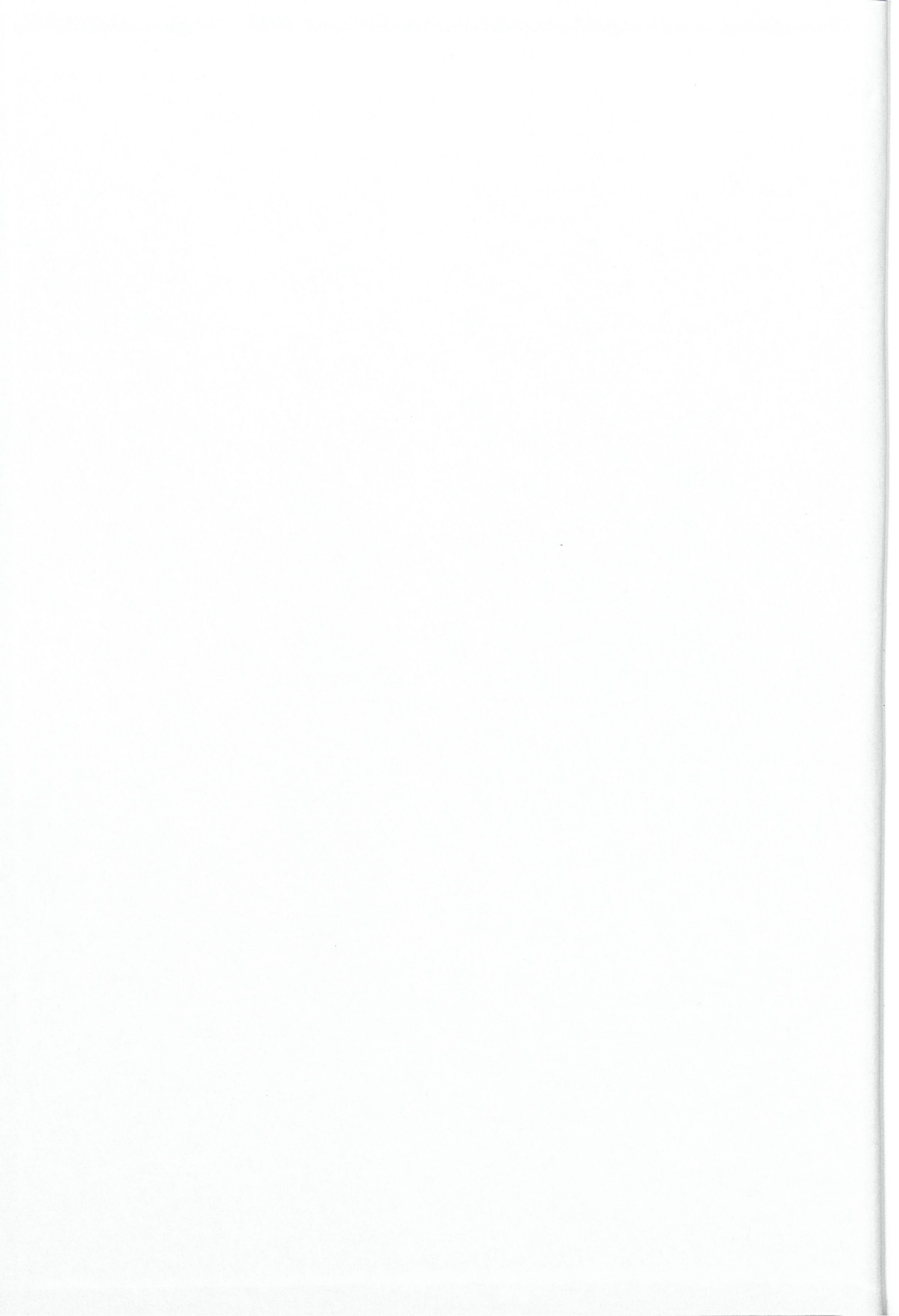




Submolekulare Untersuchung der Interaktion zwischen ClC-7 und Ostm1

Diplomarbeit

eingereicht im Fachbereich Biochemie
der Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald
von

Wagner, Florian

Januar 2010

Erstgutachter: Prof. Dr. J.-P. Hildebrandt

Zweitgutachter /Leiter: Prof. Dr. Dr. T.J. Jentsch

Betreuer: Dr. T. Stauber

Diese Arbeit wurde am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (MDC)
und Forschungsinstitut für molekulare Pharmakologie (FMP) Berlin angefertigt.

Zusammenfassung

Die CLC-Proteine bilden eine Familie von Chloridkanälen und [✓]-transportern, wobei CLC-7 einen Vertreter dieser Familie darstellt. CLC-7, als Cl^-/H^+ -Antiporter, besitzt eine essentielle β -Untereinheit, Ostml, mit welcher er ubiquitär exprimiert auf spät-endosomalen/lysosomalen Kompartimenten, sowie in der *ruffeld border* von knochenabbauenden Osteoklasten lokalisiert ist. CLC-7-^{oder} und Ostml-defiziente Mäuse zeigen einen nahezu identischen pathologischen Phänotyp. So weisen beide Knockoutmäuse einen Kleinwuchs (deformierter Körperbau), einen unterbleibenden Zahndurchbruch, ein graues Fell, eine erhöhte Knochendichte/gestörte Bildung der *ruffeld border* (Osteopetrose), eine Retina- und Neurodegeneration, sowie Ablagerungen von Speichermaterial in Neuronen und renalen proximalen Tubuli auf. Auch beim Menschen führen Mutationen im CLC-7 bzw. Ostml-Gen zu Osteopetrose und lysosomalen Speicherkrankheiten (NCL).

Molekularbiologisch betrachtet ist CLC-7 essentiell für den Transport von Ostml aus dem endoplasmatischen Retikulum zu spät-endosomalen/lysosomalen Vesikeln. In CLC-7-defizienten Mäusen und bei Einzeltransfektion von Ostml-cDNA, verbleibt Ostml hingegen in retikulärer und perinukleärer Verteilung in der Zelle. In dieser Arbeit wurde die subzelluläre Verteilung von Ostml in Abhängigkeit von CLC-7 in Lokalisationsuntersuchungen (mittels transienter Transfektion) von Ostml-Chimären involviert. Dabei konnte durch meine Ergebnisse erstmalig die Transmembrandomäne von Ostml (Val-287 bis His-309) als essentielle Interaktionsdomäne mit CLC-7 identifiziert werden. Außerdem konnten zum Teil auch andere Methoden, wie GST-Pulldown, (Co-)Immunpräzipitation (IP) und Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET)-Analysen, die Ostml-TMD als Interaktionsdomäne bestätigen. Erste vorläufige Daten der Lokalisationsuntersuchungen von Konstrukten mit mutierter Ostml-TMD (partieller Aminosäureaustausch mit Alanin), reduzierten die Ostml-TMD als Interaktionsdomäne auf seine letzten acht Aminosäuren. Die Betrachtung auf Sequenzhomologie der Ostml-TMD verschiedener Spezies ergab, dass nur ein Tyrosin (Tyr-304 in humanem Ostml) in allen Transmembrandomänen konserviert vorliegt, welches möglicherweise die interagierende Aminosäure mit CLC-7 darstellt.

