen: **A)** Die rPres-Cluster lösen sich partiell bei Inkubation mit 5 μM LatA (in DMSO; 30 min RT). **B)** Cluster von zPres lösen sich vollständig auf (5 Transfektionen mit n=33 für rPres und n=32 für zPres). **C)** DMSO hat keinen Effekt auf die Pres-Verteilung (3 Transfektionen mit rPres n=12, zPres n=13B). CLSM; Maßstab-Skala: 10 μm

Elektrophysiologische Messungen an transient rPres-transfizierten CHO-Zellen zeigten keine signifikanten Unterschiede der Pres-Funktion (NLC) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (Messungen durch Charlotte Köhne im Rahmen ihrer Bachelor-Arbeit „Einfluss von Membranmikrodomänen und Aktin-Cytoskelett auf die Funktion von Prestin“ (2013); nicht

gezeigt). Daraus folgt, dass die NLC von Pres im heterologen Expressionssystem unabhängig vom Aktin-Zytoskeletts und von der Lokalisation als Cluster generiert wird.

Um auszuschließen, dass das LatA-Solvens DMSO die beobachtete Cluster-Auflösung bewirkte, wurden Kontrollen mit der eingesetzten DMSO-Konzentration von 0,5 % allein durchgeführt. Die Inkubation der transfizierten Zellen in 0,5 % DMSO (in der Extrazellulär-Lösung) zeigte keinen Einfluss auf das Verteilungsverhalten von Pres (Abb. 27C erste und zweite Zeile). Die Auflösung der Pres-Cluster ist somit auf die LatA-induzierte Depolymerisation des Aktin-Zytoskeletts zurückzuführen.

5 μM lösten die Pres-Cluster auf, ohne substanziellen Stress auf die Zellen auszuüben. Neben 5 μM wurde die Inkubation mit 2,5 μM und 10 μM LatA getestet. Bei Einsatz der höheren Konzentration von 10 μM zerfielen die rPres-Cluster ebenfalls nicht vollständig. Verstärkt wurden im Laufe der Behandlung abgerundete Zellen beobachtet. Diese morphologischen Veränderungen vermutlich infolge von zunehmendem Stress durch die Zerstörung des Zytoskeletts könnten auf apoptotische Vorgänge hinweisen. 2,5 μM LatA lösten nur einen geringen Anteil der rPres-Cluster auf, aber sämtliche zPres-Cluster. Eine Verlängerung der Inkubationszeit und die Inkubation bei 37° C lösten die rPres-Cluster ebenfalls nicht vollständig auf, resultierten aber regelmäßig in morphologischen Auffälligkeiten der Zellen (nicht gezeigt).

Zytochalasin D (CD) hemmt die Polymerisation und Elongation von Aktin-Filamenten. In einem weiteren Versuchsansatz wurden Pres-transfizierte Zellen mit 25 μM CD für 2 h bei 37° C behandelt. Es konnte gezeigt werden, dass CD sowohl die rPres- wie auch die zPres-Cluster partiell auflöste. Bei beiden Orthologen blieben einige Cluster in der Peripherie bestehen (nicht gezeigt). Es lässt sich anhand der CD-Ergebnisse bestätigen, dass die Pres-Lokalisation in den Clustern vom Aktin-Zytoskelett abhängig ist.

3.6.4 Abhängigkeit des Pres-Clusterings von Mikrotubuli

Bai et al. (2010) zeigten bereits, dass das Mikrotubuli-Netzwerk keinen Einfluss auf die elektrophysiologische Aktivität von Pres hat. Es sollte nun untersucht werden, ob eine Abhängigkeit der Pres-Lokalisation in den Clustern von den Mikrotubuli besteht.

Dafür wurden CHO-Zellen mit rPres-GFP bzw. zPres-GFP transfiziert. 48 h später wurde Kolchizin, ein Spindelgift aus der Herbstzeitlosen (*Colchicum autumnale*) verwendet, um die Mikrotubuli zu depolymerisieren. Die Zellen wurden für 2 h mit 100 μM Kolchizin bei 37° C inkubiert und anschließend analysiert (Abb. 28).

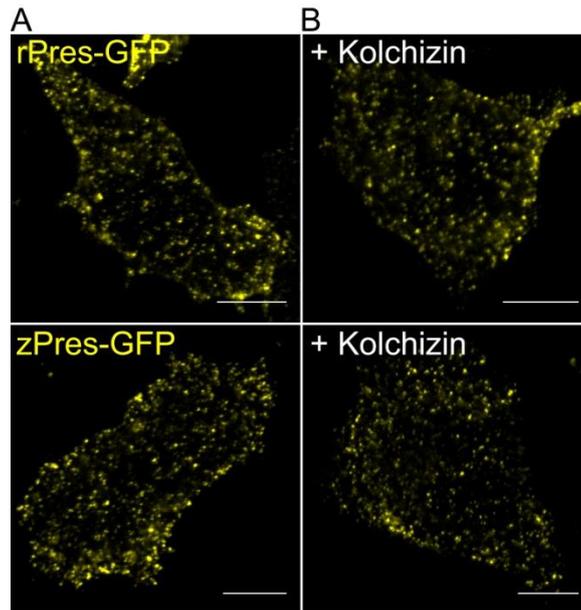


Abb. 28: Die Abhängigkeit der Pres-Verteilung von den Mikrotubuli in CHO-Zellen: A und B) Die Inkubation mit 100 μM Kolchizin (2 h, 37° C) zeigt keinen Einfluss auf die Lokalisation von Pres (3 Transfektionen mit n=21 für rPres, n=23 für zPres und n=29 für cPres 29 Zellen). CLSM; Maßstab-Skala: 10 μm

Die Konfokal-Aufnahmen stellen dar, dass das Mikrotubuli-Toxin keinen Effekt auf die Aufrechterhaltung der Pres-Cluster hat (Abb. 28B). Höhere Konzentrationen von 500 μM wie auch eine Verlängerung der Inkubationszeit zeigten im Vergleich mit unbehandelten Zellen ebenfalls keinen Einfluss auf das Clustering (nicht gezeigt).

Mikrotubuli sind demzufolge nicht in die Aufrechterhaltung der Pres-Cluster involviert.

3.6.5 Ko-Lokalisationsanalyse von Map1S und Pres

Das mikrotubuli- und aktin-bindende Protein Map1S (Orbán-Németh et al. 2005) interagiert in ÄHZ direkt mit Pres (Bai et al. 2010). Zudem wurden eine Verstärkung der Funktion und die Zunahme von Pres-Proteinen in der Plasmamembran bei Ko-Expression beider Proteine beschrieben (Bai et al. 2010). Diese Daten deuten auf eine Rolle von Map1S für die Lokalisation von Pres und für die Pres-vermittelte Funktion der ÄHZ hin. Der folgende Abschnitt befasst sich mit der Rolle des Zytoskelett-Proteins Map1S bei der Verteilung von Pres in der Plasmamembran im heterologen Expressionssystem.

3.6.5.1 Die Verteilung von heterolog exprimiertem Map1S

CHO-Zellen wurden mit Map1S-CFP transient transfiziert. Nach 48 h wurde die Expression des Fusionsproteins untersucht. Für die bessere Wiedergabe des CFP-Fluoreszenz-Signals wurde im Folgenden eine cyan-farbene Darstellungsweise für Map1S gewählt (Abb. 29).

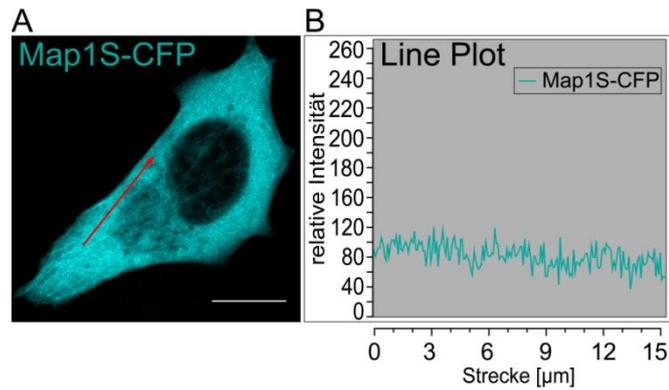


Abb. 29: Repräsentative Darstellung der Verteilung von MAP1S-CFP in CHO-Zellen: 3 unabhängige Transfektionen mit $n=32$; CLSM; Maßstab-Skala: 10 μm

Map1S verteilte sich inhomogen als feines, filament-artiges Netzwerk (Abb. 29A) und unterschied sich von der Darstellung des F-Aktins mit seinen starken Bündeln und den dazwischenliegenden Punkten (vergl. mit Abb. 24 und Abb. 25). Das Map1S-Netzwerk stellt wahrscheinlich Zytoskelett-Strukturen bestehend aus Aktin und Mikrotubuli im Zytoplasma dar, da Map1S mit beiden interagiert (Orbán-Németh et al. 2005). Die Zeit nach der Transfektion veränderte das Verteilungsverhalten von Map1S nicht (nicht gezeigt).

3.6.5.2 Ko-Lokalisationsanalyse von rPres und Map1S

Im Folgenden wurde eine Ko-Lokalisationsstudie durchgeführt, in der Map1S-CFP gemeinsam mit einem der Pres-GFP-Orthologen aus Ratte, Zebrafisch oder Huhn heterolog in CHO-Zellen exprimiert wurde (Abb. 30).

Das Ratten-Orthologe von Pres bildete bei Ko-Expression mit Map1S Membran-Clustern aus (Abb. 30A erste Zeile). Map1S verteilte sich in Gegenwart von rPres nicht mehr filament-artig, sondern es zeigte eine inhomogene, punkt-förmige Verteilung mit gleichmäßigem Hintergrundsignal (B). Diese Map1S-Punkte überlappten räumlich mit den rPres-Clustern (C). Im *Line Plot* ko-lokalisieren die Intensitätsmaxima von rPres mit denen von Map1S (D). Der *Scatter Plot* der rPres-Map1S-Ko-Lokalisation zeigt eine breite Punktwolke (E), die diese Ko-Lokalisation über die Gesamtzelle nicht ausdrucksvoll wiedergibt, da ein Großteil der Map1S-Fluoreszenz nicht mit der Fluoreszenz von rPres überlappte und somit den geringen Anteil an Ko-Lokalisation in den Punkten überlagerte. Die anteilig geringe Überlappung der Fluoreszenz bezogen auf die Gesamtzelle floss jedoch in die Berechnung von Pearson's Korrelationskoeffizienten R_r ein (Tab. 8). Für die Ko-Lokalisation von rPres mit Map1S wurde ein R_r -Mittelwert von 0,43 bestimmt, was auf eine schwach positive Korrelation der Bildpunkte von rPres und Map1S hindeutete.

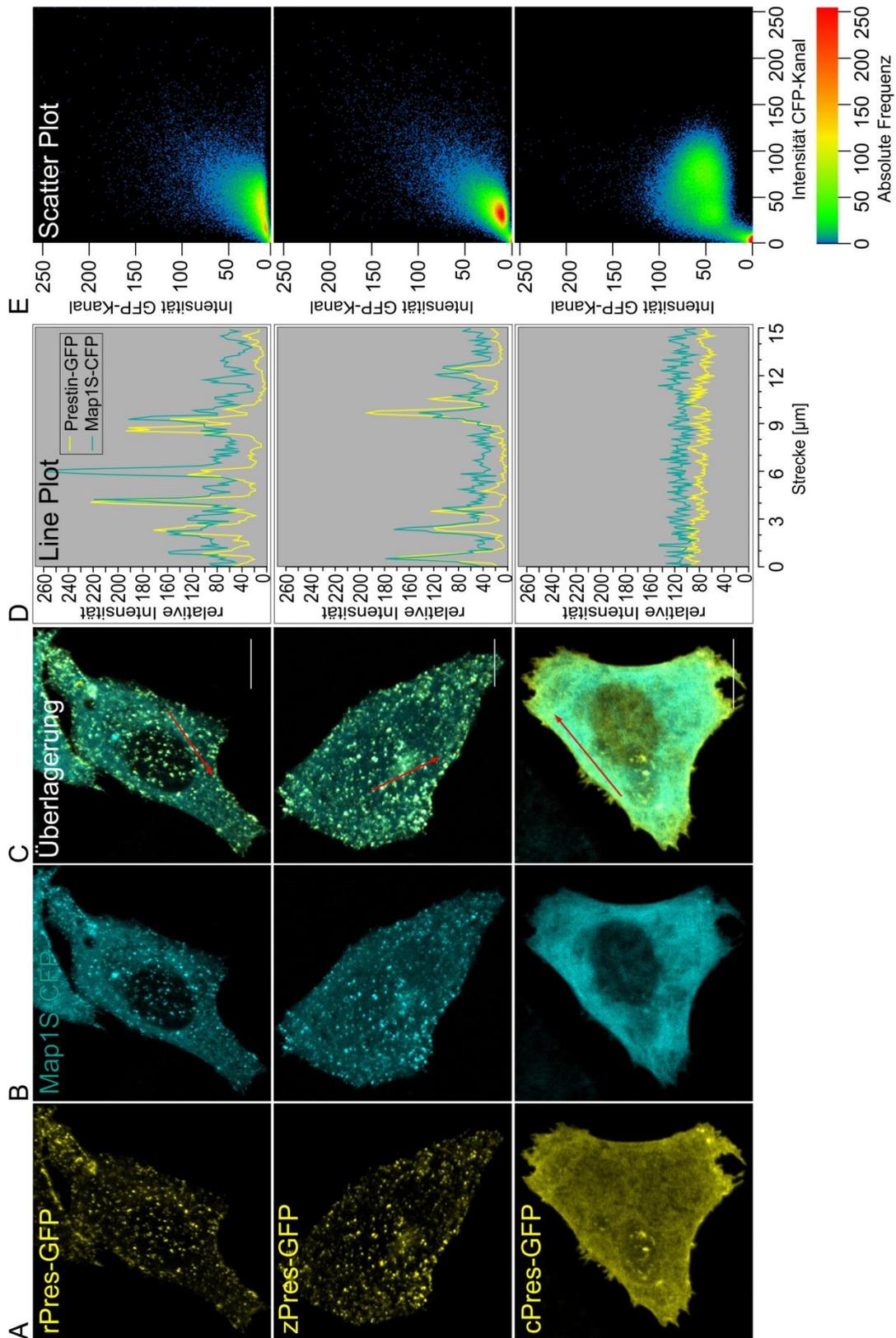


Abb. 30: Ko-Lokalisations-Analyse von Pres mit Map1S: Bei Ko-Expression von Map1S mit rPres (erste Zeile) bzw. zPres (zweite Zeile) bildet ein Teil von Map1S ebenfalls Punkte, die mit den Pres-Clustern überlappen (**A**, **B**, **C** erste und zweite Zeile). CPres ko-lokalisiert nicht mit Map1S (dritte Zeile); 3 Transfektionen mit $n=20$ für rPres+Map1S, $n=20$ für zPres+Map1S und $n=26$ für cPres+Map1S; CHO; CLSM; Maßstab-Skala: 10 µm

3.6.5.3 Ko-Lokalisationsanalyse von zPres und Map1S

Bei Ko-Expression von zPres und Map1S (Abb. 30 zweite Zeile) stellte sich Map1S ebenso inhomogen, punkt-förmig verteilt dar (B). Zwischen diesen Punkten wurde auch hier ein Hintergrundsignal mit relativ schwacher Fluoreszenz-Intensität verzeichnet (B). Die Map1S-Punkte überlappten mit den zPres-Clustern (C). Der *Line Plot* zeigt diese Überlappung durch die räumliche Nähe der Intensitätsmaxima aus beiden Fluoreszenzkanälen (D). Im *Scatter Plot* konnte auch hier die Ko-Lokalisation nicht deutlich wiedergegeben werden, weil die Fluoreszenz ebenfalls nur partiell, in einem geringen Pool überlappte (E). Die Ko-Lokalisation wurde mittels Rr auf 0,52 quantifiziert (Tab. 8). Somit bestand eine moderat streng positive Korrelation der Lokalisation von zPres und Map1S.

Tab. 8: Quantifikation der Ko-Lokalisation von Pres mit Map1S:

	rPres + Map1S	zPres + Map1S	cPres + Map1S
Pearson's Ko-Lokalisationskoeffizient Rr	0,4295 (n=20)	0,5225 (n=20)	0,0415 (n=26)

3.6.5.4 Ko-Lokalisationsanalyse von cPres und Map1S

Bei Ko-Expression von cPres und Map1S (Abb. 30 dritte Zeile) verteilte sich das Pres-Orthologe aus Huhn homogen (A). Map1S bildete eine gering inhomogene, feine, filamentartige Struktur aus wie sie in Abwesenheit von Pres beobachtet wurde (B, vgl. Abb. 29). Map1S ko-lokalisierte nicht mit cPres (C). Der *Line Plot* zeigt ebenfalls keine Überlappung der Fluoreszenz-Intensitäten (D). Der *Scatter Plot* stellt die Fluoreszenzdaten als sehr breite Punktwolke dar (E). Der Rr-Wert von nahe Null (0,04; Tab. 8) stellte heraus, dass die Bildpunkte voneinander unabhängig verteilt waren und dass keine Korrelation der Lokalisation von cPres mit Map1S bestand.

Die Zeit nach der Transfektion beeinflusste die Verteilung und die Ko-Lokalisation der drei Pres-Orthologen mit Map1S nicht (nicht gezeigt).

Der statistische Vergleich der ermittelten Korrelationskoeffizienten (Tab. 8) über den unpaarigen t-Test (Abb. 31) ergab einen extrem signifikanten Unterschied der Rr-Werte von rPres + Map1S und cPres + Map1S (zweiseitiger P-Wert < 0,0001). Der Unterschied zwischen den Rr-Mittelwerten von zPres + Map1S und cPres + Map1S war ebenfalls extrem signifikant (zweiseitiger P-Wert < 0,0001).

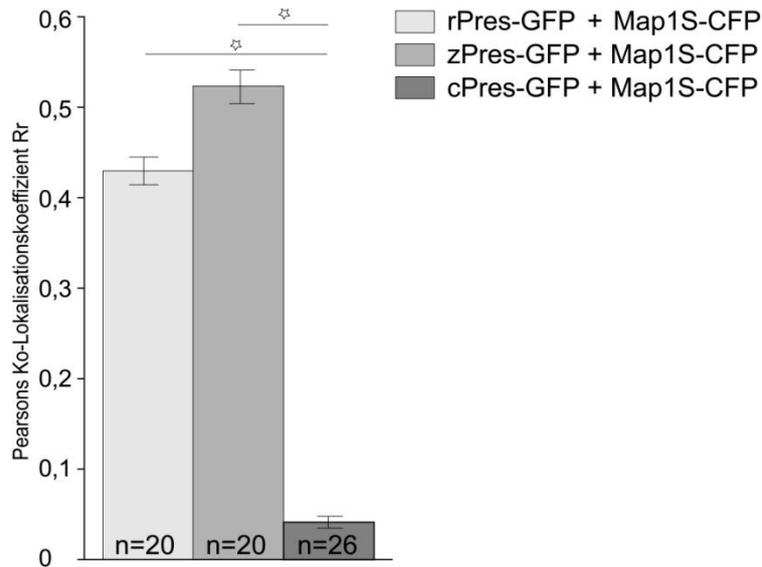


Abb. 31: Vergleich der Ko-Lokalisationsdaten von Pres und Map1S: Der Stern markiert einen signifikanten Unterschied im unpaarigen t-Test.

Mit diesen Ko-Lokalisationsdaten kann die zuvor von Bai et al. (2010) beschriebene Ko-Lokalisation von Pres mit Map1S (in ÄHZ) gestützt werden und deren Interaktion untermauert werden. Die gebildeten Map1S-Punkte, welche spezifisch mit den Pres-Clustern ko-lokalisierten, stellen vermutlich die Orte dieser Interaktion dar. Map1S-Punkte wurden weder in Pres-freien Zellen (Abb. 29) noch in Gegenwart von cPres beobachtet (Abb. 30 dritte Zeile).

3.6.6 Analyse der Stabilität der Pres-Cluster in Gegenwart von heterolog exprimiertem Map1S

Bisher konnte herausgestellt werden, dass die Lokalisation von Pres im heterologen Expressionssystem eng mit dem Zytoskelett verknüpft ist. Die Pres-Cluster zeigten eine hohe räumliche Nähe sowohl mit Teilen des Aktin-Netzwerkes (Abb. 25) wie auch mit dem zytoskelett-assoziierten Protein Map1S (Abb. 30). Weiterhin konnte demonstriert werden, dass die Stabilität der Pres-Cluster vom Aktin-Netzwerk abhängig ist (Abb. 27). Um zu überprüfen, ob heterolog exprimiertes Map1S die Stabilität der Cluster modifiziert, sollten die Zytoskelett-Manipulatoren LatA und Kolchizin eingesetzt werden.