Durch die Auswertung der subzellulären Lokalisation der Ostml-Chimäre ohne CLC-7, konnten zudem Aussagen zum Retentionsverhalten von Wildtyp-Ostml gemacht werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass nicht der C-Terminus, sondern vielmehr der freie, ungebundene N-Terminus die ER-Retention von Ostml verursacht.

Letztendlich wurde von mir eine Methode zur Stabilitätsuntersuchung von CIC-7 entwickelt, welche eine Untersuchung der postulierten Schutzfunktion von Ostml für CIC-7 vor lysosomalen Abbau ermöglicht.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1. Einleitung	1
1.1 Biologische Membranen	1
1.1.1 Allgemeiner Aufbau und Funktionen	1
1.1.2 Ausgewählte Transportsysteme	2
1.2 Die CLC-Familie: Chloridkanäle und -transporter	4
1.2.1 Struktur und Bindungspartner der CLC-Proteine	5
1.2.2 CIC-7 als Vertreter der 3. Gruppe der CLC-Familie	7
1.3 Ostm1- Osteopetrose-assoziiertes Transmembranprotein-1	8
1.4 Zusammenhang zwischen Ostm1 und CIC-7	9
2. Fragestellung	11
3. Ergebnisse	13
3.1 Subzelluläre Lokalisationsuntersuchungen	13
3.1.1 Generierte Ostm1-CD4-Chimäre	14
3.1.2 Subzelluläre Lokalisationsuntersuchungen der Ostm1- CD4-Chimäre	15
3.1.2.1 Subzelluläre Lokalisation von WT-Ostm1 in Abhängigkeit von CIC-7	15
3.1.2.2 Subzelluläre Lokalisation mit Quantifizierung der einzelnen Ostm1-CD4-Chimäre in Ab- und Anwesenheit von CIC-7	17
3.1.2.3 Quantifizierung der Ostm1-CD4-Chimäre bezüglich ihrer retikulären Lokalisation in Abwesenheit von CIC-7	28
3.2 Interaktionsuntersuchungen zwischen Ostm1-CD4-Chimären und CIC-7 mittels Co-Immunopräzipitation, GST-Pulldown und FRET	29
3.2.1 Co-Immunopräzipitation	30
3.2.2 GST-Pulldown	32
3.2.3 FRET-Untersuchungen	34
3.3 Subzelluläre Lokalisation von Ostm1-Tramembrandomän-Mutanten in Ostm1-EGFP und CD4-Ostm1-CD4-EGFP	40
3.4 Stabilitätsuntersuchungen von CIC-7	42
3.4.1 Subzelluläre Lokalisation des Ostm1- Δ NT in Abhängigkeit von CIC-7	44
3.4.2 Stabilität von CIC-7 in Abhängigkeit von Ostm1 und Ostm1- Δ NT	47

4. Diskussion

- 4.1 Die Ostml-Transmembrandomäne als Interaktionsstelle zwischen Ostml und CIC-7
- 4.2 Retentionsverhalten der Ostml-CD4-Chimäre
- 4.3 Stabilität von CIC-7 und Schutzfunktion von Ostml
- 4.5 Ausblick

5. Material und Methoden**5.1 Material**

- 5.1.1 Geräte
 - 5.1.1.1 Allgemeine Laborgeräte
 - 5.1.1.2 Apparaturen
- 5.1.2 Kits und Enzyme
- 5.1.3 Chemikalien, Lösungen und Medien
- 5.1.4 Antikörper
- 5.1.5 Zelllinien
- 5.1.6 Bakterienstämme
- 5.1.7 Mäuse
- 5.1.8 Elektronische Datenverarbeitung und Datenanalyse

5.2 Molekularbiologische Techniken

- 5.2.1 Transformation von *E.coli*
- 5.2.2 Kultivierung von transformierten Bakterien
- 5.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA (Mini- und Midi-Präparation)
- 5.2.4 Konzentrationsbestimmung von DNA
- 5.2.5 Restriktionsverdau und Dephosphorylierung von DNA
- 5.2.6 DNA-Gelelektrophorese
- 5.2.7 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen
- 5.2.8 Ligation
- 5.2.9 Amplifizierung von PCR Fragmenten
- 5.2.10 Rekombinante PCR
- 5.2.11 Isolierung genomischer DNA aus Schwanzbiopsien
- 5.2.12 Genotypisierung von CIC-7 Mäusen mittels PCR

5.3 Biochemische Methoden

- 5.3.1 Herstellung von Proteinlysaten aus Gewebe - Membranpräparation
- 5.3.2 Herstellung von Proteinlysaten aus transfizierten HEK293- bzw. MAF-Zellen
- 5.3.3 Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA)
- 5.3.4 (Co-) Immunpräzipitation
- 5.3.5 GST-Pulldown
- 5.3.6 SDS-Gelelektrophorese
- 5.3.7 Western Blot und Ponceau S-Färbung
- 5.3.8 Immundetektion
- 5.3.9 Strippen von Western Blot Membranen
- 5.3.10 Coomassie-Färbung
- 5.3.11 Stabilitätsassay

5.4 Zellkulturarbeiten	74
5.4.1 Kultur von HeLa-, HEK293- und MAF- Zellen	74
5.4.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	74
5.4.3 Transiente Transfektion	75
5.4.3.1 mit FuGENE6	75
5.4.3.2 mit PEI	75
5.5 Immunzytochemie von Zellkulturen	75
5.5.1 Fixierung mit Paraformaldehyd oder Methanol	75
5.5.2 Immunfluoreszenzen	76
5.5.3 Lokalisationsassay	76
5.5.4 FRET - Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer, Akzeptorbleaching	77
6. Literaturverzeichnis	79
7. Danksagung	91
A Anhang	93
A.1 Plasmidvektoren und DNA-Konstrukte	93
A.2 Oligonukleotide	95

Eidesstattliche Erklärung

Abbildungsverzeichnis

1.1	Modell der Membranstruktur	2
1.2	Die CLC-Familie der Säuger. Lokalisation, Funktion und Erkrankungen.	4
1.3	Topologie und Struktur der eukaryotischen CLC-Proteine	6
1.4	Phänotypen von Ostml- bzw. Clc-7-defizienten Mäusen im Vergleich zur Wildtyp-Maus	10
3.1	Subzelluläre Lokalisation von Ostml in Abhängigkeit von Clc-7.	13
3.2	Topologievergleich von Ostml und CD4	14
3.3	Generierte Ostml-CD4-Chimäre	14
3.4	Vorversuche zur Expression von Ostml und Clc-7	16
3.5	Kontroll-Expression von Clc-7-HA und EGFP in HeLa-Zellen	18
3.6	Subzelluläre Lokalisation von Ostml-EGFP in Abhängigkeit von Clc-7 in HeLa-Zellen	19
3.7	Quantifizierung der Ostml-EGFP-Lokalisation in Abhängigkeit von Clc-7-HA	19
3.8	Subzelluläre Lokalisation von CD4-EGFP in Abhängigkeit von Clc-7 in HeLa-Zellen	20
3.9	Quantifizierung der CD4-EGFP-Lokalisation in Abhängigkeit von Clc-7-HA	20
3.10	Subzelluläre Lokalisation von CD4-Ostml-Ostml-EGFP in Abhängigkeit von Clc-7 in HeLa-Zellen	21
3.11	Quantifizierung der CD4-Ostml-Ostml-EGFP -Lokalisation in Abhängigkeit von Clc-7-HA	21
3.12	Subzelluläre Lokalisation von Ostml-CD4-CD4-EGFP in Abhängigkeit von Clc-7 in HeLa-Zellen	22
3.13	Quantifizierung der Ostml-CD4-CD4-EGFP-Lokalisation in Abhängigkeit von Clc-7-HA	22
3.14	Subzelluläre Lokalisation von Ostml-Ostml-CD4-EGFP in Abhängigkeit von Clc-7 in HeLa-Zellen	23
3.15	Quantifizierung der Ostml-Ostml-CD4-EGFP-Lokalisation in Abhängigkeit von Clc-7-HA	23
3.16	Subzelluläre Lokalisation von CD4-CD4-Ostml-EGFP in Abhängigkeit von Clc-7 in HeLa-Zellen	24
3.17	Quantifizierung der CD4-CD4-Ostml-EGFP-Lokalisation in Abhängigkeit von Clc-7-HA	24
3.18	Subzelluläre Lokalisation von Ostml-CD4-Ostml-EGFP in Abhängigkeit von Clc-7 in HeLa-Zellen	25
3.19	Quantifizierung der Ostml-CD4-Ostml-EGFP-Lokalisation in Abhängigkeit von Clc-7-HA	25

3.20	Subzelluläre Lokalisation von CD4-Ostm1-CD4-EGFP in Abhängigkeit von CIC-7 in HeLa-Zellen.	26
3.21	Quantifizierung der CD4-Ostm1-CD4-EGFP-Lokalisation in Abhängigkeit von CIC-7-HA	26
3.22	Quantifizierung der Ostm1-CD4-Chimäre bzgl. ihrer lysosomalen Lokalisation in Abhängigkeit von CIC-7	28
3.23	Quantifizierung der Ostm1-CD4-Chimäre bzgl. ihrer retikulären Lokalisation in Abwesenheit von CIC-7.	29
3.24	Co-Immunpräzipitation von CIC-7-HA mittels der Ostm1-CD4-Chimäre	31
3.25	GST-Pulldown: CIC-7 Präzipitation mittels Ostm1-CT	32
3.26	GST-Pulldown: CIC-7 Präzipitation mittels Ostm1-CT aus Gehirnllysaten.	33
3.27	Gleichung nach Förster.	34
3.28	<i>In vivo</i> - FRET-Analysen zwischen CIC-7-CFP-Donor und potentiellen YFP-Akzeptor-Konstrukten in HeLa-Zellen	37
3.29	<i>In vivo</i> - FRET-Analysen zwischen CIC-6-CFP-Donor und potentiellen YFP-Akzeptor-Konstrukten, in HeLa-Zellen (Kontrolle)	39
3.30	Zusammenfassung der FRET-Effizienzen zwischen CIC-7-ECFP bzw. CIC-6-ECFP und ausgewählten YFP-Akzeptoren	40
3.31	Klonierungsstrategie für die TMD-Mutanten	41
3.32	Stabilitätsuntersuchung – Modell von CIC-7 und seinen zu untersuchenden Interaktionspartnern	42
3.33	Vergleich der AS-Sequenz von Ostm1- Δ NT und WT-Ostm1	43
3.34	Subzelluläre Lokalisation von Ostm1- Δ NT-EGFP in Abhängigkeit von CIC-7 in HeLa-Zellen	44
3.35	Quantifizierung der Ostm1- Δ NT-EGFP-Lokalisation in Abhängigkeit von CIC-7-HA	45
3.36	Quantifizierung der Ostm1- Δ NT-EGFP-Lokalisation in Abhängigkeit von CIC-7-HA, sowie Betrachtung der ER-Retention von Ostm1- Δ NT-EGFP in Abwesenheit von CIC-7 im Vergleich zu WT-Ostm1	45
3.37	Detektion von Ostm1-EGFP und Ostm1- Δ NT-EGFP mit <i>gl</i> -N3 Antikörpern in HeLa-Zellen	46
3.38	Stabilitätsuntersuchungen von CIC-7 in Abhängigkeit von WT-Ostm1 und Ostm1- Δ NT	47
4.1.	Ostm1-TMD-Alignment ausgewählter Spezies. Tyr-304 als potentielle interagierende AS von Ostm1-TMD mit CIC-7	50
4.2.	Retentionsverhalten von Ostm1	54

Tabellenverzeichnis

3.1	Übersicht – subzelluläre Verteilung der Ostml-CD4-Chimäre in Abhängigkeit von CIC-7	27
5.1	Allgemeine Laborgeräte	59
5.2	Apparaturen	59
5.3	Kits und Enzyme	60
5.4	Chemikalien, Lösungen und Medien	60
5.5	Primärantikörper	62
5.6	Sekundärantikörper	63
5.7	Software für Elektronische Datenverarbeitung und Datenanalyse	64
A.1	Palsmidvektoren und DNA-Konstrukte	93
A.2	Oligonukleotide	93

Abkürzungsverzeichnis

mOstm1	Maus Osteopetrose-assoziiertes Transmembranprotein-1
hCD4	humanes <i>cluster of differentiation 4</i>
u.a.	unter anderem
gl	<i>grey-lethal</i>
sog.	so genannte
s	Sekunde
h	Stunde
ATP	Adenosintriphosphat
cDNA	<i>complementary DNA</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
bzgl.	bezüglich
s.a.	siehe auch
WT	Wildtyp
NeuN	<i>neuron-specific nuclear antigen</i>
KO	Knock out
KI	Knock in
pZahl	postnatal
AS	Aminosäure
CTD	carboxy-terminale Domäne
TMD	Transmembrandomäne
NTD	amino-terminale Domäne
z.T.	zum Teil
n.s.	nicht signifikant
PD	Pulldown
WB	Western Blot
IP	Immunpräzipitation
IF	Immunfluoreszenzfärbung
Kan.	Kaninchen
Mrs.	Meerschweinchen
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
POD	Peroxidase
ROI	<i>region of interest</i>
HA	Hämagglutinin
Bp	Basenpaar
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
HBS	HEPES-buffered saline
kDa	kilo Dalton
LB	Luria Bertani
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
IU/ml	<i>international units per milliliter</i>