Im ersten Schritt wurde die Wirkung von 5 μ M LatA (30 min bei RT) auf Map1S untersucht. Dazu wurden CHO-Zellen transient mit Map1S-CFP transfiziert. 48 h später wurde die Fluoreszenz vor und nach der LatA-Behandlung analysiert (Abb. 32).

In unbehandelten Zellen war Map1S-CFP filament-artig, inhomogen verteilt (Abb. 32A, vgl. Abb. 29). Neben einer Formveränderung der Zellen, in erster Linie der Abflachung (nicht gezeigt), resultierte die LatA-Behandlung in einer Auflösung der filament-artigen Verteilung von Map1S, so dass die Fluoreszenz deutlich homogener erschien (B).

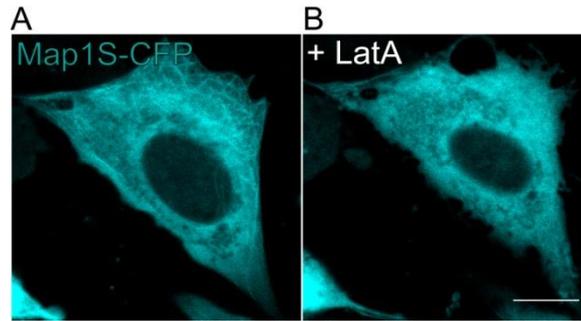


Abb. 32: LatA-Behandlung von Map1S-transfizierten CHO-Zellen: **A)** Repräsentative un-behandelte Zelle mit Map1S. **B)** 5 µM LatA lösen die charakteristische Verteilung von Map1S auf (3 voneinander unabhängige Transfektionen mit n=9 Zellen). CLSM; Maßstab-Skala: 10 µm

Um die Stabilität der Pres-Cluster in Gegenwart von heterolog exprimiertem Map1S zu testen, wurden CHO-Zellen transient mit den Pres-Orthologen aus Ratte bzw. Zebrafisch und Map1S ko-transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Expression und die Lokalisation kontrolliert. Anschließend erfolgte die Applikation von 5 µM LatA für 30 min bei RT auf die zuvor betrachtete Zelle. Nach dem Ende der Inkubationszeit wurde diese Zelle erneut konfokalmikroskopisch analysiert (Abb. 33). Die Lokalisationsdaten vor und nach der Behandlung mit LatA wurden quantifiziert (Tab. 9) und anschließend über einen zweiseitigen t-Test verglichen (Abb. 34).

In unbehandelten Zellen ko-lokalisierte Map1S partiell mit rPres bzw. zPres in den Bereichen der Membran-Cluster (Abb. 33 erste, vierte Zeile; vergl. mit Abb. 30). Nach Inkubation mit LatA (Abb. 33 zweite, vierte Zeile) lösten sich die rPres- und die zPres-Cluster nicht auf (A, E). Auch die Map1S-Punkte blieben erhalten (B, F). Die Überlagerungsbilder aus beiden Fluoreszenzkanälen wie auch die *Line Plots* verdeutlichen, dass LatA keinen Einfluss auf die Ko-Lokalisation der beiden Pres-Orthologen mit Map1S hat (C, D; G, H).

Der Pearson-Korrelationskoeffizient R_r vor der Behandlung mit LatA für rPres+Map1S war 0,43, nach der Behandlung lag er mit 0,41 geringfügig niedriger. Beide Werte ließen sich als schwach positive Korrelation auslegen. In unbehandelten Map1S+zPres-exprimierenden Zellen ergab sich ein Korrelationskoeffizient von 0,52. Nach der Applikation von LatA war er mit 0,51 ebenfalls geringer. Dieser entsprach einer moderat streng positiven Korrelation.

Tab. 9: Quantifikation der Ko-Lokalisation von rPres bzw. zPres mit Map1S vor und nach der Aktin-Depolymerisation:

	rPres + Map1S - LatA	rPres + Map1S + LatA	zPres + Map1S - LatA	zPres + Map1S + LatA
Pearson-Ko-Lokalisationskoeffizient R_r	0,4295 (n=20)	0,4089 (n=9)	0,5225 (n=20)	0,5144 (n=9)

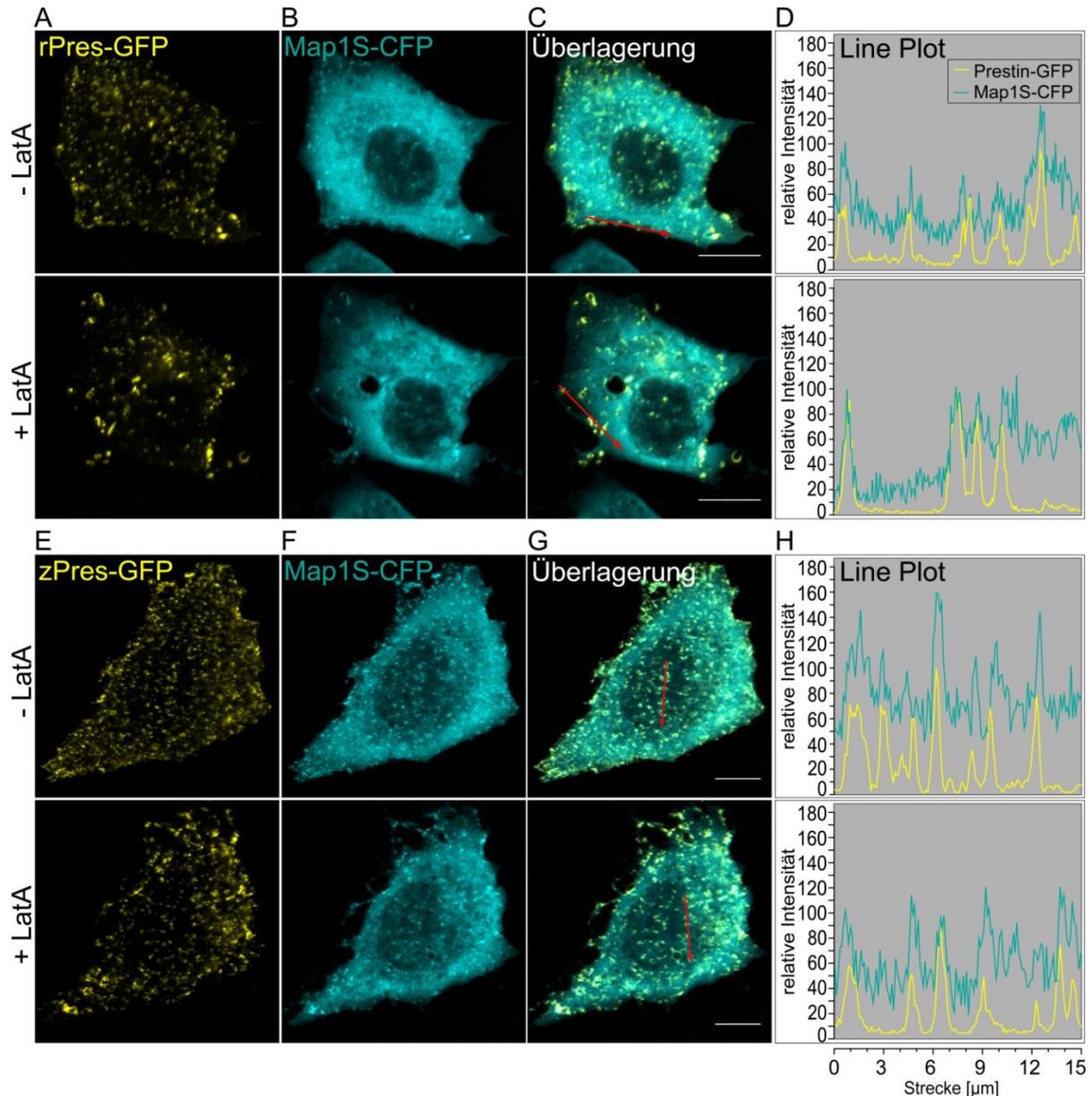


Abb. 33: Aktin-Abhängigkeit der Pres-Map1S-Ko-Lokalisation: In unbehandelten Zellen (erste und dritte Zeile) ko-lokalisieren die Pres-Cluster mit den Map1S-Punkten. Die LatA-Behandlung (zweite und vierte Zeile) löst weder die Ko-Lokalisation noch die Pres-Cluster auf (je 3 Transfektionen mit $n=9$). CHO; CLSM, Maßstab-Skala: 10 µm

Die Unterschiede der Korrelationskoeffizienten vor und nach der Inkubation mit LatA waren sowohl für Map1S+rPres (zweiseitiger P-Wert = 0,3913) wie auch für Map1S+zPres (zweiseitiger P-Wert = 0,7025) nicht signifikant (Abb. 34), d.h., die Pres-Map1S-Ko-Lokalisation blieb durch diese Zytoskelett-Manipulation unverändert.

In Gegenwart endogener Map1S-Mengen lösten sich die Pres-Cluster bei LatA-Behandlung auf (Abb. 27). Bei heterologer Expression von Map1S blieben sowohl die Pres-Cluster als auch die Ko-Lokalisation von Pres und Map1S bei LatA-Behandlung bestehen. Daraus ergibt sich, dass heterolog exprimiertes Map1S die Pres-Cluster wahrscheinlich über Wechselwirkungen stabilisieren und somit erhalten kann.

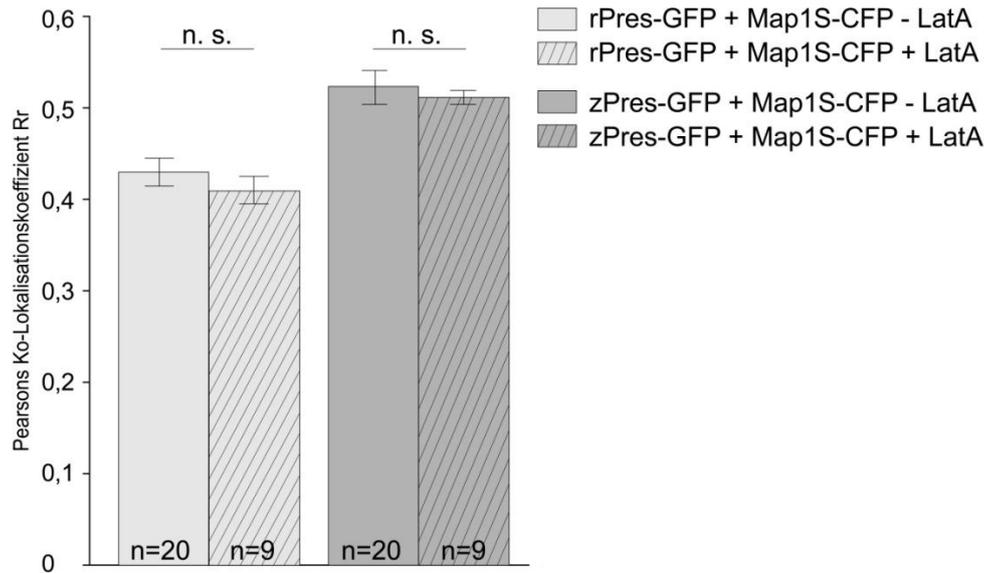


Abb. 34: Vergleich der Ko-Lokalisation von Pres mit Map1S vor und nach der LatA-Behandlung: Das Kürzel n.s. indiziert einen nicht signifikanten Unterschied im unpaarigen t-Test.

Bisher konnte aufgezeigt werden, dass die Pres-Cluster gegenüber der Behandlung mit Kolchizin bei endogenem Map1S-Level resistent sind (Abb. 28). Da aber Map1S eine basale Rolle für die Stabilität der Pres-Cluster spielt (Abb. 33) und es auch mit Mikrotubuli interagiert (Orbán-Németh et al. 2005), sollte die Fragestellung geklärt werden, erstens, ob in Gegenwart von heterolog exprimiertem Map1S ein Einfluss der Mikrotubuli auf die Cluster besteht und zweitens, ob die Hemmung der Polymerisation der Mikrotubuli sich auf die beschriebene Ko-Lokalisation von Map1S und Pres auswirkt.

Zunächst wurden CHO-Zellen mit Map1S-CFP transfiziert und die Fluoreszenz vor und nach der Behandlung mit 100 μ M Kolchizin für 2 h bei RT untersucht (Abb. 35).

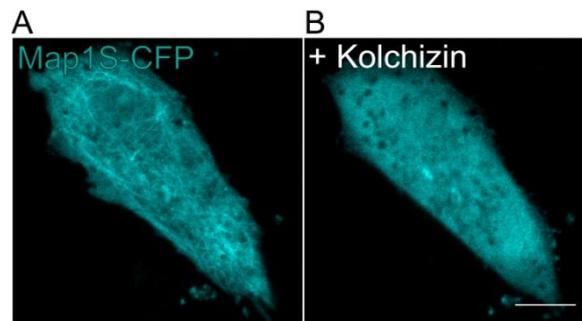


Abb. 35: Die Mikrotubuli-Abhängigkeit der Map1S-Verteilung: **A)** Repräsentative unbehandelte CHO-Zelle. **B)** Die Behandlung mit 100 μ M Kolchizin (2 h, RT) resultiert in einer homogenen Verteilung von Map1S (2 unabhängige Transfektionen mit n=14 Zellen). CLSM; Maßstab-Skala: 10 μ m

In unbehandelten Zellen verteilte sich heterolog exprimiertes Map1S inhomogen, filament-artig (Abb. 35A, vgl. auch Abb. 29). Diese Strukturen von Map1S lösten sich durch die Behandlung mit Kolchizin zu einer deutlich homogenen Verteilung auf (Abb. 35B).

Um den Einfluss der Mikrotubuli auf die Ko-Lokalisation von Map1S mit den Pres-Clustern zu untersuchen, wurden CHO-Zellen transient mit den Pres-Orthologen aus Ratte bzw. Zebrafisch und Map1S ko-transfiziert und vor und nach der Behandlung mit Kolchizin (100 μ M, 2 h, RT) analysiert (Abb. 36). Die Lokalisationsdaten wurden anschließend quantifiziert (Tab. 10) und statistisch verglichen (Abb. 37).

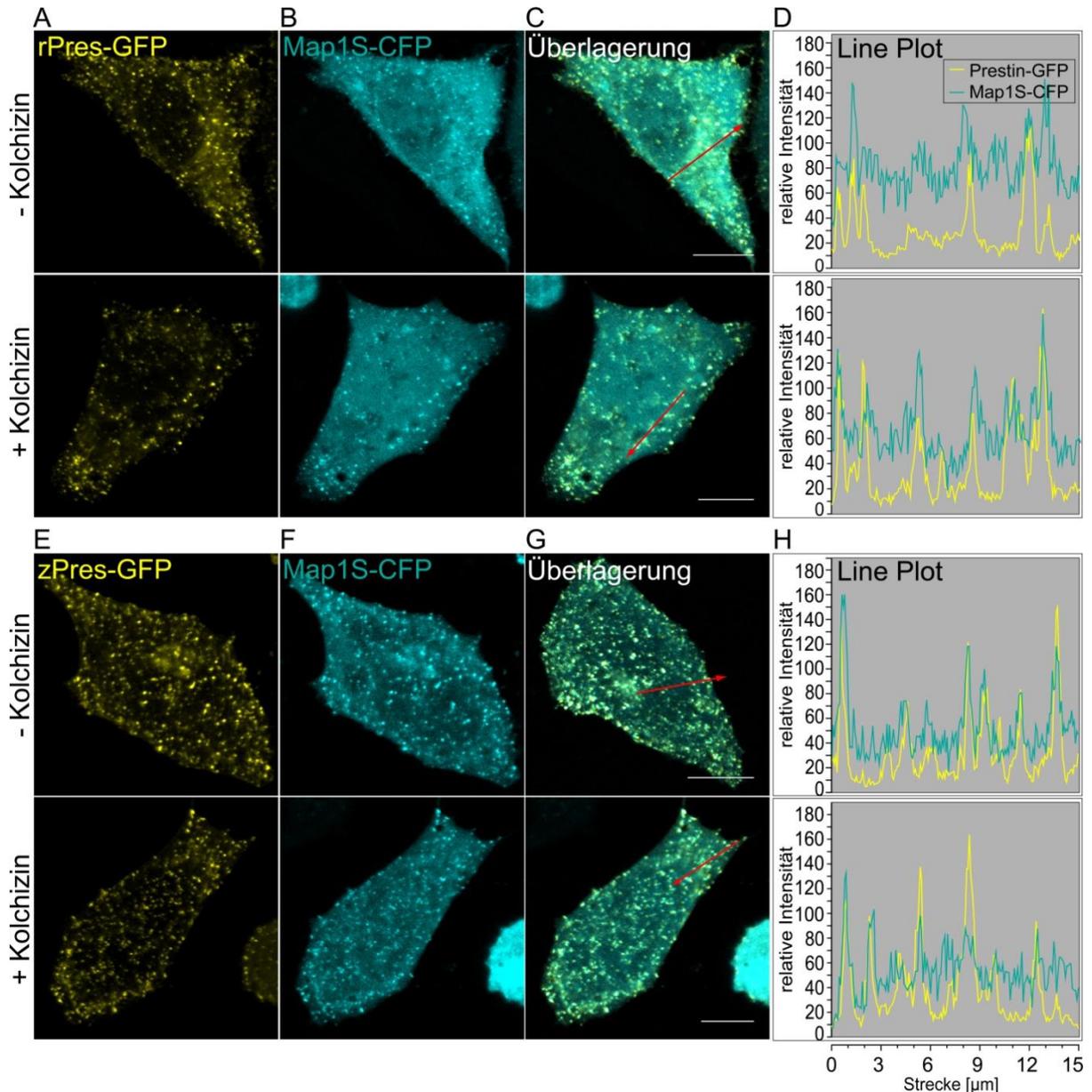


Abb. 36: Die Mikrotubuli-Abhängigkeit der Pres-Map1S-Ko-Lokalisation: Nach Behandlung mit Kolchizin (zweite und vierte Zeile; 100 μ M, 2 h, RT) bleibt die Ko-Lokalisation bestehen (je 2 Transfektionen mit $n=8$ für rPres+Map1S und $n=8$ für zPres+Map1S). CHO; CLSM; Maßstab-Skala: 10 μ m

In unbehandelten Zellen (Abb. 36 erste und dritte Zeile) ko-lokalisierten die Map1S-Punkte mit den Pres-Clustern (vgl. mit Abb. 30). Nach der Inkubation mit Kolchizin (Abb. 36 zweite und vierte Zeile) blieben sowohl die rPres- und zPres-Cluster (A, E) wie auch die Map1S-Punkte (B,

F) erhalten. Die Cluster von Pres überlappten auch weiterhin mit den Map1S-Punkten (C und D, G und H), d.h., die partielle Ko-Lokalisation blieb nach der Kolchizin-Behandlung bestehen.

Vor der Behandlung mit Kolchizin wurde für rPres+Map1S ein mittlerer Korrelationskoeffizient von 0,43 ermittelt. Dieser lag nach der Behandlung geringfügig niedriger (0,41). Beide Korrelationskoeffizienten ließen sich als schwach positive Korrelation einstufen. Für die unbehandelten Zellen mit Map1S+zPres-Transfektion ergab sich ein Rr-Wert von 0,52. Nach der Behandlung mit Kolchizin lag er bei 0,55. Dies entsprach einer moderat streng positiven Korrelation.

Tab. 10: Quantifikation der Ko-Lokalisation von Pres mit Map1S vor und nach der Behandlung mit Kolchizin:

	rPres+Map1S - Kolchizin	rPres+Map1S + Kolchizin	zPres+Map1S - Kolchizin	zPres+Map1S + Kolchizin
Pearson-Ko-Lokalisationskoeffizient Rr	0,4295 (n=20)	0,4063 (n=8)	0,5225 (n=20)	0,547 (n=8)

Der Unterschied der Rr-Werte vor und nach der Behandlung mit Kolchizin war statistisch nicht signifikant (Map1S+rPres: zweiseitiger P-Wert = 0,4109; Map1S+zPres: zweiseitiger P-Wert = 0,4344; Tab. 10, Abb. 37).

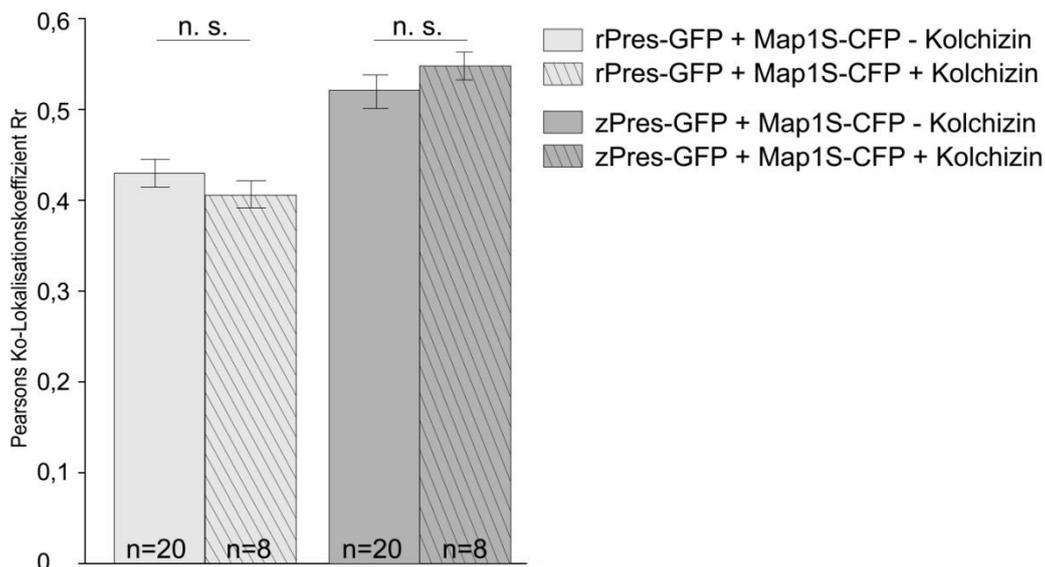


Abb. 37: Vergleich der Ko-Lokalisation von Pres mit Map1S vor und nach der Kolchizin-Behandlung: Das Kürzel n.s. indiziert einen nicht signifikanten Unterschied der verglichenen Gruppen im unpaarigen t-Test.

Aus der unveränderten Ko-Lokalisation von Map1S mit den cluster-bildenden Pres-Orthologen nach Zerstörung des Tubulin-Netzwerkes lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass die Ko-Lokalisation unabhängig von den Mikrotubuli war. Die Erhaltung der Pres-Cluster erfolgte ohne Einfluss der Mikrotubuli; auch die Anwesenheit von heterolog exprimiertem Map1S machte sie nicht von den Mikrotubuli abhängig. Die Erhaltung der Map1S-Punkte und eine mutmaßliche

Rekrutierung der Map1S-Moleküle in membran-nahe Bereiche in Gegenwart von clusterbildendem Pres waren ebenfalls nicht von den Mikrotubuli abhängig.

Zusammenfassend wurde aus den Ko-Lokalisationsdaten von Pres mit Zytoskelett-Proteinen abgeleitet, dass insbesondere Aktin an der Erhaltung der Pres-Cluster in der Plasmamembran beteiligt ist (Abb. 27). Neben Aktin begünstigte auch heterolog exprimiertes Map1S die Pres-Cluster in ihrer Stabilität und förderte deren Erhaltung - unabhängig vom Polymerisationszustand des Aktin- und Tubulin-Netzwerks.

3.7 Biochemische Analyse der Interaktion von Pres mit Cav-1, Aktin und Map1S

Bisher konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Pres-Cluster-Bildung eine intrinsische Qualität des Proteins ist (Abb. 9), die durch die endogenen TMD-Eigenschaften determiniert wird (Abb. 10). Exogene Faktoren, die das Clustering mitbestimmen, sind die Temperatur (Abb. 12) und der Cholesterolgehalt der Zelle (Abb. 11). Zudem beeinflussen heterolog exprimiertes Cav-1 (Abb. 18, Abb. 19, Abb. 20) und Map1S (Abb. 30) wie auch das Aktin-Zytoskelett (Abb. 25, Abb. 27) die Verteilung von Pres. Für die Proteine Cav-1, Map1S und Aktin konnte bis jetzt herausgestellt werden, dass sie sich in hoher räumlicher Nähe zu Pres befinden. Das folgende Kapitel geht nun der Frage nach, ob die mit Pres ko-lokalisierten Proteine Cav-1 und Aktin einen Protein-Komplex mit Pres ausbilden. Für Pres und Map1S wurde eine direkte Interaktion von Bai et al. (2010) bereits beschrieben.

Die Analyse bediente sich der biochemischen Methode der Ko-Immunopräzipitation (KoIP). In dieser Form von *pull down*-Assay wurde mittels Antikörper jeweils ein spezifisches Antigen bzw. dessen assoziierter Proteinkomplex aus einem Protein-Lysat aufkonzentriert, elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend im *Western Blot*-Verfahren nachgewiesen.

Als Ausgangsmaterial dienten 2 stabil mit Pres transfizierte HEK-Zelllinien: Eine Zelllinie exprimierte das Ratten-Orthologe, eine zweite das Hühner-Orthologe jeweils als GFP-Fusionskonstrukt. Zusätzlich erfolgte die transiente Transfektion mit KCNQ4 und Cav-1 (jeweils ohne Fluoreszenz-Marker). Die endogenen Cav-Level in HEK-Zellen sind gering (Abb. 38, Wang et al. 2003; Yu et al. 2004; Wharton et al. 2005; Bernatchez et al. 2011), so dass eine Anreicherung von Cav-1 fehlschlug. KCNQ4, ein spannungsgesteuerter Kalium-Kanal der sensorischen Zellen der Cochlea (Kubisch et al. 1999), wird endogen nicht in HEK-Zellen exprimiert (nicht gezeigt). KCNQ4 diente zur Kontrolle, um zu demonstrieren, dass die gezeigten Interaktionen spezifisch sind.

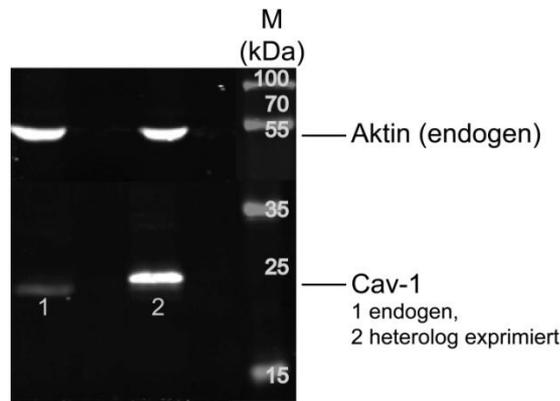


Abb. 38: Western Blot zum Vergleich der Cav-1-Protein-Level bei endogener und heterologer Expression in rPres-GFP-HEKs: Aktin dient als Ladekontrolle von jeweils 35 μ g des Gesamtzell-Lysats; 3 unabhängige Gesamtzell-Lysat-Präparationen von 3 Transfektionen; M = Marker-Banden in kDa

Die beiden Isoformen von Cav-1, Cav-1 α und β , (Scherer et al. 1995; Fujimoto et al. 2000) entstehen durch alternatives *splicing* (Kogo & Fujimoto 2000). Durch die alternative Translation-Initiation der gleichen mRNA (Shatz & Liscovitch 2008) unterscheiden sie sich in ihrem N-Terminus. Der hier eingesetzte α Cav-1-Antikörper erkannte spezifisch die ersten 17 N-terminalen Aminosäuren und detektierte folglich nur die α -Isoform von Cav-1 (Abb. 38). Die Bande bei zirka 22 kDa im *Western Blot* aus Gesamtzell-Lysaten (in Abb. 38: 1) ging dementsprechend auf die endogen exprimierte α -Isoform mit 178 Aminosäuren zurück. Die etwas langsamer laufende Bande (in Abb. 38: 2) des heterolog exprimiertem Cav-1 resultierte aus dem verwendeten Klonierungskonstrukt, welches neben den 178 Aminosäuren des Cav-1 noch weitere 5 Aminosäure bis zum Stopp-Codon enthielt. Diese 183 Aminosäuren lieferten eine Band bei zirka 24 kDa. Die Molekulargewichte des endogenen und des heterolog exprimierten Cav-1 entsprachen nicht genau den vorhergesagten Größen von 20 bzw. 21 kDa aus der Aminosäure-Sequenz (Yu et al. 2004), da Cav-1 in verschiedenen Zelltypen unterschiedlich posttranslational modifiziert wird (z.B. in NIH 3T3 multiple Phosphorylierungen im N-Terminus; Li et al. 1996; Cohen et al. 2004). Dieser Größenunterschied konnte in 3 unabhängigen Lysat-Präparationen in 3 Transfektionen von HEK293- (Abb. 38) wie auch in CHO-Zellen (nicht dargestellt) gezeigt werden. Aus den *Western Blots* folgt, dass es sich bei den detektierten Banden um das Protein Cav-1 handelte und dass der α Cav-1-Antikörper eingesetzt werden konnte, um in HEK-Zellen die α -Isoform von Cav-1 spezifisch zu detektieren. Cav-1 musste in HEK-Zellen heterolog exprimiert werden, um es robust detektieren zu können.

Für die KoIP wurden 48 h nach der Transfektion die HEK-Zellen geerntet und daraus Gesamtzell-Lysate hergestellt. Aus diesen Lysaten wurden die Membranen präpariert und die darin enthaltenen Membranproteine solubilisiert. Diese Membranprotein-Fraktion wurde nun eingesetzt, um daraus die gewünschten Proteine über spezifische Antikörper anzureichern. Die hier eingesetzten *pull down*-Antikörper waren gegen Pres (resp. das GFP vom Pres-GFP-

Fusionsprotein) bzw. gegen die Kandidaten-Proteine Cav-1, β -Aktin (β -Aktin wurde als eine der beiden primär im Zytoskelett exprimierten Aktin-Isoformen aus der Aktin-Genfamilie ausgewählt.) und KCNQ4 gerichtet. Die Proteine des Eluats wurden in einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Detektion der potentiellen Interaktionspartner. In einem parallelen Ansatz wurden Zellen vor ihrer Ernte für 30 min mit 10 mM β MCD behandelt. Die KoIPs wurden in 6 unabhängigen Ansätzen jeder Zelllinie durchgeführt. Die *Western Blot*-Daten in Abb. 39 geben einen dieser Ansätze aus rPres-HEKs im Vergleich mit dem Input wieder. Die Input-Menge entspricht 10 % des Einsatzes für die KoIP.

Zunächst wurden die Antikörper eingesetzt, um in den Eluaten nach der Anreicherung die korrespondierenden Proteine zu akkumulieren und nachzuweisen. So konnte über die Größen-Vorhersage der Zielproteine in behandelten und ebenso in unbehandelten Lysaten nachgewiesen werden, dass der GFP-spezifische Antikörper Pres-GFP, der KCNQ4-spezifische Antikörper KCNQ4, der β -Aktin-spezifische Antikörper Aktin und der Cav-1-spezifische Antikörper Cav-1 bindet (nicht gezeigt). Die genannten Antikörper konnten infolgedessen zur Akkumulation der assoziierten Protein-Komplexe eingesetzt werden.

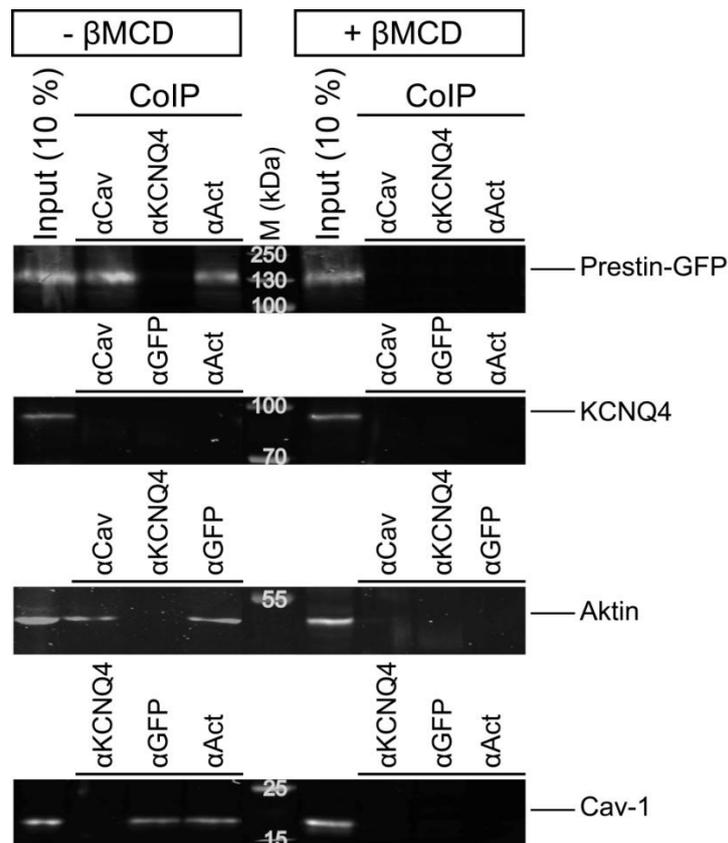


Abb. 39: Reziproke KoIP der Membran-Protein-Fraktion: *Pull-down* aus unbehandelten (links) und mit 10 mM β MCD behandelten (rechts) stabil rPres transfizierten HEK293-Zellen; 6 unabhängige Lysatpräparationen

Im *pull down*-Ansatz aus unbehandelten, stabil mit rPres-GFP transfizierten HEK-Zellen (Abb. 39 links) konnte Pres-GFP sowohl mittels cav-1- wie auch mittels aktin-spezifischer Antikörper-Akkumulation im Eluat nachgewiesen werden. Über keinen der eingesetzten Antikörper konnte KCNQ4 angereichert werden. Nach einer Anreicherung mit α Cav-1 und α GFP wurde im Eluat Aktin detektiert. Cav-1 wurde in den IPs über α GFP und α Akt gezeigt. Ein vergleichbares Resultat lieferten die Lysate von unbehandelten, stabil mit cPres-GFP transfizierten HEK-Zellen (nicht gezeigt).

Nach der β MCD-Behandlung der Zellen waren im Eluat nach der Anreicherung mit den Antikörpern die oben genannten Proteine nicht mehr nachweisbar (Abb. 39 rechts). In stabil mit cPres-GFP transfizierten HEK-Zellen war dies ebenso nicht möglich (nicht gezeigt). Zur Kontrolle wurden die Antikörper nochmals eingesetzt, um in den Lysaten die korrespondierenden Proteine anzureichern und nachzuweisen. So konnte auch nach einer β MCD-Behandlung nachgewiesen werden, dass der GFP-spezifischen Antikörper Pres-GFP, der KCNQ4-spezifischen Antikörper KCNQ4, der β -Aktin-spezifischen Antikörper Aktin und der Cav-1-spezifischen Antikörper Cav-1 akkumuliert (nicht gezeigt).

Aus diesen *pull down*-Daten lässt sich ableiten, dass rPres- und cPres-Proteine sowohl mit β -Aktin wie auch Cav-1 zumindest indirekt reziprok interagieren. Da Pres selbst mindestens zum Dimer assembliert (Navaratnam et al. 2005; Greeson et al. 2006; Zheng et al. 2006; Rajagopalan et al. 2007; Wang et al. 2010; Hallworth & Nichols 2012; Geertsma et al. 2015), bildet es vermutlich hetero-oligomere Komplexe aus. Weiterhin wurde gezeigt, dass β -Aktin und Cav-1 miteinander interagieren. Da diese Interaktionen nicht vom Verteilungsverhalten abhängig waren, also nicht spezifisch mit dem Clustering von rPres korrelierten, sondern ebenso für homogen verteiltes cPres gezeigt werden konnten, muss die Clusterbildung grundsätzlich getrennt von diesen Interaktionen betrachtet werden.

Es konnte gezeigt werden, dass sich die mikroskopisch-sichtbaren Pres-Cluster unter β MCD-Behandlung auflösten (Abb. 11). Daraus folgt, dass Pres diese Cluster in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt der Membran ausbildet. Aus den KoIP-Daten der β MCD-behandelten Zellen wird abgeleitet, dass bei Extraktion des Cholesterols der Protein-Komplex bestehend aus Pres, Cav-1 und Aktin zerfällt. Daraus lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass auch die Interaktionen beider untersuchten Pres-Orthologen durch den Cholesterolgehalt bestimmt werden und Pres in einem cholesterol-abhängigen Multi-Protein-Komplex organisiert ist.

4 DISKUSSION

Um die zugrunde liegenden Mechanismen der Elektromotilität zu verstehen, muss zuerst die biophysikalische Organisation der Plasmamembran der kochleären ÄHZ detailliert erforscht werden. Die Struktur der Pres-Domäne in der lateralen Membran der ÄHZ ist bisher wenig erforscht. So ist bekannt, dass die baso-laterale Plasmamembran der ÄHZ zwei strukturell und funktionell verschiedene Domänen ausbildet. Während der mit Elektromotilität assoziierte, laterale Bereich dicht mit Pres-Motorprotein-Partikel besetzt ist (Gulley & Reese 1977; Forge 1991; Kalinec et al. 1992; Ashmore 2008; Zheng et al. 2000; Belyantseva et al. 2000; Oliver et al. 2001), lokalisieren basal vornehmlich spannungsgesteuerte Kanäle. Als regulatorisches Struktur-Element zur Erhaltung dieser zwei Regionen schlugen Santos-Sacchi et al. bereits 1997 das CL vor. Weiterhin ist bekannt, dass die laterale Plasmamembran der ÄHZ in kleine Domänen strukturiert ist (Zhang & Kalinec 2002). Diese Mikrodomänen bewegen sich bei elektrischer Stimulation, sie verändern in Abhängigkeit vom elektrischen Feld ihre Orientierung (Kitani et al. 2013). Die Dynamik der Mikrodomänen wird sowohl durch die Lipid-Zusammensetzung als auch durch das Zytoskelett, insbesondere die Aktin-Filamente, reguliert (Kitani et al. 2013). Da die laterale Diffusion von Pres erheblich geringer ist als die von frei diffundierenden Proteinen (Organ & Raphael 2007), regulieren vermutlich Wechselwirkungen mit Proteinen oder Lipiden der Plasmamembran und/ oder dem Zytoskelett die native Pres-Domäne.

Um auf die Charakteristika der Pres-Domäne in den ÄHZ zu schließen, wurden in der vorliegenden Arbeit die intrinsischen Qualitäten und die biophysikalischen Eigenschaften der subzellulären Lokalisation von Pres im heterologen Expressionssystem analysiert und die folgenden Ergebnisse erzielt:

1. Hoch auflösende Lokalisations-Aufnahmen dokumentierten das spezielle Verteilungsmuster von Pres: Die Orthologen aus Ratte, Zebrafisch und Huhn wiesen eine plasmamembranständige Lokalisation auf, jedoch zeigten sie Unterschiede in ihrer Verteilung innerhalb der Membran. Dabei unterschied sich das homogen verteilte cPres von den beiden clusternden Orthologen. Die Cluster von rPres und zPres waren in Form und Größe unterschiedlich.
2. Um Determinanten der Membran-Verteilung von Pres zu ermitteln, wurden Chimären zwischen rPres und cPres kloniert. Die chimären Konstrukte RCC, CCR und RCR zeigten eine homogene Verteilung, keine NLC, aber einen Transport von divalenten Anionen. Diese Charakteristika deckten sich mit dem cPres-Wildtyp. Im Gegenzug hatten die Chimären CRR, RRC und CRC eine fokale Verteilung, ein deutlich messbares NLC-Signal, aber keinen Transport von Anionen. Diese Merkmale stimmten grundsätzlich mit rPres-Wildtyp überein.
3. Es wurde gezeigt, dass sich die Pres-Cluster durch eine Behandlung mit dem cholesterol-depletierenden Agens β MCD auflösten.

4. Die Temperatur-Studie demonstrierte, dass unter physiologischen Temperaturen (37° C) der Großteil der Pres-Moleküle gleichmäßig in der Plasmamembran verteilt war; ein geringer Anteil von Pres lokalisierte in den Membran-Clustern. Bei 22° C nahm die Lokalisation in den Clustern zu. Gleichzeitig verminderte sich die homogene Verteilung in der Membran.
5. Alle Pres-Orthologen zeigten eine fortschreitende Ko-Lokalisation mit Cav-1. In Cav-1^{-/-}-Säugerzellen lokalisierte Pres in der Plasmamembran; rPres und zPres bildeten Cluster.
6. Die Depolymerisation des Aktin-, nicht aber des Tubulin-Zytoskeletts, löste die Pres-Cluster auf. Weiterhin wurde eine partielle Ko-Lokalisation der Pres-Cluster mit den beiden Zytoskelett-Proteinen Aktin und Map1S beschrieben. Wurde Map1S heterolog exprimiert, so war eine Auflösung der Cluster weder mit LatA noch mit Kolchizin möglich.
7. Mit der KoIP konnte gezeigt werden, dass Pres in einem Protein-Komplex mit Cav-1 und β -Aktin vorliegt. Die Cholesterol-Depletion löste den Komplex auf.