1.1	General information	1.1.1	Name
1.2	General information	1.2.1	Address
1.3	General information	1.3.1	Phone
1.4	General information	1.4.1	Age
1.5	General information	1.5.1	Gender
1.6	General information	1.6.1	Marital status
1.7	General information	1.7.1	Education
1.8	General information	1.8.1	Occupation
1.9	General information	1.9.1	Religion
1.10	General information	1.10.1	Political affiliation
1.11	General information	1.11.1	Income
1.12	General information	1.12.1	Assets
1.13	General information	1.13.1	Liabilities
1.14	General information	1.14.1	Net worth
1.15	General information	1.15.1	Health status
1.16	General information	1.16.1	Disability status
1.17	General information	1.17.1	Insurance status
1.18	General information	1.18.1	Investment status
1.19	General information	1.19.1	Charitable contributions
1.20	General information	1.20.1	Other information
2.1	Financial history	2.1.1	Income tax returns
2.2	Financial history	2.2.1	Bank statements
2.3	Financial history	2.3.1	Investment statements
2.4	Financial history	2.4.1	Insurance policies
2.5	Financial history	2.5.1	Charitable contributions
2.6	Financial history	2.6.1	Other financial documents
2.7	Financial history	2.7.1	Financial goals
2.8	Financial history	2.8.1	Financial risks
2.9	Financial history	2.9.1	Financial planning
2.10	Financial history	2.10.1	Financial review
2.11	Financial history	2.11.1	Financial summary
2.12	Financial history	2.12.1	Financial outlook
2.13	Financial history	2.13.1	Financial recommendations
2.14	Financial history	2.14.1	Financial conclusions
2.15	Financial history	2.15.1	Financial appendices
2.16	Financial history	2.16.1	Financial glossary
2.17	Financial history	2.17.1	Financial index
2.18	Financial history	2.18.1	Financial bibliography
2.19	Financial history	2.19.1	Financial references
2.20	Financial history	2.20.1	Financial notes

1. Einleitung

1.1 Biologische Membranen

1.1.1 Allgemeiner Aufbau und Funktionen

Ein dynamischer Zustand lebendiger Systeme zeichnet sich neben der ständigen Erneuerung durch die Erhaltung spezifischer Zusammensetzung aus, so dass ein ständiger intensiver, aber zugleich limitierter Stoff- und Energieaustausch mit der Umgebung gewährleistet sein muss. Um jene Barriere- und Transportfunktion zu erfüllen, bedarf es biologischer Membranen, welche sich auch in der Kompartimentierung der Zelle wieder finden. Die strukturellen Komponenten biologischer Membranen sind dabei Lipide und Proteine, wobei Proteine in ihrer Funktion des Membrantransportes spezifischer sind.

Lipide haben auf Grund ihres hydrophoben und hydrophilen Anteils amphiphile Eigenschaften und können nach Phosphoglyceriden, Sphingolipiden und Cholesterin klassifiziert werden. In wässrigen Lösungen bilden die hydrophoben und hydrophilen Komponenten der Lipide Lipid-Doppelschichten und Mizellen aus, welche durch hydrophobe Interaktion zusammengehalten werden. Lipid-Doppelschichten weisen eine begrenzte Membranpermeabilität auf. So ist es u.a. Blutgasen (CO_2 , N_2 , O_2) und Steroidhormonen erlaubt, die Membran zu passieren, welches zum Beispiel anorganischen Ionen und hydrophilen Makromolekülen untersagt ist. Letztendlich können so Gradienten bezüglich der Stoffkonzentration und Ladungsverteilung aufgestellt werden.

Membranproteine können in periphere und integrale Membranproteine unterschieden werden. Periphere Membranproteine sind der Lipid-Doppelschicht aufgelagert und werden entweder über hydrophobe Wechselwirkung in der Membran verankert oder aber durch nicht-kovalente Bindungen mit der äußern Membranoberfläche über Lipide oder integrale Proteine verbunden. Integrale Membranproteine hingegen durchqueren mit ihrer α -helicalen Transmembrandomäne die Lipid-Doppelschicht. Jener Proteinabschnitt von etwa 19 hauptsächlich hydrophoben Aminosäuren stellt dabei die Interaktion zu Membranlipiden her. Zu den Aufgaben der Membranproteine gehören die Interaktion zwischen Zytoskelett und extrazellulären Matrix, enzymatische Reaktionen, Transportregulationen, Regulation der Permeabilität von an- und organischen Ionen und Signaltransduktion.

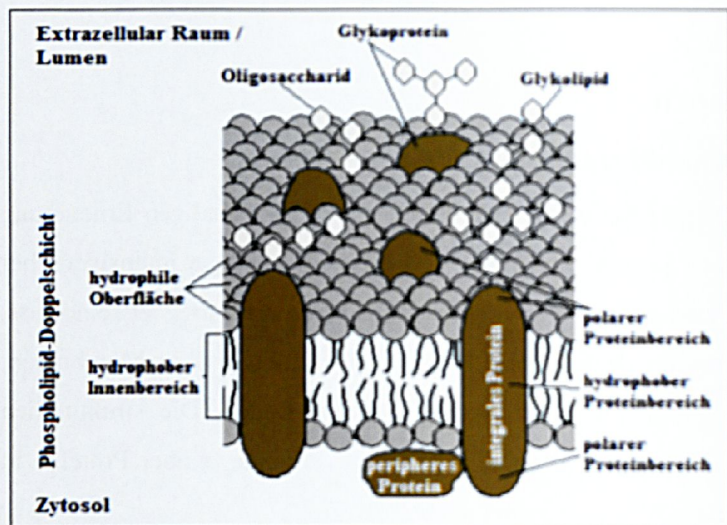


Abbildung 1. Membranstruktur. Die Phospholipid-Doppelschicht ist ausgerichtet mit polaren Köpfen nach außen und innen. Polare Proteine sind integral oder peripher. Polare Lipide sind außerhalb, hydrophobe Lipide innerhalb der Membran. An der Membran sind Lipide zu finden [Lodish, 1996].

Betrachtet man den Aufbau der biologischen Membranen in ihrer Gesamtheit, so besitzen sie eine dynamische Struktur (Flüssig-Mosaik-Modell) und weisen eine unterschiedliche Lipidzusammensetzung der inneren und äußeren Schicht auf. Die damit einhergehende laterale Bewegungsfreiheit, werden durch ungesättigten Fettsäuren und Cholesterin gewährleistet. Proteine und Lipide der abgewandten Schicht der Membran tragen Kohlenhydratgruppen (sog. Glykocalyx) der Zelle u.a. Schutz und Spezifität verleihen. Die wichtigste physiologische Funktion biologischen Membranen ist jedoch wiederum ihre Barriere- und Transportfunktion, die den Energie- und Stoffhaushalt intra- und interzellulär aufrechterhält.

1.1.2 Ausgewählte Transportsysteme

Es sind zahlreiche Transportmechanismen über biologische Membranen bekannt, die in passive (mit dem Konzentrationsgradienten; freie Permeation und katalysierter Transport) und aktive (unter Energieaufwand, primär und sekundär aktiver Transport) Transport unterteilt werden kann. Auch sind Exo- und Endozytose sowie der transepitheliale Transport von Bedeutung. Im Folgenden wird ausschließlich der Ionen- und Molekültransport relevanten Transportmöglichkeiten, die Ionenkanäle, die Ionenpumpen und Transporter eingegangen.

Ionenkanäle sind Translokatorsysteme, welche den Transport von Ionen durch die Membran und Ladung entlang ihrem elektrochemischen Gradienten ermöglichen. Sie sind aus integralen Glykoproteinen zusammengesetzt, durchziehen dementsprechend die Membran.

Doppelschicht und bilden so eine wässrige makromolekulare Membranpore. Ionenkanäle besitzen eine hohe Ionendurchlässigkeitsrate (bis zu 10^7 Ionen pro Sekunde), welche allein durch den elektrochemischen Gradienten angetrieben wird. Zudem besitzen viele Ionenkanäle eine selektive Ionendurchlässigkeit, welche durch spezifische Wechselwirkungen zwischen dem Ion und Proteinseitenketten des Kanals gewährleistet wird. Beim Durchtritt eines Ions durch den Ionenkanal wird seine Hydrathülle mittels des Selektivitätsfilters (Engstelle in Pore) ganz oder teilweise abgestriffen und Übergangsweise an geladene/polare Aminosäurereste („fixed charges“) gebunden. Die Selektivität kann sich dabei auf eine oder mehrere Ionenarten begrenzen. Unter den kationen-permeablen Ionenkanälen ist beispielsweise der Ca^{2+} -Kanal (L-Typ) hochselektiv und der Acetylcholin gesteuerte Kanal (Acetylcholin-Rezeptor) hingegen permeabel für Na^+ , K^+ , Mg^{2+} und Ca^{2+} . Auch Anionen, wie z.B. Chlorid, Phosphate, Carbonate und Glutamate, können über Ionenkanäle transportiert werden. Außerdem können die meisten Ionenkanäle über dessen Öffnung oder Schließung („gating“) reguliert werden. Diese Regulation kann durch Ligandenbindung (ligandengesteuerte Ionenkanäle), Änderung des Membranpotentials (spannungsgesteuerte Ionenkanäle), durch mechanische Membranverformung oder durch den Phosphorylierungszustand erfolgen.

Transport-ATPasen, auch primär aktives Transportsystem genannt, pumpen durch direkte ATP-Hydrolyse Ionen und kleine Moleküle gegen ihren elektrochemischen Gradienten zu ihrem Bestimmungsort. Zu ihnen zählen u.a. die F-, V- und P-ATPasen, wobei F- und V-ATPasen protonentransportierende Enzyme beschreiben (V-ATPasen für die Ansäuerung u.a. von Endosomen, Lysosomen) und die P-ATPasen als Ionenpumpen den Transport verschiedener anorganischer Kationen, darunter H^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} und Mg^{2+} , über intermediäre Phosphorylierung gewährleisten.

Transporter oder sekundäre aktive Transportsysteme kann man als gekoppelte Systeme beschreiben, da sie einen zunächst aufgestellten elektrochemischen Gradienten zum Transport des Partners nutzen. Dabei unterscheidet man Symport (gleichgerichteter Transport) und Antiport (entgegengesetzter Transport). Ein typisches Beispiel für einen Symporter ist der Na^+ -getriebene Glukose-Symport bei der Resorption in Dünndarmepithelzellen der Säugetiere.

Beiden aktiven Transportsystemen ist ihre Spezifität, vermittelt durch mobile Carrier, und Selektivität mit spezifischer Hemmbarkeit und einer Sättigungskinetik gemeinsam.

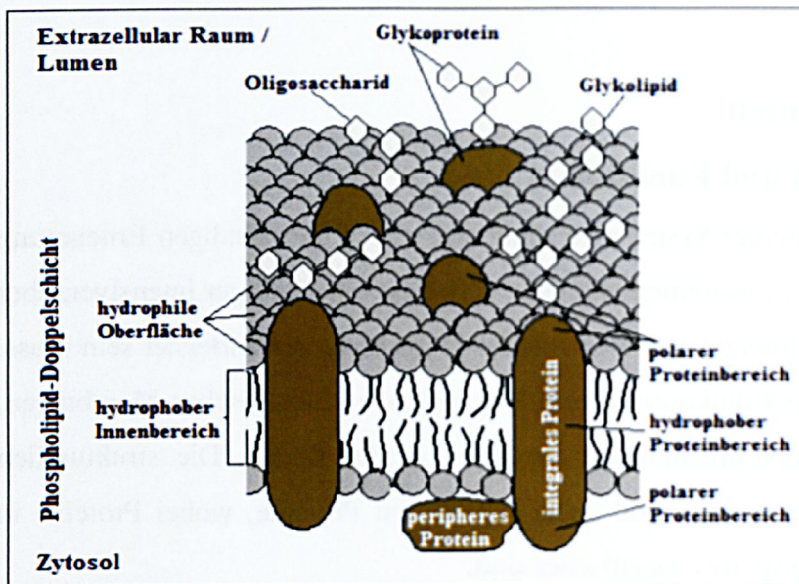


Abbildung 1.1: **Modell** der Membranstruktur. Die Doppelschicht besteht aus ausgerichteten Phospholipiden mit peripheren und integralen Proteinen. Polare Bereiche der integralen Proteine liegen außerhalb, hydrophobe hingegen innerhalb der Lipid-Doppelschicht. An der Außenseite der Membran sind Glykoproteine und -lipide zu finden. Modifiziert nach [Lodish, 1996].

Betrachtet man den Aufbau der biologischen Membranen in ihrer Gesamtheit (Abb. 1.1), so besitzen sie eine dynamische Struktur (Flüssig-Mosaik-Modell) und weisen zugleich eine unterschiedliche Lipidzusammensetzung der inneren und äußeren Schicht auf. Die Fluidität, und die damit einhergehende laterale Bewegungsfreiheit, werden durch den Anteil von ungesättigten Fettsäuren und Cholesterin gewährleistet. Proteine und Lipide dem Zytoplasma abgewandten Schicht der Membran tragen Kohlenhydratgruppen (sog. Glykokalyx), welche der Zelle u.a. Schutz und Spezifität verleihen. Die wichtigste physiologische Aufgabe der biologischen Membranen ist jedoch wiederum ihre Barriere- und Transportfunktion, welche den Energie- und Stoffhaushalt intra- und interzellulär aufrechterhält.

1.1.2 Ausgewählte Transportsysteme

Es sind zahlreiche Transportmechanismen über biologische Membranen bekannt, welche man in passive (mit dem Konzentrationsgradienten; freie Permeation und katalysierte Diffusion) und aktive (unter Energieaufwand, primär und sekundär aktiver Transport) Transportvorgänge unterscheiden kann. Auch sind Exo- und Endozytose sowie der transepitheliale Transport für die Stoff- und Energiebilanz von Bedeutung. Im Folgenden wird ausschließlich auf die für den Iontentransport relevanten Transportmöglichkeiten, die Ionenkanäle, die ATPasen und die Transporter eingegangen.