Pres bildet eine orthologen-spezifische Verteilung in der Plasmamembran aus. Bei den mikroskopisch sichtbaren Clustern von rPres und zPres handelt es sich vermutlich um Molekülen-Ansammlungen von Pres in Plasmamembran-Mikrodomänen. Da hier gezeigt wird, dass rPres und zPres gemeinsame Cluster ausbilden können, sind deren Moleküle vermutlich in den gleichen Membran-Domänen lokalisiert. Aufgrund seiner gleichmäßigen Membran-Verteilung (bei endogenem Cav-1-Level und in Gegenwart von clusternden Orthologen) bevorzugt cPres keine Membran-Domänen. Die vorgelegten Daten von rPres und zPres sind mit Sturm et al. (2007) konsistent, die aufgrund der punkt-förmigen Fluoreszenz-Signale von Pres im heterologen Expressionssystem, der Ko-Lokalisation mit dem Mikrodomänen-Marker Integrin2 α VLA-2 α und dessen Ko-Fraktionierung bereits auf eine Akkumulation von Pres-Molekülen in spezifischen Membran-Mikrodomänen schlossen.

Allgemein gilt, dass die Entstehung von Molekülen-Ansammlungen einerseits maßgeblich durch die Ausbildung von intermolekularen, oligomeren Strukturen begünstigt wird. Andererseits fördert eine Lokalisation in Domänen eine Interaktion zum Oligomer. Aktuellen Daten zufolge interagieren Pres-Moleküle nicht über eine spezifische Oligomerisierungs-Struktur. Die Monomere, die vermutlich über die *gate domain* interagieren, bilden mindestens Dimere aus (Geertsma et al. 2015). Die Ausbildung von Oligomeren höherer Ordnung mit dem Dimer als Bau-Element wurde in Quartär-Strukturanalysen bereits gezeigt (Navaratnam et al. 2005; Zheng et al. 2006; Greeson et al. 2006; Rajagopalan et al. 2007; Wang et al. 2010; Hallworth & Nichols 2012); die genaue Stöchiometrie ist jedoch noch ungeklärt. Diese putativen Oligomere lokalisieren *in vitro* in die Membran-Domänen als Pres-Cluster.

Obwohl in der lateralen Membran der ÄHZ Mikrodomänen existieren (Zhang & Kalinec 2002), sind mikroskopisch sichtbare Pres-Cluster dort nicht beschrieben worden, denn in reifen ÄHZ

verteilt sich Pres homogen entlang der lateralen Membran (Winter et al. 2006; Abb. 6). Da aber Pres das mengenmäßig dominante Protein der ÄHZ ist (He et al. 2009) und die laterale Membran äußerst dicht mit Pres-Molekülen bepackt ist (Forge 1991; Kalinec et al. 1992; Ashmore 2008; Bai et al. 2010), könnten putative Pres-Cluster so nah beieinander liegen, dass ihre Lokalisation in der ÄHZ-Membran mikroskopisch homogen erscheint. Ein einziger, spezifischer Makro-Cluster als endogene Pres-Domäne ist aufgrund der Daten von Zhang & Kalinec (2002) und Kitani et al. (2013) unwahrscheinlich, weil die laterale ÄHZ-Membran offenbar aus mosaik-artig zusammengesetzten, dynamische Mikrodomänen besteht.

Die analysierten Eigenschaften der Chimären, ihre Verteilung in der Plasmamembran und ihre elektrophysiologischen Charakteristika, ermöglichen eine Einteilung in cPres-artige und rPres-artige Chimären. Diese Einteilung lässt darauf schließen, dass das spezifische Verteilungsverhalten der Pres-Orthologen durch die intrinsischen Eigenschaften der TMD determiniert wird. D.h., die Fähigkeit zur Cluster-Bildung von rPres und zPres liegt in der TMD des Pres-Proteins selbst, während die TMD von cPres für eine homogene Verteilung kodiert. Die Ergebnisse implizieren ebenfalls, dass die Termini keinen wesentlichen Einfluss auf das Verteilungsverhalten von Pres haben. Für ein korrektes Membran-*targeting*, die Oligomerisierung und die elektro-mechanische Aktivität von Pres sind die Termini hingegen von Bedeutung (Navaratnam et al. 2005). Während der intakte N-Terminus für die Homo-Oligomerisierung von Pres in CHO-Zellen essentiell ist, führt eine vollständige Trunkierung des C-Terminus zur Fehl-Lokalisation (Navaratnam et al. 2005). Über die STAS-Domäne im zytoplasmatisch lokalisierten C-Terminus interagiert Pres mit CFTR (Ko et al. 2004; Homma et al. 2010), Map1S (Bai et al. 2010) und Calmodulin (Keller et al. 2014). Auch die Wechselwirkung mit β V-Spektrin (Legendre et al. 2008) ist abhängig von der STAS-Domäne. Die genaue Sequenz des Pres-Clusterings innerhalb der TMD muss noch aufgeklärt werden. Zur Analyse bieten sich ortsgerichtete Mutagenesen und das Hefe-Zwei-Hybrid-System an. Durch die Klonierung weiterer Chimären mit geteilter TMD und kann der für das Clustering verantwortliche Bereich eingegrenzt und genauer lokalisiert werden. Da homogen verteiltes cPres nach den vorgelegten KoIP-Ergebnissen ebenfalls, wie auch das clusternde Orthologe aus Ratte, einen Protein-Komplex ausbildet, muss die Qualität des Clusterings von der Protein-Komplex-Formation unterschieden werden.

Die Verteilung von Pres ist nicht nur vom Pres-Protein selbst anhängig, sie wird weiterhin von den biophysikalischen Bedingungen der Membran bedingt. Bestimmend sind hierbei das zelluläre Cholesterolgehalt und die Temperatur: Aus der homogenen Verteilung von rPres nach der β MCD-Behandlung wird abgeleitet, dass die Pres-Membran-Domänen durch eine Cholesterol-Depletion aufgelöst werden und rPres in unkompartimentierte Membran-Bereiche transloziert. Folglich ist Cholesterol als ein wesentlicher Baustein für die Aufrechterhaltung der Pres-

spezifischen Membran-Domänen essentiell. Aus diesem Grund ist eine Lokalisation von Pres in *lipid rafts* oder *lipid-raft*-ähnlichen Membran-Domänen wahrscheinlich.

Mit der vorgelegten mikroskopischen Analyse können die Daten von Rajagopalan et al. (2007) bestätigt werden, die sowohl biochemisch als auch mikroskopisch zeigten, dass Cholesterol eine Schlüsselrolle für die Regulation der Verteilung von Pres in spezifischen Plasmamembran-Kompartimenten zukommt. Da Rajagopalan et al. (2007) darüber hinaus aufdeckten, dass die Pres-Homo-Oligomer-Bildung von Cholesterol abhängig ist und in der vorgelegten Arbeit herausgestellt werden konnte, dass auch die Erhaltung des heteromeren Pres-haltigen Protein-Komplexes cholesterol-abhängig erfolgt, so ist es möglich, dass die Pres-Akkumulation in den Membran-Domänen und die Pres-Oligomer-Bildung (zumindest des Ratten-Orthologen) miteinander verknüpft sind. Das Bindeglied könnte eine spezifische Wechselwirkung des clusternden Pres-Orthologen aus Ratte mit dem Membran-Cholesterol sein. Dabei wird erwartet, bleibt aber spekulativ, dass die Lokalisation in Membran-Domänen und eine mögliche Protein-Komplex-Bildung von zPres und anderen clusternder Orthologen vergleichbar abhängig von Cholesterol wie rPres sind.

Es ist bekannt, dass Cholesterol vielfältige Membran-Funktionen hat. Es moduliert sowohl die passiven Membran-Eigenschaften wie Viskosität, Elastizität und Steifheit (Needham & Nunn 1990) als auch die Ausbildung von Membran-Mikrodomänen (Barenholz 2002), wirkt auf die Biege-Eigenschaften der Membran und erhöht den Widerstand gegenüber lateraler Flächenerweiterung (Song & Waugh 1993). Darüber hinaus sind Wirkungen von Cholesterol-Molekülen am Pres-Protein selbst möglich, z.B. auf die während der Elektromotilität stattfindenden Konformationsänderungen und die assoziierten Ladungsverschiebungen. Dementsprechend wurde bereits gezeigt, dass Cholesterol eine regulatorische Rolle für die ÄHZ spielt: Nicht nur die elektrische Signatur der Elektromotilität von Pres, die NLC (Rajagopalan et al. 2007), sondern auch die Erhaltung der Integrität der ÄHZ (Crumling et al. 2012) werden durch Cholesterol beeinflusst. Eine Auflösung der Pres-Cluster könnte die von Rajagopalan et al. (2007) beschriebene verminderte Motor-Funktion von Pres in HEK- wie auch in ÄHZ-Zellen nach sich ziehen, denn es ist anzunehmen, dass Pres-Proteine als homogen verteilte (Einzel)-Moleküle im heterologen System ihre Funktion nicht im gleichen Maß ausüben können wie als cholesterol-assoziierte Pres-Akkumulation in Membran-Domänen. Mit einer Anreicherung von Pres-Molekülen in Membran-Domänen und der potentiell damit induzierten Oligomerisierung könnte die funktionelle Aktivität von Pres erleichtert werden, da in Membran-Domänen auf möglichst kleiner Fläche eine hohe Anzahl von Pres-Molekülen und anderen funktionell wichtigen Proteinen untergebracht werden können. Ob die Beeinträchtigung der Pres-Funktion nach der Cholesterol-Depletion (Rajagopalan et al. 2007) ein direkter Effekt des Fehlens von Cholesterol oder

eine Folge ist, die aus der Auflösung der Membran-Domänen resultiert, z.B. durch eine gestörte Rekrutierung von Pres-Unterstützer-Proteinen, bleibt unbeantwortet.

Die hier gezeigte Pres-Lokalisation in Membran-Domänen als mikroskopisch sichtbare Cluster im heterologen Expressionssystem könnte der inhomogenen Pres-Verteilung in den cholesterolreichen, noch unreifen ÄHZ entsprechen (Winter et al. 2006; Rajagopalan et al. 2007). Die gleichmäßige Pres-Verteilung in HEK-Zellen nach Cholesterol-Depletion hingegen könnte analog zur Verteilung in reifen ÄHZ sein. Da mit der Reifung der ÄHZ das Cholesterol-Level abnimmt (Nguyen & Brownell 1998; Oghalai et al. 1998; Rajagopalan et al. 2007), sich zeitgleich die Pres-Lokalisation in der lateralen Membran von punktförmig zu gleichmäßig verändert (Winter et al. 2006) und die NLC Werte adulter Zellen aufweist (Oliver & Fakler 1999; Belyantseva et al. 2000), werden vermutlich die Pres-Lokalisation und die Pres-Funktion in ÄHZ gemeinsam von Cholesterol moduliert. Genaue Mengenangaben von membran-ständigem Cholesterol in juvenilen und adulten Säuger-Haarzellen liegen für einen Vergleich mit Zellkulturlinien aktuell nicht vor, aber grundsätzlich sind geringe Cholesterol-Level wie sie in den ÄHZ vorliegen für Säugerzellen ungewöhnlich.

Während Pres bei 37° C überwiegend in unkompartimentierten Plasmamembran-Bereichen lokalisierte, bevorzugte es bei niedrigeren Temperaturen (RT) Membran-Domänen gegenüber den unkompartimentierten Strukturen. Damit wird gezeigt, dass die Anzahl der gebildeten Plasmamembran-Domänen und die Pres-Verteilung durch die Temperatur verändert werden können. In der Temperatur-Studie hatte eine Inkubation bei 37° C einen vergleichbaren Effekt auf die Pres-Lokalisation wie eine Cholesterol-Depletion. Die Verteilung bei RT war übereinstimmend mit der Pres-Verteilung unter nicht-manipulierten Cholesterol-Bedingungen. Da die Temperatur und die Lipid-Zusammensetzung die Fluidität biologischer Membranen beeinflussen (Aloia & Boggs 1985; Berg et al. 2013), dürfen Modifikationen der Temperatur nicht isoliert von der Lipid-Zusammensetzung betrachtet werden. Ein hoher Anteil gesättigter Fettsäuren mit ihren Doppelbindungen erhöht die Fluidität der Plasmamembran, Cholesterol hingegen kann den Fest-Flüssig-Übergang in beide Richtungen lenken. Unter mäßigen Temperaturen (> RT) senkt es die Membran-Fluidität, da Cholesterol aufgrund seines starren Steroid-Ringsystems die Bewegung der Phospholipide einschränkt. Hingegen wirkt es bei Kälte (< RT) der gel-artigen Membran-Verfestigung entgegen, da Cholesterol nun die hochgeordnete Packung der Fettsäureketten stört (Aloia & Boggs 1985; Ohvo-Rekilä 2002; Berg et al. 2013).

Die in dieser Arbeit applizierten Temperaturen variieren einerseits die Fluidität der umgebenden Membranen und modifizieren vermutlich sämtliche chemische Bindungen, z.B. mögliche Interaktionen von Pres mit eingelagerten Phospholipiden, Proteinen und Cholesterol. Veränderte Wechselwirkungen könnten sekundär eine beeinträchtigte funktionelle Aktivität von Pres nach

sich ziehen. Andererseits könnten die Temperaturveränderungen auch direkt auf die Proteinstruktur des Pres-Moleküls wirken und so dessen Funktion beeinflussen. So schilderten Santos-Sacchi & Huang (1998) eine Auswirkung der Temperatur auf die NLC in ÄHZ: V_{pkc} der NLC verschob sich mit sinkenden Temperaturen in Richtung hyperpolarisierender Potenziale. Eine Rechtsverschiebung in die depolarisierende Richtung wurde durch eine Erhöhung der Temperatur bewirkt (Santos-Sacchi et al. 2006).

Die vorgelegten Analysen zeigen, dass Cholesterol- und Temperatur-Modifikationen die Membran-Struktur beeinflussen können und sich über die Anzahl der vorhandenen Membran-Domänen die Lokalisation von Pres verändert. Da Veränderungen der Lokalisation die Aktivität von Pres modulieren (Santos-Sacchi et al. 2006; Rajagopalan et al. 2007), stützen diese Daten somit die These, dass die Membran-Organisation von Pres eng mit der Funktion von Pres verknüpft ist.

Die temperatur-induzierte Pres-Translokation (auch nach längerer Inkubation bei 37° C von bis zu 2 h) von den Membran-Domänen in unkompartimentierte Membran-Bereiche war nicht vollständig reversibel, denn Pres besetzte nach Temperatur-Erhöhung von 22° auf 37°C eine geringere Anzahl von Plasmamembran-Domänen als zu Beginn des Experiments bei 37° C. Wahrscheinlich werden die Pres-Moleküle partiell in kompartimentierten Membran-Bereichen zurückgehalten. Als ursächliche Faktoren für die unvollständige Reversibilität konnten pH-Verschiebungen, das Fehlen von Wachstumsfaktoren im Medium und Veränderungen der Osmolarität durch Kontroll-Experimente ausgeschlossen werden. Eine schwer einschätzbare Komponente bringt die Konfokal-Mikroskopie mit sich. Die durch das Laser-Licht in lebenden Zellen ausgelösten photo-thermischen und photo-chemischen Prozesse sind Gegenstand zahlreicher wissenschaftlicher Forschungsprojekte und Spekulationen und dabei längst nicht eindeutig geklärt. Es ist gewiss, dass Laser-Licht Membran-Veränderungen, z.B. Membran-Lipid-Peroxidationen, bewirken kann. Kujawa et al. (2014) zeigten, dass bereits unter gering energetischer Laser-Strahlung sowohl enzymatische wie auch anti-oxidative Aktivitäten von zellulären Komponenten verändert werden können. Das Laser-Licht induziert nicht das Cluster-Verhalten von Pres-GFP, da die Fluoreszenz der Pres-Cluster auch mit Quecksilberdampf-Lampen sichtbar gemacht werden kann. Dass die einfallende Laser-Strahlung aber beispielsweise durch zelluläre Veränderungen an der nur unvollständigen Umkehrbarkeit des Temperatureffektes beteiligt war, kann nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden.

Eine Quantifikation des als Cluster lokalisierten Pres-Anteils im Vergleich mit dem homogen verteilten Part sowie die Berechnung der Clusterfläche können zukünftig helfen, ein besseres Verständnis für die Lokalisation von Pres in seinen Mikrodomänen, deren Stabilität und Größe bei verschiedenen Temperatur-Bedingungen und eventuell anderen Manipulationen zu entwi-

ckeln. So könnte eine Vergrößerung der Pres-Cluster durch die von Goswami et al. (2008) beschriebene Zusammenlagerung von mehreren *lipid rafts* oder *lipid-raft*-artigen Membran-Domänen bedingt werden.

Es bleibt ungewiss, ob Pres im heterologen Expressionssystem initial als Clustern in Membran-Domänen lokalisiert ist oder ob die wenigen beobachteten Cluster bei 37° C durch Umwelteinflüsse (z.B. minimale Temperaturschwankungen oder Licht) bereits induziert wurden.

Als regulatorischer Faktor für die Lokalisation von Pres und seiner funktionellen Aktivität in den ÄHZ scheidet die Temperatur aber aus, da die Temperatur im Säugetier-Innenohr konstant ist. Die physiologische Relevanz dieser temperatur-vermittelten Umverteilung für die ÄHZ bleibt unbeantwortet.

Cav-1 wurde aufgrund seines ähnlichen Verteilungsmusters (Mundy et al. 2002) und seiner Cholesterol-Abhängigkeit (Schnitzer 1994; Hailstones et al. 1998; Thiele et al. 2000) als Pres-assoziiertes Kandidaten-Protein auf eine Ko-Lokalisation mit Pres analysiert. Die hier gezeigten mikroskopischen Daten, gestützt durch die biochemische Untersuchungen, liefern die Erkenntnis, dass heterolog exprimiertes Pres und Cav-1 in spezifischen Membran-Kompartimenten gemeinsam lokalisieren und dort einen Protein-Komplex ausbilden können. Da Cav-1 als Hauptstruktur-Element der Caveolae-Kompartimente in der Plasmamembran von Säugerzellen agiert (Rothberg et al. 1992; Murata et al. 1995; Parton & Simons 2007), kann Pres vermutlich in Caveolae-Mikrodomänen oder in andere Cav-assoziierte Membran-Domänen lokalisieren.

In Caveolae werden u.a. Signalmoleküle aufkonzentriert, organisiert und deren Aktivierung reguliert (Lisanti et al. 1994; Cheng & Nichols 2015). Rajagopalan et al. (2010) nahmen aufgrund der Ko-Lokalisation von Pres mit Clathrin-Vesikeln und Cav-1-Membran-Domänen an, dass das endozytotische *cycling* von Pres-Molekülen über clathrin- und über Cav-abhängige Mechanismen erfolgt. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete zunehmende Ko-Lokalisation aller Pres-Orthologen mit Cav-1 über die Zeit nach der Transfektion ist mit dem vorgeschlagenen Konzept der cav-abhängigen *cycling*-Prozesse der Pres-Moleküle konsistent. So könnte auch die beschriebene temperatur-induzierte Cluster-Bildung bei 22° C als ursächlich für eine Verteilung der Pres-Moleküle in Caveolae-Mikrodomänen angenommen werden, denn eine Temperatur-Erniedrigung auf 22° C blockiert das endozytotische *cycling* von Proteinen weitestgehend, wodurch die Pres-Moleküle verstärkt in Caveolae-Membran-Domänen akkumulieren können und folglich mikroskopisch als Cluster erscheinen.

Die Beobachtung, dass initial homogen verteiltes cPres in Gegenwart von heterolog exprimiertem Cav-1 ebenfalls eine voranschreitende punkt-förmige Verteilung aufweist, lässt die Vermutung zu, dass große Cav-1-Mengen eine Translokation von Pres-Molekülen (unabhängig von

den TMD-Eigenschaften) in *cav-1*-assoziierte Kompartimente innerhalb der Plasmamembran induzieren können.

Da auch gezeigt wurde, dass Cav-1 weder für das Membran-*targeting* noch für die Bildung der Pres-Membran-Domänen im heterologen Expressionssystem essentiell ist, ist eine Pres-Anreicherung in anderen, vermutlich caveolae-artigen, aber nicht *cav*-assoziierten Mikrodomänen ebenfalls möglich. Aufgrund der voranschreitenden Ko-Lokalisation von Pres mit Cav-1 ist die caveolae-assoziierte Domäne (bei Expression von Cav) aber wohl eine favorisierte.

Caveolae werden als ein Subtyp der *lipid raft*-Domänen angesehen (Patel & Insel 2009). Cav-freie *lipid raft*-Domänen weisen neben einem hohen Cholesterol-Gehalt weitere ähnliche biochemische und molekulare Charakteristika wie die Caveolae auf (Patel & Insel 2009), so dass eine Lokalisation von Pres in Abwesenheit von Cav-1 in *lipid rafts* oder *lipid rafts*-ähnlichen Membran-Kompartimenten wahrscheinlich ist.

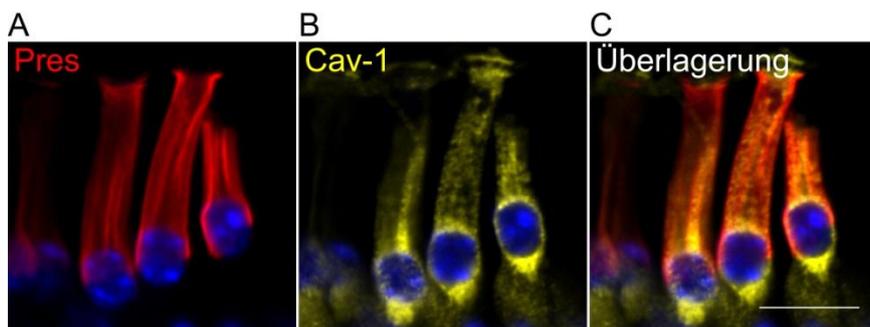


Abb. 40: Immunhistochemische Doppelfärbung von ÄHZ adulter Wildtyp-Mäuse auf Pres und Cav-1: Pres (rot) lokalisiert homogen entlang der lateralen Membran. Cav-1 (gelb) ist punktiert verteilt mit einer Akkumulation um den Kern und am basalen Pol der ÄHZ. Der Zellkern der ÄHZ wurde mit DAPI (blau) dargestellt (Antikörper: 1. α Pres N-20, 1:800, 2. Alexa Fluor 568 *donkey* α *goat* IgG, 1:200; 1. α Cav ab2910, 2. 1:400; Alexa Fluor 488 *goat* α *rabbit* IgG, 1:200; DAPI: 1:5000). ÄHZ-Maus P40; CLSM: Marlen Dierich; Maßstab-Skala: 10 μ m

Immunhistochemische Färbungen von ÄHZ zeigen, dass Cav-1 bei Mäusen endogen exprimiert wird (Abb. 40B). Cav-1 verteilte sich ungleichmäßig in der Zelle. Die punktierte Cav-Verteilung im lateralen Teil der ÄHZ deckte sich in der z-Achse nur geringfügig mit der homogenen Membran-Lokalisation von Pres (C). Besonders auffallend war eine peri- und subnukleare Akkumulation von Cav-1, die vermuten lässt, dass Cav-1 nicht oder nur minimal in die ÄHZ-Membran lokalisierte und deswegen keine Caveolae ausgebildet werden oder die Caveolae-Dichte in den ÄHZ gering ist. Entsprechend ist bereits bekannt, dass einige Säugerzellen Cav exprimieren, aber keine Caveolae ausbilden (Sowa et al. 2001; Head et al. 2014). Da die Lokalisation von endogenem Pres mit Cav-1 nicht eindeutig räumlich korrelierte (C), soll zukünftig mittels immunhistochemischer Färbungen in *Cav-1-knock out*-Mäusen überprüft werden, ob das *targeting* von Pres in der lateralen Membran der ÄHZ von Cav-1 abhängig ist. Eine Abhängig-

keit wird nicht erwartet, weil Cav-1 für die Pres-Verteilung im heterologen Expressionssystemen nicht essentiell war.

Angesichts der Daten von Duncan et al. (2009), die bei Cav-1-*knock out*-Mäusen eine Beeinträchtigung des Hörvermögens mit signifikantem Verlust von basalen ÄHZ, nicht aber IHZ fanden, ist eine Rolle von Cav-1 für die Funktion der ÄHZ bereits belegt. Somit ist die Erhaltung der nativen Pres-Domäne wahrscheinlich nicht von Cav-1 abhängig, Cav-1 aber für die Elektromotilität der ÄHZ essentiell. Ob die Pres-Domäne der ÄHZ frei von Cav-1 ist, kann mit der immunhistochemische Färbung (Abb. 40) nicht zweifelsfrei gezeigt werden, ist aber wahrscheinlich. Hoch auflösende GSdim-Lokalisationsaufnahmen der nativen Pres-Domäne mit Cav-1 und KoIPs mit endogenem Material könnten diese Fragestellung zukünftig klären.

Da Pres bevorzugt in *lipid raft*-Subtyp-Domänen lokalisiert, die vergleichbare Bedingungen wie die Caveolae auszubilden, können die bereits gut erforschten Caveolae genutzt werden, um auf die grundlegenden biophysikalischen Eigenschaften der Pres-Domäne zu schließen. Zusammenfassend stützen die vorliegenden Daten des heterologen und des nativen Systems die Vermutung, dass die Pres-Membran-Domäne in ÄHZ bei nicht-caveolärer Cav-Expression *lipid raft*-artig ist.

Für die Verteilung von Pres als Cluster in den Membran-Domänen des heterologen Expressionssystems ist dem Zytoskelett eine wesentliche Bedeutung beizumessen. Aus den Ko-Lokalisationsdaten von Pres und Aktin und insbesondere den LatA-Experimenten wird abgeleitet, dass die Erhaltung der Pres-Domänen speziell vom Aktin-Netzwerk abhängig ist. Die biochemischen *pull-down*-Ergebnisse zeigten zudem, dass Aktin und Pres einen Protein-Komplex ausbilden, d.h., beide Proteine interagieren wahrscheinlich miteinander. Eine direkte Interaktion in der nativen Pres-Domäne wird aber aufgrund der räumlichen Distanz von 20 bis 40 nm zwischen dem CL und der Plasmamembran in der lateralen ÄHZ-Wand eher ausgeschlossen (Saito 1983; Holley et al. 1992; Brownell & Popel 1998). Das in ÄHZ exprimierte Aktin-Spektrin-Bindeprotein band 4.1 (Legendre et al. 2008) ist an der Ausbildung von molekularen Komplexen beteiligt, die Plasmamembran-Proteine mit dem Zytoskelett verbinden (Marfatia et al. 1995). Band 4.1 könnte die Stabilisation der Aktin-Spektrin-Bindung im CL vermitteln und als *linker*-Protein in die Verankerung von Prestin-Molekülen der Plasmamembran mit dem unterliegenden Aktin-Zytoskelett involviert sein.

Die punktuellen Aktin-Aggregate, mit denen die Pres-Cluster ko-lokalisieren, sind vermutlich Orte des transienten und lokalen Um- und Zusammenbaus des kortikalen F-Aktin-Zytoskeletts. Kontinuierlicher Aktin-Umbau ist offenbar für die Aufrechterhaltung und die Organisation der Membran-Domäne, in die Pres im heterologen System lokalisiert, ausschlaggebend. Daten von Jensen-Smith & Hallworth (2007); Legendre et al. (2008); He et al. (2010) und Han et al. (2015)

aus ÄHZ sind mit dieser Schlussfolgerung übereinstimmend. Ob Pres-Moleküle indirekt Aktin-Filamente zu den Domänen rekrutieren oder ob unter der Membran liegende (spezifische) Aktin-Assemblierungen lokal die Formation der Membran-Domänen induzieren, bleibt unbeantwortet. Aufgrund der vorgelegten Daten kann aber angenommen werden, dass Aktin eine essentielle Struktur-Komponente der Pres-Domäne ist.

Messungen der NLC-Parameter von Pres nach LatA-Behandlung waren in Vergleich mit unbehandelten Zellen nicht signifikant verändert. Da die LatA-vermittelte Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts die Pres-Domänen auflöste und bereits gezeigt wurde, dass eine Pres-Umverteilung in unkompartimentierte Membran-Bereiche die Funktion verminderte (Santos-Sacchi et al. 2006; Rajagopalan et al. 2007), weist dies auf einen Einfluss des Aktins auf die Elektromotilität hin, der unabhängig von Pres erzeugt wird. Dementsprechend erklärten auch Matsumoto et al. (2010) ihre Beobachtung, dass durch eine *signalling*-vermittelte Hemmung der Aktin-Depolymerisation die Längenänderung der ÄHZ bei unveränderter NLC beeinträchtigt war. Somit ist das äußerst komplexe und spezialisierte CL wesentlich, um in den ÄHZ eine gerichtete Längenänderung zu generieren (Holley et al. 1992).

Darüber hinaus berichteten Matsumoto et al. (2010), dass die Depolymerisation des Aktin-Zytoskeletts mit LatA (über die *patch*-Pipette oder als Perfusions-Lösung appliziert) die sofortige Elongation, basale Aufballonierung und schließlich den Tod der ÄHZ nach sich zieht, bevor elektrophysiologische Messungen möglich sind. Im Widerspruch dazu stehen die Daten von Yu & Zhao (2008), die aufzeigten, dass die NLC nach intrazellulärer Applikation von LatA oder Diamid (zur spezifischen Verhinderung der Kreuzvernetzung von Aktin und Spektrin) unverändert bleibt. Trotz dieser gegensätzlichen Ergebnisse kommt F-Aktin in Übereinstimmung mit den vorgelegten *in vitro*-Ergebnissen als kritischer Bestandteil des CL der ÄHZ in Betracht, welcher einerseits an der Rekrutierung und dem Erhalt von Pres entlang der lateralen Wand beteiligt ist und andererseits für die Erhaltung von Form und Funktion der ÄHZ essentiell ist.

Es wurde bereits von Kalinec et al. (2000) und Zhang et al. (2003) gezeigt, dass Zytoskelett-Umstrukturierungen eine Rolle für die Regulation der Elektromotilität spielen. In Antwort auf Schall-Stimuli wird speziell das F-Aktin kontinuierlich umgebaut (Han et al. 2015), aber auch die Expression von Aktin und Pres dynamisch reguliert (Lamas et al. 2014). Die beiden Proteine Aktin und Pres sind elementare Regulatoren der Steifheit, also der mechanischen Eigenschaften der ÄHZ (Jensen-Smith & Hallworth 2007). Zusätzlich kann das efferente Innervationssystem die Steifheit der ÄHZ modifizieren, indem es vermutlich Aktin-Umstrukturierungen des CL vermittelt (He & Dallos 1999; He & Dallos 2000; Kong et al. 2006; Frolenkov 2006). Da Pres einerseits für die Rekrutierung und die Instandhaltung des spezialisierten Aktin-Zytoskeletts in den ÄHZ ausschlaggebend ist (He et al. 2010) und andererseits das Aktin-Netzwerk eine basale

Funktion für die Aufrechterhaltung von Pres als Cluster in den Membran-Domänen hat, kann angenommen werden, dass zwischen Aktin und Pres eine *feedback*-Regulation besteht, die die beidseitige Lokalisation steuert und vermutlich auch die Funktion von Pres als Motorprotein der ÄHZ unterstützt.

Bai et al. (2010) zeigten eine direkte Interaktion von Pres mit Map1S im heterologen System. Map1S erhöhte auch die Anzahl der Pres-Moleküle an der Zelloberfläche, einen mikrotubuli-vermittelten Transport schlossen Bai et al. (2010) dafür aus. Dies steht im Einklang mit den durchgeführten Kolchizin-Experimenten an Pres-transfizierten Zellen, da die Cluster gegenüber einem Mikrotubuli-Abbau resistent waren und Pres somit unabhängig von dieser Zytoskelett-Struktur lokalisierte. Die in dieser Arbeit gezeigte Ko-Lokalisation von Pres und Map1S ist ebenfalls mit den Daten von Bai et al. (2010) konsistent. Da die leichte Kette von Map1S mit Aktin interagiert (Orbán-Németh et al. 2005; Mohan & John 2015), stehen die drei Proteine Aktin, Map1S und Pres in einem engen räumlichen Verhältnis. Somit kommt in Gegenwart von Map1S ein gesteigerter Transport von Pres-Proteinen unter Aktin-Filament-Vermittlung durchaus in Frage, um die von Bai et al. (2010) beschriebene Zunahme von Pres-Molekülen an die Membran zu erklären.

Die hier vorgelegten Ko-Lokalisationsaufnahmen von Pres und Map1S zeigen eine Aggregatbildung von Map1S-Proteinen, die bei endogenem Map1S-Level nicht nachweisbar war. Diese Aggregate deckten sich örtlich mit den Pres-Clustern. Aus diesen Befunden lässt sich ableiten, dass Map1S-Proteine spezifisch in die Nähe der Pres-Cluster, d.h. in die Membran-Domänen oder in membran-nahe Bereiche, rekrutiert werden. Dies ist mit Viola & Gupta (2007), Goudenege et al. (2007), Simons & Gerl (2010) und Whitehead et al. (2012) übereinstimmend, die zeigten, dass verschiedene Zytoskelett-Komponenten, u.a. Aktin, in Membran-*lipid rafts* lokalisieren können.

Da einerseits Pres Map1S bindet (Bai et al. 2010) und andererseits hier gezeigt werden konnte, dass Pres auch mit Aktin (zumindest indirekt) interagiert, könnte Map1S eine Wechselwirkung zwischen Pres und Aktin vermitteln, indem es beide Partnern bindet und diesen putativen Komplex aus Aktin, Pres und Map1S stabilisiert. Map1S könnte somit als *linker*-Protein - möglicherweise gemeinsam mit band 4.1 - die Verankerung von Pres am Aktin-Zytoskelett vermitteln und folglich für die Pres-Lokalisation in den Mikrodomänen der Membran ausschlaggebend sein. Diese Vermutung wird durch Interaktionsdaten von Head et al. (2006) und Suzuki et al. (2011) gestützt, die zeigten, dass Zytoskelett-Proteine mit *lipid rafts* wechselwirken und an der Assemblierung der *lipid raft*-Domänen wesentlich beteiligt sind.

Bei endogenem Expressions-Level von Map1S wurden die Pres-Cluster durch die Depolymerisation des Aktins mit LatA aufgelöst. Die Gegenwart großer (überexprimierter) Mengen von

Map1S bewirkte eine Stabilisierung der Pres-Domänen mit Unabhängigkeit vom Aktin- und Tubulin-Netzwerk. Hohe endogene Expressionsmengen könnten in den ÄHZ ebenfalls einen stabilisierenden Effekt auf die Pres-Domänen bedingen; entsprechende quantitative Daten zur Map1S-Protein-Menge in ÄHZ und Säugerzelllinien liegen aktuell nicht vor. Da endogen i.d.R. geringere Protein-Mengen als im Überexpressionsmodell vorliegen, ist dieser Stabilisierungseffekt möglicherweise auch nur ein *in vitro*-Artefakt.

Zusammenfassend sind Zytoskelett-Proteine wesentlich an der Organisation der Lokalisation der Pres-Membran-Domänen im heterologen Expressionssystem beteiligt, dementsprechend vermutlich auch an der Restriktion von Pres entlang der lateralen Plasmamembran der ÄHZ.

Die vorgelegten biochemischen KoIP-Daten zeigen, dass Pres einen Protein-Komplex mit β -Aktin und Cav-1 ausbildet und diese Proteine zumindest indirekt miteinander interagieren. Da bereits bekannt ist, dass Pres mit Map1S interagiert (Bai et al. 2010) und Map1S Aktin bindet (Orbán-Németh et al. 2005), wird abgeleitet, dass bei heterologer Expression in die Membran-Domäne mit Pres neben Cav-1 die beiden zytoskelett-assoziierten Proteine Map1S und Aktin rekrutiert werden können.

Für Cav-assoziierte Membran-Domänen wurden mittels Ultrastruktur-Analysen und biochemischen Assays bereits enge Verknüpfungen mit dem Aktin-Netzwerk gezeigt (Lisanti et al. 1994; Stahlhut & van Deurs 2000; Head et al. 2014; Lim et al. 2014; Echarri & Del Pozo 2015). So lokalisieren neben Aktin und Map1S noch weitere Zytoskelett-Komponenten wie Tubulin, Flamin, Tau und Inulin in Cav-Membran-Domänen (Stahlhut & van Deurs 2000; Goudenege et al. 2007; Whitehead et al. 2012), eine direkte Interaktion von Cav-1 mit Aktin bzw. die genaue molekulare Basis einer möglichen Wechselwirkung der Cav-1-assoziierten Membran-Domänen mit Aktin sind noch ungewiss. Da das Aktin-Zytoskelett wesentlich in die räumliche Organisation der Cav-1-assoziierten Membran-Domänen involviert (Stahlhut & van Deurs 2000) und für die Caveolae-Funktion essentiell ist (Parton et al. 1994; Fujimoto et al. 1995; Head et al. 2014), hat die hier gezeigte, vermutlich indirekte Interaktion von Cav-1 mit Aktin mit hoher Wahrscheinlichkeit eine physiologische Relevanz. Eine Assoziation von Cav-1 mit weiteren Proteinen ist wahrscheinlich, weil Cav-1 über seine hydrophobe *scaffolding*-Domäne verschiedene Moleküle in die Caveolae rekrutieren kann (Li et al. 1996; Cheng & Nichols 2015).

Gesichert ist bisher, dass Pres, Aktin, Cav-1 und Map1S in ÄHZ exprimiert werden (Holley & Ashmore 1990; Mahendrasingam et al. 1998; Winter et al. 2006; Liu, 2007; Bai et al. 2010; Abb. 40). Da aber weder aussagekräftige hochauflösende Ko-Lokalisationsdaten noch biochemische Analysen der ÄHZ vorliegen, ist ein endogener Protein-Komplex spekulativ. Wie im heterologen Expressionssystem könnten Cav-1, Aktin und Map1S bereits selbst Schlüsselproteine für die Organisation und Restriktion von Pres in der lateralen ÄHZ-Membran sein oder auch

weitere Proteine in den putativen Komplex der Pres-Domäne rekrutieren. Außerdem sind sie potentiell regulierende Unterstützer-Proteine für die funktionelle Aktivität von Pres.

KoIPs ermöglichen es, Proteine in ihrem nativen (post-translational-modifizierten) Zustand hinsichtlich einer Interaktion unter annähernd physiologischen Bedingungen zu untersuchen. Allerdings ist es grundsätzlich möglich, dass Ergebnisse durch das Auflösen und Durchmischen der intrazellulären Kompartimente während der Zellyse verfälscht werden, wobei Proteine in Kontakt geraten können, die nicht im gleichen zellulären Kompartiment auftreten. Durch die Wiederholungen der Ansätze unter veränderten Bedingungen (verschiedene Lysis-Puffer, als reverse KoIP) ist dies teilweise zu entkräften, zumal nur mit der Membran-Fraktion gearbeitet wurde. Der hier gewählten experimentellen Prozedur ist nachteilig anzurechnen, dass die Zellen transfiziert werden mussten, also nicht mit nativen Proteinkonzentrationen gearbeitet wurde. Endogene Proteinmengen (außer Aktin) reichten trotz Anreicherung aber nicht aus, um eindeutige und reproduzierbare Resultate zu erhalten. Die verwendete Technik gestattet es, auf eine besonders robuste und stabile Wechselbeziehungen der gefundenen Proteine zuzuschließen, wenn auch keine Aussage getroffen werden kann, ob es sich um eine direkte Interaktion von Pres, Cav-1 und Aktin handelt. Diese Interaktionsdaten können zukünftig mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System, dem Förster-Resonanzenergietransfer (FRET), einem *Proximity Ligation Assay (in-situ in ÄHZ)* oder durch einen *knock out* bzw. *knock down* der Einzelproteine in einer KoIP erzielt werden.