Ionenkanäle sind Translokator-Systeme, welche den Transport von Ionen bestimmter Größe und Ladung entlang ihrem elektrochemischen Gradienten ermöglichen. Sie sind aus integralen Glykoproteinen zusammengesetzt, durchziehen dementsprechend die Lipid-

Doppelschicht und bilden so eine wässrige makromolekulare Membranpore. Ionenkanäle besitzen eine hohe Ionendurchlässigkeitsrate (bis zu 10^7 Ionen pro Sekunde), welche allein durch den elektrochemischen Gradienten angetrieben wird. Zudem besitzen viele Ionenkanäle eine selektive Ionendurchlässigkeit, welche durch spezifische Wechselwirkungen zwischen dem Ion und Proteinseitenketten des Kanals gewährleistet wird. Beim Durchtritt eines Ions durch den Ionenkanal wird seine Hydrathülle mittels des Selektivitätsfilters (Engstelle in Pore) ganz oder teilweise abgestriffen und Übergangsweise an geladene/polare Aminosäurereste („fixed charges“) gebunden. Die Selektivität kann sich dabei auf eine oder mehrere Ionenarten begrenzen. Unter den kationen-permeablen Ionenkanälen ist beispielsweise der Ca^{2+} -Kanal (L-Typ) hochselektiv und der Acetylcholin gesteuerte Kanal (Acetylcholin-Rezeptor) hingegen permeable für Na^+ , K^+ , Mg^{2+} und Ca^{2+} . Auch Anionen, wie z.B. Chlorid, Phosphate, Carbonate und Glutamate, können über Ionenkanäle transportiert werden. Außerdem können die meisten Ionenkanäle über dessen Öffnung oder Schließung („gating“) reguliert werden. Diese Regulation kann durch Ligandenbindung (ligandengesteuerte Ionenkanäle), Änderung des Membranpotentials (spannungsgesteuerte Ionenkanäle), durch mechanische Membranverformung oder durch den Phosphorylierungszustand erfolgen.

Transport-ATPasen, auch primär aktives Transportsystem genannt, pumpen durch direkte ATP-Hydrolyse Ionen und kleine Moleküle gegen ihren elektrochemischen Gradienten zu ihrem Bestimmungsort. Zu ihnen zählen u.a. die F-, V- und P-ATPasen, wobei F- und V-ATPasen protonentransportierende Enzyme beschreiben (V-ATPasen für die Ansäuerung u.a. von Endosomen, Lysosomen) und die P-ATPasen als Ionenpumpen den Transport verschiedener anorganischer Kationen, darunter H^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} und Mg^{2+} , über intermediäre Phosphorylierung gewährleisten.

Transporter oder sekundäre aktive Transportsysteme kann man als gekoppelte Systeme beschreiben, da sie einen zunächst aufgestellten elektrochemischen Gradienten zum Transport des Partners nutzen. Dabei unterscheidet man Symport (gleichgerichteter Transport) und Antiport (entgegengesetzter Transport). Ein typisches Beispiel für einen Symporter ist der Na^+ -getriebene Glukose-Symport bei der Resorption in Dünndarmepithelzellen der Säugetiere.

Beiden aktiven Transportsystemen ist ihre Spezifität, vermittelt durch mobile Carrier, und Selektivität mit spezifischer Hemmbarkeit und einer Sättigungskinetik gemeinsam.

1.2 Die CLC-Familie: Chloridkanäle und -transporter

Die Familie der CLC-Proteine ist evolutionär hoch konserviert und seine Vertreter finden sich als Kanäle und Transporter in nahezu allen Organismen wieder ([Jentsch, 2008], [Zifarelli und Pusch, 2007]). Dabei wurden sie an Hand von Homologie-Untersuchungen, zum ersten gefundenen und klonierten Vertreter, dem CIC-0 aus *Torpedo marmorata*, identifiziert [Jentsch *et al.*, 1990]. In Säugetieren gibt es neun Mitglieder, welche sich aufgrund ihrer Sequenzhomologie in drei Unterfamilien gliedern lassen [Jentsch *et al.*, 2002] (Abb. 1.2).

		Expression	zelluläre Verteilung	Funktion	humane Erkrankungen	Mausmodell
Cl ⁻ -Kanal	CIC-1	Skelettmuskulatur	Zytoplasmamembran	Stabilisierung des Membranpotentials transepithelialer	Myotonia congenita	Myotonia congenita (ad. Maus)
	CIC-2	weit verbreitet	Zytoplasmamembran	Transport, Extrazelluläre Ionenhomöostase		Degeneration von Retina und Hoden, Leukodystrophie
	CIC-Ka	Niere, Ohr	Zytoplasmamembran	transepithelialer Transport	Bartter Syndrom IV	Diabetes insipidus
	CIC-Kb	Niere, Ohr	Zytoplasmamembran	transepithelialer Transport	Bartter Syndrom III und IV	
Cl ⁻ /H ⁺ -Austauscher	CIC-3	weit verbreitet (Gehirn, Niere, Leber...)	synaptische Vesikel/ frühe und späte Endosomen	Azidifizierung von synapt. Vesikeln, Endosomen		Degeneration von Retina und Hippocampus
	CIC-4	weit verbreitet (Gehirn, Niere, Muskulatur...)	Endosomen	Azidifizierung von Endosomen		
	CIC-5	Niere, Darm	frühe Endosomen	Azidifizierung von Endosomen	Deutsche Erkrankung	Defekt in renaler Endozytose
	CIC-6	Nervensystem	späte Endosomen	Azidifizierung von späten Endosomen		lysosomale Speicherkrankheit (NCL)
	CIC-7	weit verbreitet	späte Endosomen/ Lysosomen	Azidifizierung der Resorptionslaktone, Regulation von lysosomalem Cl ⁻	Osteopetrose, Retinadegeneration, NCL	Osteopetrose, Retinadegeneration, NCL

Abbildung 1.2: Die CLC-Familie der Säuger. Lokalisation, Funktion und Erkrankungen. Illustriert sind neun Säuger-CLC-Proteine mit Expression, subzellulärer Verteilung, Funktion und Pathologie in Mensch und Maus. Die Mitglieder der CLC-Familie lassen sich aufgrund der Sequenzhomologie in drei Gruppen einteilen, wobei die Vertreter der ersten Gruppe in der Zytoplasmamembran und die anderen auf intrazellulären Vesikeln des endo-lysosomalen Transportweges lokalisiert sind. Außerdem handelt es sich bei den vesikulären Proteinen um Cl⁻/H⁺-Antiporter (z.T. postuliert), und bei in der Zytoplasmamembran lokalisierten um Kanäle.