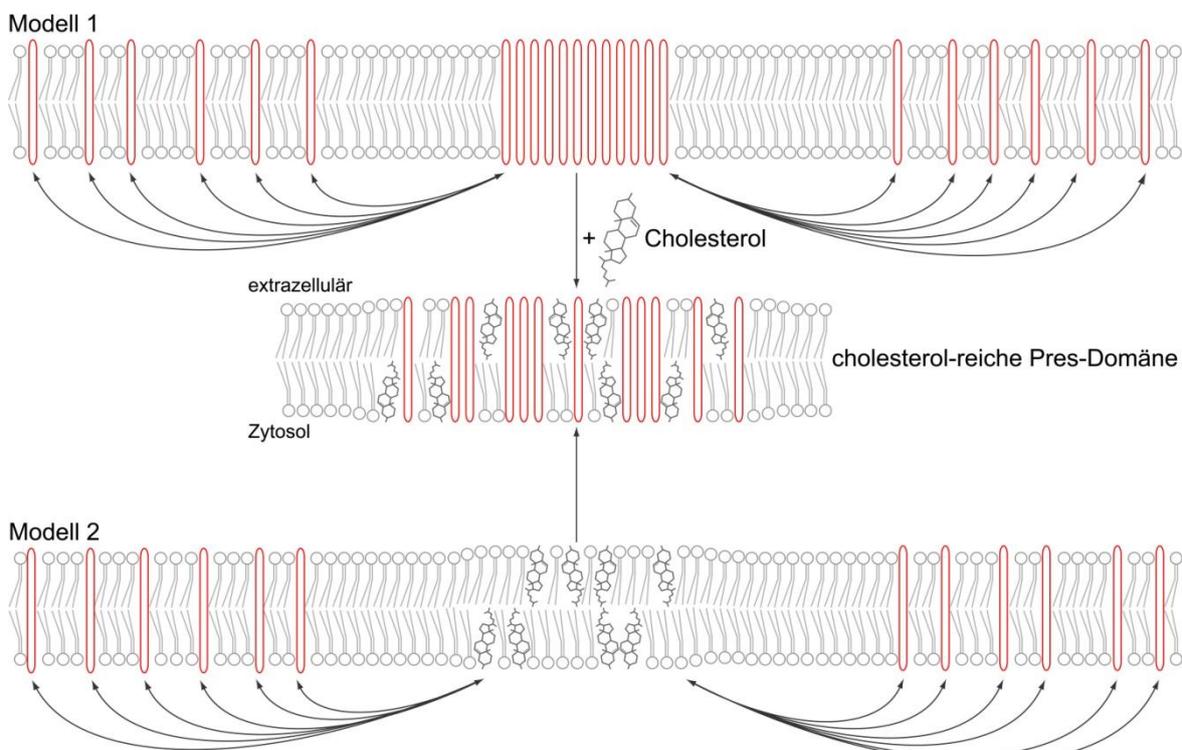


Abb. 41: Zwei mögliche Modelle zur Bildung von Pres-Plasmamembran-Domänen: Pres kann reversibel von unkompartimentierten Membran-Bereichen in cholesterol-reiche Domänen lokalisieren (schematische Darstellung von Pres in rot).

Aus der vorliegenden Lokalisationsanalyse von Pres können zwei Modelle zur Ausbildung der Pres-Mikrodomänen abgeleitet werden (Abb. 41). Die resultierenden *lipid raft*-artigen Domänen mit Pres können omega-förmig wie Caveolae oder auch planar sein. Die Ausbildung der Domänen ist reversibel. Modell 1 zufolge akkumulieren die Pres-Moleküle in Membran-Bereichen und assemblieren dort zu den Protein-Clustern. Pres organisiert somit seine eigene Domäne innerhalb der Plasmamembran, denn die Pres-Moleküle determinieren die biophysikalischen Bedingungen der Domäne selbst. Anschließend werden in diese Domäne sowohl Cholesterol wie auch Proteine rekrutiert. Nach Modell 2 sind in einer prä-formierten, cholesterol-reichen Membran-Domäne die biophysikalischen Bedingungen durch die bereits vorhandenen Strukturen weitestgehend vorgegeben. Dorthinein akkumulieren Pres-Moleküle zum mikroskopisch sichtbaren Cluster.

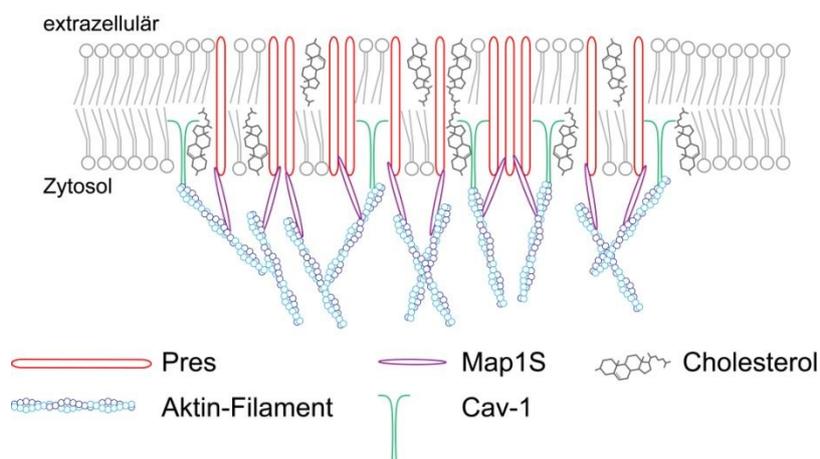


Abb. 42: Schema einer Pres-Plasmamembran-Domäne und der identifizierten Interaktionspartner im heterologen Expressionssystem: Da die Pres-Domäne in ÄHZ vermutlich Cav-1-frei ist, ist eine direkte Pres-Cav-1-Interaktion ungesichert. Aktin ist mit der Pres-Domäne assoziiert, aber aufgrund des räumlichen Abstandes von Pres zum CL der ÄHZ ist eine direkte Interaktion unwahrscheinlich.

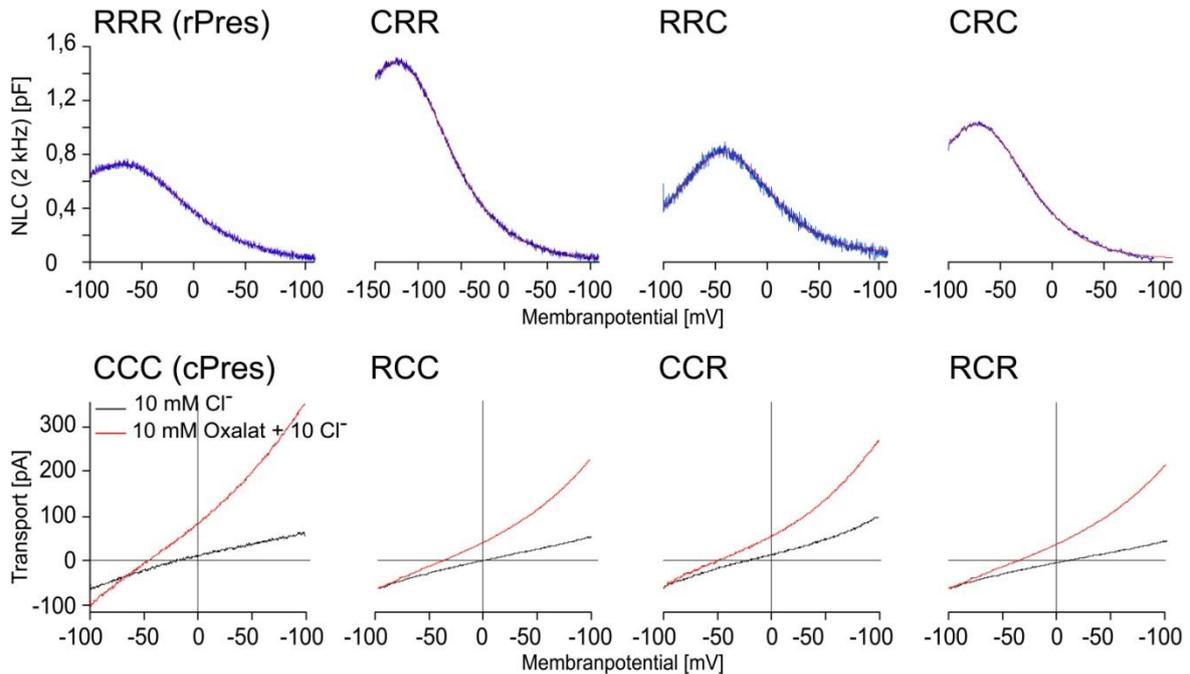
Zusammenfassend kann die subzelluläre Pres-Lokalisation mit Hilfe der hier gewonnenen Daten wie folgt beschrieben werden (Abb. 42): Pres-Moleküle können in Plasmamembran-Domänen akkumulieren, aber auch in unkompartimentierte Membran-Bereiche lokalisieren. Die Verteilung wird durch intrinsische Eigenschaften der TMD von Pres vermittelt. Darüber hinaus ist die Anzahl der gebildeten Membran-Domänen von der biophysikalischen Beschaffenheit der Plasmamembran, insbesondere vom zellulären Cholesterol-Gehalt und der Temperatur abhängig. Spezifische, *lipid-raft*-assoziierte Proteine bestimmen zusätzlich die Pres-Verteilung: Hohe Cav-1-Level induzieren und verstärken die Lokalisation in Membran-Domänen. Pres und Cav-1 können in die gleichen Membran-Domänen lokalisieren, aber Cav-1 ist für die Membran-Verteilung und die Bildung der Pres-Domänen nicht essentiell. Die Erhaltung der Membran-Domänen wird entscheidend von Aktin beeinflusst. Große Mengen Map1S können die Domänen stabilisieren und sie unabhängig vom Aktin-Zytoskelett machen. Die Zytoskelett-Proteine

Aktin und Map1S lokalisieren in die Pres-Domänen. Im heterologen Expressionssystem bildet Pres dort mit Cav, Aktin und Map1S cholesterol-abhängig einen Multi-Protein-Komplex aus.

Die endogene Pres-Domäne der ÄHZ enthält wahrscheinlich trotz Cav-Expression kein Cav-1. Aufgrund der cholesterol- und zytoskelett-abhängigen Pres-Akkumulation in Membran-Domänen bei heterologer Expression, ist die Pres-Domäne entlang der lateralen Membran der ÄHZ vermutlich ebenfalls *lipid raft*-artig strukturiert. Cholesterol-reiche *lipid raft*-Mikrodomänen können somit als Modell-Domäne genutzt werden, um auf weitere biophysikalische Bedingungen der nativen Pres-Domäne zu schließen.

5 ANHANG

5.1 Anhang-Abbildung



Anhang-Abb. A: Repräsentative elektrophysiologische Messungen der rPres-cPres-Chimären: NLC-Messung der rPres-TMD-Chimären (CRR n=3, RRC=3, CRC n=5 Zellen; 2 kHz, extrazellulär: 160 Cl⁻); Elektrogener Transport divalenter Anionen der cPres-TMD-Chimären (RCC n=2, CCR n=4, RCR n=4 Zellen; hier für Oxalat gezeigt; extrazellulär: 10 mM Cl⁻ + 10 mM Na₂Oxalat). *patch clamp*; CHOs

Diese elektrophysiologischen Messungen der NLC und des Transports der Pres-Chimären wurden freundlicherweise von Dmitri Gorbunov, AG Neurophysiologie, Institut für Physiologie, Universität Marburg durchgeführt.

5.2 Verzeichnisse

5.2.1 Abbildungen

Abb. 1: Schematische Darstellung der peripheren Teilprozesse des Hörvorgangs.....	2
Abb. 2: Das Corti-Organ liegt auf der in der Kochlea aufgespannten Basilmembran (verändert nach Ashmore 2008).....	4
Abb. 3: Der Membran-Aufbau der lateralen Wand der ÄHZ (verändert nach Gliko et al. 2009).....	9
Abb. 4: Schematische Darstellung der Membran-Topologie von Pres (verändert nach Gorbunov et al. 2014).....	14
Abb. 5: Spannungsabhängige Konformationsänderungen von Pres vermitteln die zyklischen Längenänderungen der ÄHZ.....	15
Abb. 6: Pres lokalisiert in den ÄHZ ausschließlich in der lateralen Membran (Marlen Dierich).....	17
Abb. 7: Charakterisierung der Lokalisation der Pres-Orthologen aus Ratte, Zebrafisch und Huhn.....	88
Abb. 8: Darstellung des Größenspektrums (A) und der Form (B) der Pres-Cluster.....	89
Abb. 9: Ko-Lokalisations-Analyse der Pres-Orthologen.....	90
Abb. 10: Charakterisierung der rPres-cPres-Chimären hinsichtlich ihrer Membran-Verteilung in CHO-Zellen.....	92
Abb. 11: Untersuchung der Cholesterol-Abhängigkeit der Pres-Verteilung.....	94
Abb. 12: Analyse der Temperatur-Abhängigkeit der Pres-Verteilung.....	95
Abb. 13: Cav-1-Verteilung in der Plasmamembran.....	97
Abb. 14: Schematische Darstellung von Anregung und Detektion zur Abschätzung der cross emission von GFP- (A) und CFP- (B) transfizierten CHO-Zellen.....	100
Abb. 15: Darstellung des ungewollten Anteils der GFP-Emission von rPres (A), zPres (B) und cPres (C) im CFP-Detektionsbereich in der CLSM bei verschiedenen Verstärker-Einstellungen.....	102
Abb. 16: Vergleich der Ko-Lokalisation von CFP–GFP- und CFP–RFP-markierten Konstrukten.....	103
Abb. 17: Analyse der <i>cross emission</i> von CFP-Fusionskonstrukten in den GFP-Kanal in der CLSM bei verschiedenen Verstärker-Einstellung.....	105
Abb. 18: Repräsentative Konfokal-Aufnahmen der Ko-Expression von rPres und Cav-1 in CHO-Zellen.....	107
Abb. 19: Repräsentative Konfokal-Aufnahmen der Ko-Lokalisation von zPres und Cav-1 in CHO-Zellen.....	109
Abb. 20: Repräsentative CHO-Zellen der Ko-Expression von cPres und Cav-1.....	111
Abb. 21: Vergleich der Ko-Lokalisation der drei Pres-Orthologen mit Cav-1.....	112
Abb. 22: Vergleich der Ko-Lokalisation von Cav-1-CFP mit Cav-1-YFP zu den drei Zeitpunkten nach der Transfektion.....	113
Abb. 23: Repräsentative Konfokal-Aufnahmen zur Verteilung der Pres-Orthologen in Cav-1-freien Zellen.....	115
Abb. 24: Phalloidin-Färbung des Aktin-Zytoskeletts in CHO-Zellen.....	116
Abb. 25: Ko-Lokalisation von Pres und Aktin in CHO-Zellen.....	117

Abb. 26: Depolymerisation des Aktin-Zytoskeletts	118
Abb. 27: Die Abhängigkeit der Pres-Cluster vom Aktin-Zytoskelett in CHO-Zellen	119
Abb. 28: Die Abhängigkeit der Pres-Verteilung von den Mikrotubuli in CHO-Zellen	121
Abb. 29: Repräsentative Darstellung der Verteilung von MAP1S-CFP in CHO-Zellen	122
Abb. 30: Ko-Lokalisations-Analyse von Pres mit Map1S	123
Abb. 31: Vergleich der Ko-Lokalisationsdaten von Pres und Map1S	125
Abb. 32: LatA-Behandlung von Map1S-transfizierten CHO-Zellen	126
Abb. 33: Aktin-Abhängigkeit der Pres-Map1S-Ko-Lokalisation	127
Abb. 34: Vergleich der Ko-Lokalisation von Pres mit Map1S vor und nach der LatA-Behandlung.....	128
Abb. 35: Die Mikrotubuli-Abhängigkeit der Map1S-Verteilung	128
Abb. 36: Die Mikrotubuli-Abhängigkeit der Pres-Map1S-Ko-Lokalisation.....	129
Abb. 37: Vergleich der Ko-Lokalisation von Pres mit Map1S vor und nach der Kolchizin-Behandlung.....	130
Abb. 38: Western Blot zum Vergleich der Cav-1-Protein-Level bei endogener und heterologer Expression in rPres-GFP-HEKs	132
Abb. 39: Reziproke KoIP der Membran-Protein-Fraktion	133
Abb. 40: Immunhistochemische Doppelfärbung von ÄHZ adulter Wildtyp-Mäuse auf Pres und Cav-1	142
Abb. 41: Zwei mögliche Modelle zur Bildung von Pres-Plasmamembran-Domänen.	147
Abb. 42: Schema einer Pres-Plasmamembran-Domäne und der identifizierten Interaktionspartner im heterologen Expressionssystem	148

5.2.2 Tabellen

Tab. 1: Expressionsvektoren	37
Tab. 2: Verwendete Primer	53
Tab. 3: Eingesetzte Programme	83
Tab. 4: Verwendete Chemikalien	84
Tab. 5: Verbrauchsmaterial	85
Tab. 6: Quantifizierung der Ko-Lokalisation von CFP-GFP- und CFP-RFP-markierten Konstrukten	103
Tab. 7: Quantifizierungsdaten der Ko-Lokalisation von Cav-1 mit den Pres-Orthologen in Abhängigkeit von der Zeit	108
Tab. 8: Quantifikation der Ko-Lokalisation von Pres mit Map1S	124
Tab. 9: Quantifikation der Ko-Lokalisation von rPres bzw. zPres mit Map1S vor und nach der Aktin-Depolymerisation.....	126
Tab. 10: Quantifikation der Ko-Lokalisation von Pres mit Map1S vor und nach der Behandlung mit Kolchizin	130

5.2.3 Literatur

- Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, K.B., 1979. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature*, 282(5739), pp.615–6.
- Albert, J.T. et al., 2007. Voltage-sensitive prestin orthologue expressed in zebrafish hair cells. *The Journal of physiology*, 580(Pt. 2), pp.451–61.
- Aloia, R.C. & Boggs, J.M. eds., 1985. *Membrane fluidity in biology - Cellular aspects* Volume 4., Orlando, Florida: Academic press.
- Ashmore, J., 2008. Cochlear outer hair cell motility. *Physiological reviews*, 88(1), pp.173–210.
- Bai, J.-P. et al., 2010. Prestin surface expression and activity are augmented by interaction with MAP1S, a microtubule-associated protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(27), pp.20834–20843.
- Barenholz, Y., 2002. Cholesterol and other membrane active sterols: from membrane evolution to ϵ crafts. *Progress in Lipid Research*, 41(1), pp.1–5.
- Belyantseva, I.A. et al., 2000. Expression and localization of prestin and the sugar transporter GLUT-5 during development of electromotility in cochlear outer hair cells. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(24), p.RC116.
- Benser, M.E., Marquis, R.E. & Hudspeth, A.J., 1996. Rapid, Active Hair Bundle Movements in Hair Cells from the Bullfrog's Sacculus. *J. Neurosci.*, 16(18), pp.5629–5643.
- Berg, J.M., Stryer, L. & Tymoczko, J.L., 2013. *Biochemie-Stryer 7. Auflage.*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Springer Spektrum.
- Bernatchez, P. et al., 2011. A noninhibitory mutant of the caveolin-1 scaffolding domain enhances eNOS-derived NO synthesis and vasodilation in mice. *The Journal of clinical investigation*, 121(9), pp.3747–55.
- Bezanilla, F., 2008. How membrane proteins sense voltage. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(4), pp.323–332.
- Bist, A., Fielding, P.E. & Fielding, C.J., 1997. Two sterol regulatory element-like sequences mediate up-regulation of caveolin gene transcription in response to low density lipoprotein free cholesterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(20), pp.10693–8.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), pp.248–254.
- Brandt, A., Striessnig, J. & Moser, T., 2003. CaV1.3 channels are essential for development and presynaptic activity of cochlear inner hair cells. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(34), pp.10832–40.
- Breneman, K.D., Brownell, W.E. & Rabbitt, R.D., 2009. Hair cell bundles: flexoelectric motors of the inner ear. *PLoS one*, 4(4), p.e5201.
- Brownell, W.E. et al., 1985. Evoked mechanical responses of isolated cochlear outer hair cells. *Science (New York, N.Y.)*, 227(4683), pp.194–196.
- Brownell, W.E. et al., 2011. Membrane cholesterol modulates cochlear electromechanics. *Pflügers Archiv: European journal of physiology*, 461(6), pp.677–86.
- Brownell, W.E., 1990. Outer hair cell electromotility and otoacoustic emissions. *Ear Hear*, 11, pp.82–92.
- Brownell, W.E. & Popel, A.S., 1998. Electrical and mechanical anatomy of the outer hair cell. In A. R. Palmer et al., eds. *Psychophysical and Physiological Advances in Hearing*. pp. 98–96.
- Chan, D.K. & Hudspeth, A.J., 2005. Ca²⁺ current-driven nonlinear amplification by the mammalian cochlea in vitro. *Nature neuroscience*, 8(2), pp.149–55.
- Cheatham, M.A. et al., 2004. Cochlear function in Prestin knockout mice. *The Journal of physiology*, 560(Pt 3), pp.821–30.
- Cheng, J.P.X. & Nichols, B.J., 2015. Caveolae: One Function or Many? *Trends in cell biology*.
- Chernova, M.N. et al., 2003. Acute regulation of the SLC26A3 congenital chloride diarrhoea anion exchanger (DRA) expressed in *Xenopus* oocytes. *The Journal of physiology*, 549(Pt 1), pp.3–19.
- Chernova, M.N. et al., 2005. Functional comparison of mouse slc26a6 anion exchanger with human SLC26A6 polypeptide variants: differences in anion selectivity, regulation, and electrogenicity. *The Journal of biological chemistry*, 280(9), pp.8564–80.
- Cimerman, J. et al., 2013. Generation of somatic electromechanical force by outer hair cells may be influenced by prestin-CASK interaction at the basal junction with the Deiter's cell. *Histochemistry and Cell Biology*, 140(2), pp.119–135.
- Cohen, A.R. et al., 1998. Human CASK/LIN-2 Binds Syndecan-2 and Protein 4.1 and Localizes to the Basolateral Membrane of Epithelial Cells. *The Journal of Cell Biology*, 142(1), pp.129–138.
- Cohen, A.W. et al., 2004. Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiological reviews*, 84(4), pp.1341–79.
- Cokakli, M. et al., 2009. Differential expression of Caveolin-1 in hepatocellular carcinoma: correlation with differentiation state, motility and invasion. *BMC Cancer*, 9, p.65.
- Cooper, N.P. & Guinan, J.J., 2003. Separate mechanical processes underlie fast and slow effects of medial olivocochlear efferent activity. *The Journal of physiology*, 548(Pt 1), pp.307–12.
- Crawford, A.C. & Fettiplace, R., 1985. The mechanical properties of ciliary bundles of turtle cochlear hair cells. *The Journal of Physiology*, 364(1), pp.359–379.