Der ersten Gruppe sind CIC-1, -2, -Ka und -Kb zugeordnet, welche in der Plasmamembran lokalisiert sind und als echte Chloridkanäle fungieren. Unter anderem sind sie beteiligt an der Regulation des pH-Wertes im Extrazellularraum (CIC-2 nach [Jordt und Jentsch, 1997]) und der Stabilisierung des Ruhepotentials in der Skelettmuskulatur (CIC-1 nach [Steinmeyer *et al.*, 1991a], [Rüdel und Lehman Horn 1985]) und am transepithelialen Transport (CIC-Ka nach [Estévez *et al.*, 2001] und CIC-Kb/Barttin nach [Uchida *et al.*, 1995], [Vandewalle *et al.*, 1997]) (Abb. 1.2).

Die anderen Mitglieder der CLC-Familie hingegen sind vornehmlich auf intrazellulären Vesikeln lokalisiert und bilden die zweite (mit CIC-3, CIC-4, CIC-5) bzw. dritte (mit CIC-6, CIC-7) Gruppe.

und CIC-7) Unterfamilie. Dabei scheinen alle intrazellulären CLC-Transporter durch ihren Chlorid-Transport an der Aufrechterhaltung der V-ATPase induzierten luminalen Ansäuerung beteiligt zu sein ([Faundez und Hartzell, 2004], [Jentsch, 2007]). Erstmals konnte bei ecCIC-1 aus *Escherichia coli* ein Antiportermechanismus zwischen Protonen und Chlorid-Ionen gezeigt werden [Accardi und Miller, 2004], welcher sich anschließend auch bei den Vertretern der Säuger-CLCs CIC-4 und CIC-5 (zweite Unterfamilie) nachweisen ließ ([Scheel *et al.*, 2005], [Picollo und Pusch, 2005]). Da beide intrazellulären CLC-Transporter ein 'gating'- und ein 'proton'-Glutamat besitzen, wobei letzteres bei den CLC-Kanälen fehlt, wird für CIC-3, sowie CIC-6 und CIC-7 auch von einem H^+/Cl^- -Antiportermechanismus ausgegangen [Jentsch *et al.* 2007], welcher 2008 für CIC-7 bestätigt werden konnte [Graves *et al.*, 2008] (Abb. 1.2).

Die physiologische Relevanz der CLC-Familie spiegelt sich in humanen Erkrankungen und Mausmodellen mit mutierten oder fehlenden ('knock out') CLC-Proteinen wider (Abb. 1.2). Bei Mutationen der entsprechenden CLCs treten Krankheiten wie Mytonia congetina (bei CIC-1 [Steinmeyer *et al.*, 1991b], [Koch *et al.*, 1992]), Bartter Syndrom (bei beiden CIC-Ks [Birkenhäger *et al.*, 2001], [Nozu *et al.*, 2008], [Schlingmann *et al.*, 2004]), das Bartter Syndrom Type III (bei CIC-Kb [Simon *et al.*, 1997]), Diabetes insipidus (bei CIC-Ka [Matsumura *et al.*, 1999]), die Dent'sche Erkrankung (bei CIC-6 [Lloyd *et al.*, 1997]) und Osteopetrose (bei CIC-7 [Kornak *et al.*, 2001]) auf (Abb. 1.2).

1.2.1 Struktur und Bindungspartner der CLC-Proteine

Mit Hilfe von Kristallstrukturanalysen prokaryotischer CLC-Proteine ([Dutzler *et al.*, 2002], [Dutzler *et al.*, 2003]), aber auch elektrophysiologischer und biochemischer Untersuchungen ([Jentsch *et al.*, 1990], [Ludewig *et al.*, 1996]) konnte die Struktur von CLC-Proteinen aufgedeckt werden. Ein funktionaler CLC-Kanal bzw. -Transporter setzt sich aus zwei identischen Untereinheiten zu einem rhombus-ähnlichen (Aufsicht) Proteindimer zusammen. Eine Untereinheit besteht dabei aus 18 α -Helices (A-R), von denen 17 im Transmembranbereich (B-R) liegen, jedoch nicht alle die Membran vollständig durchqueren. Die N- und C-Termini liegen dabei zytosolisch vor. Beide Untereinheiten liegen an den Transmembranbereichen in Kontakt, bilden aber je eine separate Pore (Abb. 1.3).

Transmembranproteinen-1 (Lamp-1) lokalisiert vor [Kornak *et al.*, 2001]. Auch in der *ruffled border* von knochenabbauenden Osteoklasten konnte CIC-7 nachgewiesen werden [Kornak *et al.*, 2001]. Da für CIC-7 aufgrund des Vorhandenseins eines 'proton-glutamates' ein Cl/H Antiportermechanismus vermutet [Jentsch, 2007] und gezeigt werden konnte [Graves *et al.* 2008], und CIC-7 lysosomal bzw. in der *ruffled border* der Resorptionslakune zusammen mit der vakuolären H⁺-ATPase vorliegt, scheint deren Zusammenspiel für die Ansäuerung und damit einhergehendem extrazellulären Knochenabbau verantwortlich zu sein. Die Überlegungen konnten bei CIC-7-Knockout-Tieren durch einen Ansäuerungsdefekt sowie Unterentwicklung der Resorptionslakune bewiesen werden [Kornak *et al.*, 2001], jedoch konnte auch ein Ansäuerungsdefekt bei lysosomalen pH-Untersuchungen in CIC-7-defizienten Zellen ausgeschlossen werden [Kasper *et al.*, 2005].

Im Vergleich zu den anderen CLC-Proteinen weist CIC-7 als einziges keine N-Glykosylierungen auf, so dass es ohne spezifischen Schutz schnell durch lysosomale Enzyme degradiert werden könnte ([Fukuda, 1991], [Eskelinen *et al.*, 2003]). Jener Aspekt stützt die in Kapitel 1.3. postulierte Schutzfunktion des hoch glykosylierten Ostml für CIC-7.

Bis heute ist der Mechanismus des CIC-7-Transportes zum Lysosomen noch unklar, wenngleich CIC-7 eine Reihe von Sequenzmotiven aufweist, welche einen Transport zum Lysosomen realisieren könnten [Offe, 2005] (mögliche Redundanz identifiziert durch Sortierungssignale). Es wird aber angenommen, dass CIC-7 wie andere beschriebene Proteine mittels Adapterkomplexen das Lysosomen erreicht [Robinson und Bonifacio *et al.* 2001]. Charakteristische Phänotypen bzw. Erkrankungen von CIC-7-defizienten Mäusen werden in Kapitel 1.4 zusammen mit Ostml betrachtet.