- Crumling, M. a. et al., 2012. Hearing Loss and Hair Cell Death in Mice Given the Cholesterol-Chelating Agent Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin S. Barnes, ed. *PLoS ONE*, 7(12), pp.1–8.
- Dallos, P., 2008. Cochlear amplification, outer hair cells and prestin. *Current opinion in neurobiology*, 18(4), pp.370–6.
- Dallos, P. et al., 2008. Prestin-based outer hair cell motility is necessary for mammalian cochlear amplification. *Neuron*, 58(3), pp.333–9.
- Dallos, P., 1992. The active cochlea. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 12(12), pp.4575–4585.
- Dallos, P., Evans, B.N. & Hallworth, R., 1991. Nature of the motor element in electrokinetic shape changes of cochlear outer hair cells. *Nature*, 350(6314), pp.155–7.
- Dallos, P. & Fakler, B., 2002. Prestin, a new type of motor protein. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 3(2), pp.104–111.
- Dallos, P., Popper, A. & Fay, R. (Editors), 1996. *Springer Handbook of auditory research: The Cochlea*, Springer Science & Business Media.
- Davidson, C.D. et al., 2009. Chronic cyclodextrin treatment of murine Niemann-Pick C disease ameliorates neuronal cholesterol and glycosphingolipid storage and disease progression. *PloS one*, 4(9), p.e6951.
- Denk, W. et al., 1995. Calcium imaging of single stereocilia in hair cells: Localization of transduction channels at both ends of tip links. *Neuron*, 15(6), pp.1311–1321.
- Deurs, B. van et al., 2003. Caveolae: anchored, multifunctional platforms in the lipid ocean. *Trends in Cell Biology*, 13(2), pp.92–100.
- Dieler, R., Shehata-Dieler, W.E. & Brownell, W.E., 1991. Concomitant salicylate-induced alterations of outer hair cell subsurface cisternae and electromotility. *Journal of neurocytology*, 20(8), pp.637–653.
- Dorwart et al., 2008. The Solute Carrier 26 Family of Proteins in Epithelial Ion Transport. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 23, pp.104–14.
- Drenckhahn, D., Schafer, T. & Prinz, M., 1985. Actin, myosin and associated proteins in the vertebrate auditory and vestibular organs: immunocytochemical and biochemical studies. *Auditory biochemistry*, pp.317–335.
- Duncan, R.K., Benson, J., Liu, L.Q., Dolan, D.F., Altschuler, R.A., 2009. No Title. In *Background Strain Influences the Hearing Loss Associated with Caveolin-1 Knockout Mouse*. Available at: http://www.aro.org/archives/2009/2009_1161_3324bea3.html.
- Echarri, A. & Del Pozo, M.A., 2015. Caveolae - mechanosensitive membrane invaginations linked to actin filaments. *Journal of cell science*, 128(15), pp.2747–58.
- Elgoyhen, A.B. et al., 2001. $\alpha 10$: a determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(6), pp.3501–6.
- Elgoyhen, A.B. et al., 1994. $\alpha 9$: An acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell*, 79(4), pp.705–715.
- Engstrom, H. & Sjostrand, F., 1954. The structure and innervation of the cochlear hair cells. *Acta Otolaryngol.*, 44(5-6), pp.490–501.
- Eska, G., 2013. *Schall & Klang: Wie und was wir hören*, Springer-Verlag.
- Felix, H., 2002. Anatomical differences in the peripheral auditory system of mammals and man. A mini review. *Advances in oto-rhino-laryngology*, 59, pp.1–10.
- Fettiplace, R., 2006. Active hair bundle movements in auditory hair cells. *The Journal of physiology*, 576(Pt 1), pp.29–36.
- Fettiplace, R. & Hackney, C.M., 2006. The sensory and motor roles of auditory hair cells. *Nature reviews. Neuroscience*, 7(1), pp.19–29.
- Fettiplace, R. & Kim, K.X., 2014. The Physiology of Mechanoelectrical Transduction Channels in Hearing. *Physiological reviews*, 94(3), pp.951–986.
- Fielding, C.J., Bist, A. & Fielding, P.E., 1997. Caveolin mRNA levels are up-regulated by free cholesterol and down-regulated by oxysterols in fibroblast monolayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(8), pp.3753–8.
- Fisher, J.A.N. et al., 2012. The spatial pattern of cochlear amplification. *Neuron*, 76(5), pp.989–97.
- Flock, Å., Flock, B. & Murray, E., 1977. Studies on the Sensory Hairs of Receptor Cells in the Inner Ear. *Acta Otolaryngologica*, 83(1-6), pp.85–91.
- Flock, Å., Flock, B. & Ulfendahl, M., 1986. Mechanisms of movement in outer hair cells and a possible structural basis. *Archives of oto-rhino-laryngology*, 243(2), pp.83–90.
- Fölling, J. et al., 2008. Fluorescence nanoscopy by ground-state depletion and single-molecule return. , 5(11), pp.943–945.
- Forge, A., 1991. Structural features of the lateral walls in mammalian cochlear outer hair cells. *Cell and Tissue Research*, 265(3), pp.473–483.
- Foster, L.J. et al., 2000. A Functional Role for VAP-33 in Insulin-Stimulated GLUT4 Traffic. *Traffic*, 1(6), pp.512–521.
- Frank, G., Hemmert, W. & Gummer, a W., 1999. Limiting dynamics of high-frequency electromechanical transduction of outer hair cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(8), pp.4420–4425.
- Frank, P.G. et al., 2002. Stabilization of Caveolin-1 by Cellular Cholesterol and Scavenger Receptor Class B Type I

- †. *Biochemistry*, 41(39), pp.11931–11940.
- Freberg, L., 2015. *Discovering Behavioral Neuroscience: An Introduction to Biological Psychology*, Wadsworth Inc Fulfillment; Auflage: Revised. Cengage Learning.
- Frolenkov, G.I., 2006. Regulation of electromotility in the cochlear outer hair cell. *The Journal of physiology*, 576(Pt 1), pp.43–8.
- Fuchs, P., 2002. The synaptic physiology of cochlear hair cells. *Audiology & neuro-otology*, 7(1), pp.40–4.
- Fujimoto, T. et al., 2000. Isoforms of caveolin-1 and caveolar structure. *Journal of Cell Science*, 113 Pt 19, pp.3509–3517.
- Fujimoto, T., Miyawaki, A. & Mikoshiba, K., 1995. Inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor-like protein in plasmalemmal caveolae is linked to actin filaments. *Journal of cell science*, 15, pp.7–15.
- Furness, D.N. & Hackney, C.M., 2006. *The structure and composition of the stereociliary bundle of vertebrate hair cells* A. P. edited by RA Eatock, RR Fay, ed., New York: Springer.
- Gao, J. et al., 2007. Prestin-based outer hair cell electromotility in knockin mice does not appear to adjust the operating point of a cilia-based amplifier. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(30), pp.12542–7.
- Geertsma, E.R. et al., 2015. Structure of a prokaryotic fumarate transporter reveals the architecture of the SLC26 family. *Nature structural & molecular biology*, 22(10), pp.803–8.
- Gillespie, P.G. & Müller, U., 2009. Mechanotransduction by hair cells: models, molecules, and mechanisms. *Cell*, 139(1), pp.33–44.
- Gliko, O., Saggau, P. & Brownell, W.E., 2009. Compartmentalization of the outer hair cell demonstrated by slow diffusion in the extracisternal space. *Biophysical journal*, 97(4), pp.1215–24.
- Glowatzki, E., Grant, L. & Fuchs, P., 2008. Hair cell afferent synapses. *Current opinion in neurobiology*, 18(4), pp.389–95.
- Gorbunov, D. et al., 2014. Molecular architecture and the structural basis for anion interaction in prestin and SLC26 transporters. *Nature communications*, 5(Vimm), p.3622.
- Goswami, D. et al., 2008. Nanoclusters of GPI-Anchored Proteins Are Formed by Cortical Actin-Driven Activity. *Cell*, 135(6), pp.1085–1097.
- Goudenege, S. et al., 2007. Comparative proteomic analysis of myotube caveolae after milli-calpain deregulation. *Proteomics*, 7(18), pp.3289–3298.
- Graf, G.A. et al., 1999. The Class B, Type I Scavenger Receptor Promotes the Selective Uptake of High Density Lipoprotein Cholesterol Esters into Caveolae. *Journal of Biological Chemistry*, 274(17), pp.12043–12048.
- Greson, J.N. et al., 2006. Assessment of prestin self-association using fluorescence resonance energy transfer. *Brain research*, 1091(1), pp.140–50.
- Guinan, J.J., 2012. How are inner hair cells stimulated? Evidence for multiple mechanical drives. *Hearing research*, 292(1-2), pp.35–50.
- Gulley, R.L. & Reese, T.S., 1977. Regional specialization of the hair cell plasmalemma in the organ of corti. *The Anatomical record*, 189(1), pp.109–23.
- Hailstones, D. et al., 1998. Regulation of caveolin and caveolae by cholesterol in MDCK cells. *J. Lipid Res.*, 39(2), pp.369–379.
- Hallworth, R. & Nichols, M.G., 2012. Prestin in HEK cells is an obligate tetramer. *Journal of Neurophysiology*, 107(1), pp.5–11.
- Han, Y. et al., 2015. Noise-induced cochlear F-actin depolymerization is mediated via ROCK2/p-ERM signaling. *Journal of Neurochemistry*, 133(5), pp.617–628.
- He, D.Z. & Dallos, P., 2000. Properties of voltage-dependent somatic stiffness of cochlear outer hair cells. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology: JARO*, 1(1), pp.64–81.
- He, D.Z. & Dallos, P., 1999. Somatic stiffness of cochlear outer hair cells is voltage-dependent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(14), pp.8223–8.
- He, D.Z.Z. et al., 2010. Changes in plasma membrane structure and electromotile properties in prestin deficient outer hair cells. *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)*, 67(1), pp.43–55.
- He, D.Z.Z. et al., 2003. Chick hair cells do not exhibit voltage-dependent somatic motility. *The Journal of physiology*, 546(Pt 2), pp.511–20.
- He, D.Z.Z. & Dallos, P., 1999. Development of Acetylcholine-Induced Responses in Neonatal Gerbil Outer Hair Cells. *Journal of Neurophysiology*, 81(3), pp.1162–1170.
- Head, B.P. et al., 2006. Microtubules and Actin Microfilaments Regulate Lipid Raft/Caveolae Localization of Adenylyl Cyclase Signaling Components. *Journal of Biological Chemistry*, 281(36), pp.26391–26399.
- Head, B.P., Patel, H.H. & Insel, P.A., 2014. Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: impact on signaling and function: membrane/lipid rafts, mediators of cytoskeletal arrangement and cell signaling. *Biochimica et biophysica acta*, 1838(2), pp.532–45.
- Holley, M.C. & Ashmore, J.F., 1988. A cytoskeletal spring in cochlear outer hair cells. *Nature*, 335(6191), pp.635–7.
- Holley, M.C. & Ashmore, J.F., 1990. Spectrin, actin and the structure of the cortical lattice in mammalian cochlear outer hair cells. *Journal of cell science*, 96 (Pt 2), pp.283–291.
- Holley, M.C., Kalinec, F. & Kachar, B., 1992. Structure of the cortical cytoskeleton in mammalian outer hair cells. *Journal of cell science*, 102 (Pt 3), pp.569–580.
- Holzmann, D., Ott, P.M. & Felix, H., 2000. Diagnostic approach to primary ciliary dyskinesia: a review. *European journal of pediatrics*, 159(1-2), pp.95–98.

- Homma, K. et al., 2010. Interaction between CFTR and prestin (SLC26A5). *Biochimica et biophysica acta*, 1798(6), pp.1029–40.
- Homma, K. & Dallos, P., 2011. Evidence that prestin has at least two voltage-dependent steps. *The Journal of biological chemistry*, 286(3), pp.2297–307.
- Housley, G.D. & Ashmore, J.F., 1992. Ionic currents of outer hair cells isolated from the guinea-pig cochlea. *The Journal of physiology*, 448, pp.73–98.
- Hudspeth, A.J., 1989. How the ear's works work. *Nature*, 341(6241), pp.397–404.
- Hudspeth, A.J. et al., 2000. Putting ion channels to work: mechano-electrical transduction, adaptation, and amplification by hair cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(22), pp.11765–72.
- Ikeda, K., Sunose, H. & Takasaka, T., 1993. Effects of free radicals on the intracellular calcium concentration in the isolated outer hair cell of the guinea pig cochlea. *Acta oto-laryngologica*, 113(1-2), pp.137–141.
- Ishitsuka, R., Sato, S.B. & Kobayashi, T., 2005. Imaging lipid rafts. *Journal of biochemistry*, 137(3), pp.249–54.
- Iwasa, K.H., 2001. A two-state piezoelectric model for outer hair cell motility. *Biophysical journal*, 81(5), pp.2495–506.
- Jensen-Smith, H. & Hallworth, R., 2007. Lateral wall protein content mediates alterations in cochlear outer hair cell mechanics before and after hearing onset. *Cell motility and the cytoskeleton*, 64(9), pp.705–17.
- Jia, S., Dallos, P. & He, D.Z.Z., 2007. Mechano-electric transduction of adult inner hair cells. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(5), pp.1006–14.
- Kachar, B. et al., 2000. High-resolution structure of hair-cell tip links. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(24), pp.13336–41.
- Kalinec, F. et al., 1992. A membrane-based force generation mechanism in auditory sensory cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(18), p.8671.
- Kalinec, F. et al., 2000. Rho GTPases mediate the regulation of cochlear outer hair cell motility by acetylcholine. *Journal of Biological Chemistry*, 275(36), pp.28000–28005.
- Kamar, R.I., Organ-Darling, L.E. & Raphael, R.M., 2012. Membrane cholesterol strongly influences confined diffusion of prestin. *Biophysical journal*, 103(8), pp.1627–36.
- Katz, E. et al., 2000. High calcium permeability and calcium block of the $\alpha 9$ nicotinic acetylcholine receptor. *Hearing Research*, 141(1), pp.117–128.
- Kawano, M. et al., 2006. Efficient trafficking of ceramide from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus requires a VAMP-associated protein-interacting FFAT motif of CERT. *The Journal of biological chemistry*, 281(40), pp.30279–88.
- Keller, J.P. et al., 2014. Functional regulation of the SLC26-family protein prestin by calcium/calmodulin. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 34(4), pp.1325–32.
- Kharkovets, T. et al., 2000. KCNQ4, a K⁺ channel mutated in a form of dominant deafness, is expressed in the inner ear and the central auditory pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(8), pp.4333–8.
- Kitani, R., Park, C. & Kalinec, F., 2013. Microdomains shift and rotate in the lateral wall of cochlear outer hair cells. *Biophysical journal*, 104(1), pp.8–18.
- Ko, S.B.H. et al., 2002. A molecular mechanism for aberrant CFTR-dependent HCO₃⁻ transport in cystic fibrosis. *The EMBO journal*, 21(21), pp.5662–72.
- Ko, S.B.H. et al., 2004. Gating of CFTR by the STAS domain of SLC26 transporters. *Nature cell biology*, 6(4), pp.343–50.
- Kogo, H. & Fujimoto, T., 2000. Caveolin-1 isoforms are encoded by distinct mRNAs. *FEBS Letters*, 465(2-3), pp.119–123.
- Kong, W.-J. et al., 2006. Fast cholinergic efferent inhibition in guinea pig outer hair cells. *Brain research*, 1102(1), pp.103–8.
- Kozlov, A.S., Rislis, T. & Hudspeth, A.J., 2007. Coherent motion of stereocilia assures the concerted gating of hair-cell transduction channels. *Nature neuroscience*, 10(1), pp.87–92.
- Kros, C.J., Ruppersberg, J.P. & Rüsch, A., 1998. Expression of a potassium current in inner hair cells during development of hearing in mice. *Nature*, 394(6690), pp.281–4.
- Kubisch, C. et al., 1999. KCNQ4, a Novel Potassium Channel Expressed in Sensory Outer Hair Cells, Is Mutated in Dominant Deafness. *Cell*, 96(3), pp.437–446.
- Kujawa, J. et al., 2014. The effect of near-infrared MLS laser radiation on cell membrane structure and radical generation. *Lasers in medical science*, 29(5), pp.1663–8.
- Lamas, V. et al., 2014. Acoustic input and efferent activity regulate the expression of molecules involved in cochlear micromechanics. *Frontiers in systems neuroscience*, 8, p.253.
- Legendre, K. et al., 2008. α II_B-betaV spectrin bridges the plasma membrane and cortical lattice in the lateral wall of the auditory outer hair cells. *Journal of cell science*, 121(Pt 20), pp.3347–56.
- Li, S., Couet, J. & Lisanti, M.P., 1996. Src Tyrosine Kinases, G_i Subunits, and H-Ras Share a Common Membrane-anchored Scaffolding Protein, Caveolin. *The Journal of biological chemistry*, 271(46), pp.29182–29190.
- Li, S., Seitz, R. & Lisanti, M.P., 1996. Phosphorylation of Caveolin by Src Tyrosine Kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 271(7), pp.3863–3868.

- Lieberman, M.C. et al., 2002. Prestin is required for electromotility of the outer hair cell and for the cochlear amplifier. *Nature*, 419(6904), pp.300–4.
- Lim, J.S. et al., 2014. Caveolin-1 mediates Salmonella invasion via the regulation of SopE-dependent Rac1 activation and actin reorganization. *The Journal of infectious diseases*, 210(5), pp.793–802.
- Lisanti, M.P. et al., 1994. Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *The Journal of Cell Biology*, 126, pp.111–126.
- Liu, L.Q., Cheng, A., Patel, C., Duncan, R.K., 2007. No Title. In *Lipid Raft Expression in the Chick Auditory Periphery*. Available at: http://www.aro.org/archives/2007/2007_1035.html.
- Liu, B. et al., 2010. Cyclodextrin overcomes the transport defect in nearly every organ of NPC1 mice leading to excretion of sequestered cholesterol as bile acid. *Journal of lipid research*, 51(5), pp.933–44.
- Liu, X.Z., 2003. Prestin, a cochlear motor protein, is defective in non-syndromic hearing loss. *Human Molecular Genetics*, 12(10), pp.1155–1162.
- Lucero, H.A. & Robbins, P.W., 2004. Lipid rafts-protein association and the regulation of protein activity. *Archives of biochemistry and biophysics*, 426(2), pp.208–24.
- Ludwig, J. et al., 2001. Reciprocal electromechanical properties of rat prestin: the motor molecule from rat outer hair cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(7), pp.4178–83.
- Lumpkin, E.A. & Hudspeth, A.J., 1995. Detection of Ca²⁺ entry through mechanosensitive channels localizes the site of mechano-electrical transduction in hair cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(22), pp.10297–10301.
- Mahendrasingam, S., Furness, D., & Hackney, C., 1998. Ultrastructural localisation of spectrin in sensory and supporting cells of guinea-pig organ of Corti. *Hearing Research*, 126(1-2), pp.151–160.
- Mammo, F. & Ashmore, J.F., 1993. Reverse transduction measured in the isolated cochlea by laser Michelson interferometry. *Nature*, 363(6449), pp.838–41.
- Marcucci, R. et al., 2005. Cardiovascular and thrombophilic risk factors for idiopathic sudden sensorineural hearing loss. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3(5), pp.929–934.
- Marfatia, S.M. et al., 1995. Identification of the Protein 4.1 Binding Interface on Glycophorin C and p55, a Homologue of the Drosophila discs-large Tumor Suppressor Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 270(2), pp.715–719.
- Martin, P. et al., 2003. Spontaneous oscillation by hair bundles of the bullfrog's sacculus. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(11), pp.4533–48.
- Martin, P. & Hudspeth, A.J., 1999. Active hair-bundle movements can amplify a hair cell's response to oscillatory mechanical stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(25), pp.14306–14311.
- Matsubara, A. et al., 1996. Organization of AMPA Receptor Subunits at a Glutamate Synapse: A Quantitative Immunogold Analysis of Hair Cell Synapses in the Rat Organ of Corti. *J. Neurosci.*, 16(14), pp.4457–4467.
- Matsuda, K. et al., 2004. N-linked glycosylation sites of the motor protein prestin: effects on membrane targeting and electrophysiological function. *Journal of neurochemistry*, 89(4), pp.928–38.
- Matsumoto, N. et al., 2010. Pivotal role of actin depolymerization in the regulation of cochlear outer hair cell motility. *Biophysical Journal*, 99, pp.2067–2076.
- van Meer, G., 1998. Lipids of the Golgi membrane. *Trends in Cell Biology*, 8(9), pp.29–33.
- Mohan, R. & John, A., 2015. Microtubule-associated proteins as direct crosslinkers of actin filaments and microtubules. *IUBMB Life*, 67(6), pp.395–403.
- Morizono, T. & Paparella, M.M., 1978. Hypercholesterolemia and Auditory Dysfunction: Experimental Studies. *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*, 87(6), pp.804–814.
- Mount, D.B. & Romero, M.F., 2004. The SLC26 gene family of multifunctional anion exchangers. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 447(5), pp.710–721.
- Mukaka, M.M., 2012. Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi medical journal: the journal of Medical Association of Malawi*, 24(3), pp.69–71.
- Mundy, D.I. et al., 2002. Dual control of caveolar membrane traffic by microtubules and the actin cytoskeleton. *Journal of Cell Science*, 115, pp.4327–4339.
- Murata, M. et al., 1995. VIP21 / caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(October), pp.10339–10343.
- Mutai, H. et al., 2013. Diverse spectrum of rare deafness genes underlies early-childhood hearing loss in Japanese patients: a cross-sectional, multi-center next-generation sequencing study. *Orphanet journal of rare diseases*, 8, p.172.
- Nagy, I. et al., 2005. Promyelocytic leukemia zinc finger protein localizes to the cochlear outer hair cells and interacts with prestin, the outer hair cell motor protein. *Hearing research*, 204(1-2), pp.216–22.
- Navaratnam, D. et al., 2005. N-terminal-mediated homomultimerization of prestin, the outer hair cell motor protein. *Biophysical journal*, 89(5), pp.3345–52.
- Needham, D. & Nunn, R.S., 1990. Elastic deformation and failure of lipid bilayer membranes containing cholesterol. *Biophysical journal*, 58(4), pp.997–1009.
- Neher, E. & Sakmann, B., 1976. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, 260(5554), pp.799–802.
- Neilson, L.I. et al., 1999. cDNA cloning and characterization of a human sperm antigen (SPAG6) with homology to the product of the Chlamydomonas PF16 locus. *Genomics*, 60(3), pp.272–80.
- Nguyen, T.N. & Brownell, W.E., 1998. Contribution of membrane cholesterol to outer hair cell lateral wall stiffness-

- First Place—Resident Clinical Science Award 1997. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 119(1), pp.14–20.
- Nilius, B. & Droogmans, G., 2003. Amazing chloride channels: an overview. *Acta physiologica Scandinavica*, 177(2), pp.119–47.
- Nishimura, Y. et al., 1999. Molecular cloning and characterization of mammalian homologues of vesicle-associated membrane protein-associated (VAMP-associated) proteins. *Biochemical and biophysical research communications*, 254(1), pp.21–6.
- Nowotny, M. & Gummer, A.W., 2011. Vibration responses of the organ of Corti and the tectorial membrane to electrical stimulation. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 130(6), pp.3852–72.
- Oghalai, J.S. et al., 1998. Fluorescence-Imaged Microdeformation of the Outer Hair Cell Lateral Wall. *J. Neurosci.*, 18(1), pp.48–58.
- Oghalai, J.S., 2004. The cochlear amplifier: augmentation of the traveling wave within the inner ear. *Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery*, 12(5), pp.431–8.
- Ohvo-Rekilä, H., 2002. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Progress in Lipid Research*, 41(1), pp.66–97.
- Oliver, D. et al., 2000. Gating of Ca²⁺-Activated K⁺ Channels Controls Fast Inhibitory Synaptic Transmission at Auditory Outer Hair Cells. *Neuron*, 26(3), pp.595–601.
- Oliver, D. et al., 2001. Intracellular anions as the voltage sensor of prestin, the outer hair cell motor protein. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5525), pp.2340–2343.
- Oliver, D. & Fakler, B., 1999. Expression density and functional characteristics of the outer hair cell motor protein are regulated during postnatal development in rat. *The Journal of physiology*, 519 Pt 3, pp.791–800.
- Orbán-Németh, Z. et al., 2005. Microtubule-associated protein 1S, a short and ubiquitously expressed member of the microtubule-associated protein 1 family. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, pp.2257–2265.
- Organ, L.E. & Raphael, R.M., 2007. Application of fluorescence recovery after photobleaching to study prestin lateral mobility in the human embryonic kidney cell. *Journal of biomedical optics*, 12(2), p.021003.
- Palade, G.E., 1953. Fine structure of blood capillaries. *J. Appl. Phys.*, 24, p.p. 1424.
- Pape, H.-C. et al., 2010. *Lehrbuch der Physiologie* 6., vollst. R. Klinke et al., eds., Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York.
- Parton, R.G., Joggerst, B. & Simons, K., 1994. Regulated internalization of caveolae. *The Journal of cell biology*, 127(5), pp.1199–215.
- Parton, R.G. & Simons, K., 2007. The multiple faces of caveolae. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(3), pp.185–94.
- Patel, H.H. & Insel, P. a, 2009. Lipid rafts and caveolae and their role in compartmentation of redox signaling. *Antioxidants & redox signaling*, 11(6), pp.1357–1372.
- Physikalisch-Technische Bundesanstalt Braunschweig, 2015. Die gesetzlichen Einheiten in Deutschland. Available at: \\Netapp1\Groups\18Larissa\Online Papers\Die gesetzlichen Einheiten in Deutschland.pdf.
- Pickles, J.O., Comis, S.D. & Osborne, M.P., 1984. Cross-links between stereocilia in the guinea pig organ of Corti, and their possible relation to sensory transduction. *Hearing Research*, 15(2), pp.103–112.
- Pike, L.J., 2003. Lipid rafts: bringing order to chaos. *Journal of lipid research*, 44(4), pp.655–67.
- Pike, L.J., 2004. Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *The Biochemical journal*, 378, pp.281–292.
- Platzer, J. et al., 2000. Congenital Deafness and Sinoatrial Node Dysfunction in Mice Lacking Class D L-Type Ca²⁺ Channels. *Cell*, 102(1), pp.89–97.
- Pollice, P.A. & Brownell, W.E., 1993. Characterization of the outer hair cell's lateral wall membranes. *Hearing Research*, 70(2), pp.187–196.
- Powers, R.J. et al., 2012. Stereocilia Membrane Deformation: Implications for the Gating Spring and Mechano-transduction Channel. *Biophysical Journal*, 102(2), pp.201–210.
- Rajagopalan, L. et al., 2010. Glycosylation Regulates Prestin Cellular Activity. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology JARO*, 11, pp.39–51.
- Rajagopalan, L. et al., 2007. Tuning of the Outer Hair Cell Motor by Membrane Cholesterol. *Journal of Biological Chemistry*, 282(50), pp.36659–36670.
- Rask-Andersen, H. et al., 2012. Human cochlea: Anatomical characteristics and their relevance for cochlear implantation. *Anatomical Record*, 295(11), pp.1791–1811.
- Ren, T. & Gillespie, P.G., 2012. Probing the cochlear amplifier by immobilizing molecular motors of sensory hair cells. *Neuron*, 76(5), pp.868–70.
- Reuter, G. et al., 1992. High frequency radial movements of the reticular lamina induced by outer hair cell motility. *Hearing research*, 60(2), pp.236–246.
- Ricci, A.J., Crawford, A.C. & Fettiplace, R., 2000. Active Hair Bundle Motion Linked to Fast Transducer Adaptation in Auditory Hair Cells. *J. Neurosci.*, 20(19), pp.7131–7142.
- Roberts, W.M., Jacobs, R. a & Hudspeth, a J., 1990. Colocalization of ion channels involved in frequency selectivity and synaptic transmission at presynaptic active zones of hair cells. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 10(11), pp.3664–3684.
- Rothberg, K.G. et al., 1992. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell*, 68(4), pp.673–682.
- Saier, M.H. et al., 2009. The Transporter Classification Database: recent advances. *Nucleic acids research*, 37(Database issue), pp.D274–8.
- Saito, K., 1983. Fine structure of the sensory epithelium of guinea-pig organ of Corti: Subsurface cisternae and

- lamellar bodies in the outer hair cells. *Cell and Tissue Research*, 229(3).
- Saito, T., Sato, K. & Saito, H., 1986. An experimental study of auditory dysfunction associated with hyperlipoproteinemia. *Arch Otorhinolaryngol*, 243(4), pp.242–245.
- Santi, P., Mancini, P. & Barnes, C., 1994. Identification and localization of the GM1 ganglioside in the cochlea using thin-layer chromatography and cholera toxin. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, 42(6), pp.705–716.
- Santos-Sacchi, J. et al., 2006. On the temperature and tension dependence of the outer hair cell lateral membrane conductance G_{meL} and its relation to prestin. *Pflügers Archiv: European journal of physiology*, 452(3), pp.283–289.
- Santos-Sacchi, J., 1991. Reversible inhibition of voltage-dependent outer hair cell motility and capacitance. *J. Neurosci.*, 11(10), pp.3096–3110.
- Santos-Sacchi, J. & Huang, G., 1998. Temperature dependence of outer hair cell nonlinear capacitance. *Hearing Research*, 116(1-2), pp.99–106.
- Santos-Sacchi, J., Huang, G.J. & Wu, M., 1997. Mapping the distribution of outer hair cell voltage-dependent conductances by electrical amputation. *Biophysical journal*, 73(3), pp.1424–9.
- Sapiro, R. et al., 2002. Male Infertility, Impaired Sperm Motility, and Hydrocephalus in Mice Deficient in Sperm-Associated Antigen 6. *Molecular and Cellular Biology*, 22(17), pp.6298–6305.
- Schaechinger, T.J. & Oliver, D., 2007. Nonmammalian orthologs of prestin (SLC26A5) are electrogenic divalent/chloride anion exchangers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(18), pp.7693–8.
- Scherer, P.E. et al., 1995. Caveolin Isoforms Differ in Their N-terminal Protein Sequence and Subcellular Distribution. Identification and epitope mapping of an isoform-specific monoclonal antibody probe. *Journal of Biological Chemistry*, 270(27), pp.16395–16401.
- Schiebler, T., Winckler, J. & Kaufmann, P., 2005. *Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie* 9. Auflage. T. H. Schiebeler, ed., Springer-Verlag.
- Schnitzer, J.E., 1994. Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *The Journal of Cell Biology*, 127(5), pp.1217–1232.
- Schulte, B., 1993. Immunohistochemical localization of intracellular Ca-ATPase in outer hair cells, neurons and fibrocytes in the adult and developing inner ear. *Hear Res.*, 65(1-2), pp.262–73.
- Schwander, M., Kachar, B. & Müller, U., 2010. Review series: The cell biology of hearing. *The Journal of cell biology*, 190(1), pp.9–20.
- Sengupta, S. et al., 2010. Interaction between the motor protein prestin and the transporter protein VAPA. *Biochimica et biophysica acta*, 1803(7), pp.796–804.
- Sfondouris, J. et al., 2008. Membrane composition modulates prestin-associated charge movement. *The Journal of biological chemistry*, 283(33), pp.22473–81.
- Sharma, D.K. et al., 2004. Selective stimulation of caveolar endocytosis by glycosphingolipids and cholesterol. *Molecular biology of the cell*, 15(7), pp.3114–22.
- Shatz, M. & Liscovitch, M., 2008. Caveolin-1: a tumor-promoting role in human cancer. *International journal of radiation biology*, 84(3), pp.177–189.
- Shotwell, S.L., Jacobs, R. & Hudspeth, A.J., 1981. Directional sensitivity of individual vertebrate hair cells to controlled deflection of their hair bundles. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 374(1 Vestibular an), pp.1–10.
- Sikora, M. a et al., 2015. Diet-induced hyperlipidemia and auditory dysfunction. *Acta oto-laryngologica*, 102(5-6), pp.372–381.
- Simons, K., 2000. How Cells Handle Cholesterol. *Science*, 290(5497), pp.1721–1726.
- Simons, K. & Gerl, M.J., 2010. Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(10), pp.688–699.
- Simons, K. & Ikonen, E., 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387, pp.569–572.
- Simpson, J.E. et al., 2005. Chloride conductance of CFTR facilitates basal Cl⁻/HCO₃⁻ exchange in the villous epithelium of intact murine duodenum. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 288(6), pp.G1241–51.
- Singla, A. et al., 2014. Surgical Anatomy of the Basal Turn of the Human Cochlea as Pertaining to Cochlear Implantation. *Otology & neurotology: official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology*, pp.1–6.
- Skehel, P.A., Fabian-Fine, R. & Kandel, E.R., 2000. Mouse VAP33 is associated with the endoplasmic reticulum and microtubules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(3), pp.1101–6.
- Slepecky, N. & Chamberlain, S.C., 1985. Immunoelectron microscopic and immunofluorescent localization of cytoskeletal and muscle-like contractile proteins in inner ear sensory hair cells. *Hearing research*, 20(3), pp.245–260.
- Song, J. & Waugh, R.E., 1993. Bending rigidity of SOPC membranes containing cholesterol. *Biophysical journal*, 64(6), pp.1967–70.
- Song, L. & Santos-Sacchi, J., 2015. An electrical inspection of the subsurface cisternae of the outer hair cell. *Biophysical journal*, 108(3), pp.568–77.
- Song, L. & Santos-Sacchi, J., 2013. Disparities in voltage-sensor charge and electromotility imply slow chloride-

- driven state transitions in the solute carrier SLC26a5. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(10), pp.3883–8.
- Sowa, G., Pypaert, M. & Sessa, W.C., 2001. Distinction between signaling mechanisms in lipid rafts vs. caveolae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(24), pp.14072–7.
- Sridhar, T.S. et al., 1995. A Novel Cholinergic Cochlear Potentials. *The Journal of neuroscience*, 15(May), pp.3667–3678.
- Sridhar, T.S., Brown, M.C. & Sewell, W.F., 1997. Unique Postsynaptic Signaling at the Hair Cell Efferent Synapse Permits Calcium to Evoke Changes on Two Time Scales. *J. Neurosci.*, 17(1), pp.428–437.
- Stahlhut, M. & van Deurs, B., 2000. Identification of Filamin as a Novel Ligand for Caveolin-1: Evidence for the Organization of Caveolin-1-associated Membrane Domains by the Actin Cytoskeleton. *Molecular Biology of the Cell*, 11(1), pp.325–337.
- Sturm, A.K. et al., 2007. Functional expression and microdomain localization of prestin in cultured cells. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 136(3), pp.434–9.
- Suzuki, T. et al., 2011. Association of membrane rafts and postsynaptic density: proteomics, biochemical, and ultrastructural analyses. *Journal of neurochemistry*, 119(1), pp.64–77.
- Syka, J. et al., 2007. Atorvastatin slows down the deterioration of inner ear function with age in mice. *Neuroscience letters*, 411(2), pp.112–6.
- Thiele, C. et al., 2000. Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nature cell biology*, 2(1), pp.42–49.
- Viola, A. & Gupta, N., 2007. Tether and trap: regulation of membrane-raft dynamics by actin-binding proteins. *Nature Reviews Immunology*, 7(11), pp.889–896.
- Wang, J. et al., 2015. Expression of prestin in OHCs is reduced in Spag6 gene knockout mice. *Neuroscience letters*, 592, pp.42–7.
- Wang, L. et al., 2003. Caveolin-1 does not affect SR-BI-mediated cholesterol efflux or selective uptake of cholesterol ester in two cell lines. *Journal of lipid research*, 44(4), pp.807–15.
- Wang, X. et al., 2010. Prestin forms oligomer with four mechanically independent subunits. *Brain research*, 1333, pp.28–35.
- Wharton, J. et al., 2005. Dissociation of insulin receptor expression and signaling from caveolin-1 expression. *The Journal of biological chemistry*, 280(14), pp.13483–6.
- Whitehead, S.N. et al., 2012. Membrane raft disruption results in neuritic retraction prior to neuronal death in cortical neurons. *BioScience Trends*, 6(4), pp.183–191.
- Winter, H. et al., 2006. Thyroid hormone receptors TRalpha1 and TRbeta differentially regulate gene expression of Kcnq4 and prestin during final differentiation of outer hair cells. *Journal of cell science*, 119(June), pp.2975–2984.
- Wu, X. et al., 2004. Hearing threshold elevation precedes hair-cell loss in prestin knockout mice. *Brain research. Molecular brain research*, 126(1), pp.30–7.
- Wyles, J.P., McMaster, C.R. & Ridgway, N.D., 2002. Vesicle-associated membrane protein-associated protein-A (VAP-A) interacts with the oxysterol-binding protein to modify export from the endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry*, 277(33), pp.29908–18.
- Yamashita, T. et al., 2012. Normal hearing sensitivity at low-to-middle frequencies with 34% prestin-charge density. *PLoS one*, 7(9), p.e45453.
- Yamashita, T. et al., 2015. Outer Hair Cell Lateral Wall Structure Constrains the Mobility of Plasma Membrane Proteins. *PLoS genetics*, 11(9), p.e1005500.
- Yi, L. & He, D.Z., 2014. The Cochlear Amplifier: Is It Hair Bundle Motion of Outer Hair Cells? *Journal of Otolaryngology*, 9(2), pp.64–72.
- Yu, N. & Zhao, H.B., 2008. Cytoskeleton Mediates Outer Hair Cell Electromotility and Memory Function. In *ARO*. Available at: http://www.aro.org/archives/2008/2008_875_a78083e0.html.
- Yu, P. et al., 2004. D1 dopamine receptor signaling involves caveolin-2 in HEK-293 cells. *Kidney international*, 66(6), pp.2167–80.
- Zhang, M. et al., 2003. ROCK-dependent and ROCK-independent control of cochlear outer hair cell electromotility. *The Journal of biological chemistry*, 278(37), pp.35644–50.
- Zhang, M. & Kalinec, F., 2002. Structural microdomains in the lateral plasma membrane of cochlear outer hair cells. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology : JARO*, 3(3), pp.289–301.
- Zhang, Z. et al., 2007. Accelerated mortality from hydrocephalus and pneumonia in mice with a combined deficiency of SPAG6 and SPAG16L reveals a functional interrelationship between the two central apparatus proteins. *Cell motility and the cytoskeleton*, 64(5), pp.360–376.
- Zheng, J. et al., 2006. Analysis of the Oligomeric Structure of the Motor Protein Prestin. *Journal of Biological Chemistry*, 281(29), pp.19916–19924.
- Zheng, J. et al., 2003. Genomic characterization and expression of mouse prestin, the motor protein of outer hair cells. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society*, 14(2), pp.87–96.
- Zheng, J. et al., 2000. Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature*, 405(6783), pp.149–55.
- Zheng, J. et al., 2001. Prestin topology: localization of protein epitopes in relation to the plasma membrane. *Neuroreport*, 12(9), pp.1929–1935.
- Zine, A., Hafidi, A. & Romand, R., 1995. Fimbrin expression in the developing rat cochlea. *Hearing Research*, 87, pp.165–169.

LEBENS LAUF

VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER

Meine akademischen Lehrer waren die Damen/ Herren in ...

... Greifswald/ Deutschland:

Alberti, Berth, Biebler, Bode, Bröker, Cascorbi, Cieslik, Conrad, Ehlers, Fanghänel, Frank, Franke, Frieling, Giebel, Günther, Gürtler, Hanschke, Hecker, Helbig, Hermann, Herrmann, Hetzheim, Hildebrandt, Hoffmann, Jabs, Jack, Koch, Kramer, Lindequist, Meichsner, Mettenleiter, Meyer-Reil, Miehe, Morgenstern, Möritz, Müller-Motzfeld, Nauck, Panzig, Rettig, Schauer, Schlosser, Schmidt, Schmidt, Schubert, Schüller, Schütt, Seidel, Taschenberger, Thede, Unger, Voelkel, Walther, Wehnert, Wilke, Wulff, Zöllner, Zschiesche

... Marburg/ Deutschland:

Daut, Decher, Eilers, Lutz, Oberwinkler, Oliver

**EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG ÜBER DIE SELBST-
STÄNDIGE ANFERTIGUNG DER DISSERTATION**

DANKSAGUNG