1.3 Ostml-Osteopetrose-assoziiertes Transmembranprotein-1

Die spontane Mausmutante *grey-lethal* als Osteopetrosemodell schon bekannt war [Grünerberg, 1936], wurde erst 2003 das *grey-lethal* (gl) Osteopetrose-Gen identifiziert und das entsprechend kodierte Protein Ostml charakterisiert ([Chalhoub *et al.*, 2003], [Fischer *et al.*, 2003]). 2006 wurden die in Kapitel 1.3. postulierte Daten des Ostml durch neue Studien ergänzt und der Zusammenhang zwischen Ostml und CIC-7 erstmalig beschrieben [Lange *et al.* 2006]. Dabei war wohl die Erkenntnis, dass Ostml als essentielle β -Untereinheit von CIC-7 die interessanteste Entdeckung [Lange *et al.*, 2006]. Zudem Topologieuntersuchungen, dass Ostml ein mit 10 putativen Glykosylierungsstellen versehenes Transmembranprotein ist, und die Lokalisation des C-Terminus (in Maus und Mensch) hochgradig glykosyliertes Typ-1-Transmembranprotein zu sein.

welches spät endosomal/lysosomal in der Zelle lokalisiert. Auch wurde eine Lokalisation von Ostm-1 in der *ruffled border* von Osteoklasten beschrieben. Lokalisationsuntersuchungen mit Ostm1- und CIC-7-spezifischen Antikörpern sowie Immunpräzipitationen beweisen die Interaktion von Ostm1 und CIC-7 *in vivo* bzw. *in vitro*. Auch konnte ein Retentionsverhalten von Ostm1 im endoplasmatischen Retikulum (ER) in CIC-7-defizienten Mäusen und bei Einzeltransfektion von Ostm1-cDNA festgestellt werden, welches eine Interaktion beider schon im ER voraussetzt. Folglich wird deutlich das CIC-7 für den Transport von Ostm1 zu den Lysosomen essentiell ist [Lange *et al.*, 2006].

Des Weiteren konnte Ostm1 erstmalig ein möglicher funktioneller Mechanismus, die Stabilisierung von endogenen CIC-7, zugeordnet werden, da in Ostm1-defizienten *gl*-Mäusen die CIC-7-Proteinmenge auf weniger als 10% des Wildtypniveaus reduziert vorlag.

Prozessierungsuntersuchungen erwiesen eine Spaltung von Ostm1 auf dem Weg zum Lysosomen [Lange *et al.*, 2006], als die postulierte Rolle des möglicherweise sekretierten N-Terminus (Glykopeptid) als Botenstoff zur Aktivierung von Signalkaskaden im Wnt/ β -Catenin-Signalwege stützen würde [Feigin *et al.*, 2008].

Charakteristische Phänotypen bzw. Erkrankungen von Ostm1-defizienten Mäusen werden in Kapitel 1.4 zusammen mit CIC-7 betrachtet.

1.4 Zusammenhang zwischen Ostm1 und CIC-7

In bisher analysierten Geweben konnte bei vorhandener CIC-7 Expression auch eine Expression seiner β -Untereinheit Osm1 detektiert werden ([Brandt und Jentsch, 1995] sowie [Chalhoub *et al.*, 2003], [Fischer *et al.*, 2003], [Lange *et al.*, 2006]). Auch konnte *in vivo* die Colokalisation von Ostm1 und CIC-7 in spät-endosomalen/lysosomalen Kompartimenten nachgewiesen werden [Lange *et al.*, 2006]. In Betrachtung der Notwendigkeit von CIC-7 zur Ansäuerung von späten Endosomen/Lysosomen sowie der Resorptionslakune und der postulierten Funktion von Ostm1 als Schutz des CIC-7 vor lysosomalen Abbau, erklären sich die identischen Phänotypen der Ostm1- bzw. CIC-7-defizienten Mäuse (ausgewählte Beispiele in Abb. 1.4). Charakteristische pathologische Phänotypen sind dabei Kleinwuchs (deformierter Körperbau), unterbleibender Zahndurchbruch, graues Fell im Agouti-Hintergrund, erhöhte Knochendichte/gestörte Bildung der *ruffled border* (Osteopetrose), Retina- und Neurodegeneration, sowie Ablagerungen von Speichermaterial in Neuronen und renalen proximalen Tubuli ([Kornak *et al.*, 2001], [Chalhoub *et al.*, 2003], [Kasper *et al.*, 2005], [Lange *et al.*, 2006]).

Transmembranproteinen-1 (Lamp-1) lokalisiert vor [Kornak *et al.*, 2001]. Auch in der *ruffled border* von knochenabbauenden Osteoklasten konnte CIC-7 nachgewiesen werden [Kornak *et al.*, 2001]. Da für CIC-7 aufgrund des Vorhandenseins eines 'proton-glutamates' ein Cl^-/H^+ -Antiportermechanismus vermutet [Jentsch, 2007] und gezeigt werden konnte [Graves *et al.*, 2008], und CIC-7 lysosomal bzw. in der *ruffled border* der Resorptionslakune zusammen mit der vakuolären H^+ -ATPase vorliegt, scheint deren Zusammenspiel für die Ansäuerung und den damit einhergehendem extrazellulären Knochenabbau verantwortlich zu sein. Diese Überlegungen konnten bei CIC-7-Knockout-Tieren durch einen Ansäuerungsdefekt sowie Unterentwicklung der Resorptionslakune bewiesen werden [Kornak *et al.*, 2001], jedoch konnte auch ein Ansäuerungsdefekt bei lysosomalen pH-Untersuchungen in CIC-7-defizienten Zellen ausgeschlossen werden [Kasper *et al.*, 2005].

Im Vergleich zu den anderen CLC-Proteinen weist CIC-7 als einziges keine N-Glykosylierungen auf, so dass es ohne spezifischen Schutz schnell durch lysosomale Enzyme degradiert werden könnte ([Fukuda, 1991], [Eskelinen *et al.*, 2003]). Jener Aspekt stützt die in Kapitel 1.3. postulierte Schutzfunktion des hoch glykosylierten Ostml für CIC-7.

Bis heute ist der Mechanismus des CIC-7-Transportes zum Lysosomen noch unklar, wenngleich CIC-7 eine Reihe von Sequenzmotiven aufweist, welche einen Transport zum Lysosomen realisieren könnten [Offe, 2005] mögliche Redundanz identifizierter Sortierungssignale). Es wird aber angenommen, dass CIC-7 wie andere beschriebene Proteine mittels Adapterkomplexen das Lysosomen erreicht [Robinson und Bonifacino *et al.*, 2001]. Charakteristische Phänotypen bzw. Erkrankungen von CIC-7-defizienten Mäusen werden in Kapitel 1.4 zusammen mit Ostml betrachtet.

1.3 Ostml- Osteopetrose-assoziiertes Transmembranprotein-1

Obwohl die spontane Mausmutante *grey-lethal* als Osteopetrosemodell schon seit 1936 bekannt war [Grünerberg, 1936], wurde erst 2003 das *grey-lethal (gl)* Gen als Osteopetroselokus identifiziert und das entsprechend kodierte Protein Ostml erstmalig charakterisiert ([Chalhoub *et al.*, 2003], [Fischer *et al.*, 2003]). 2006 wurden die vorläufigen bzw. postulierten Daten des Ostml durch neue Studien ergänzt und der Zusammenhang zwischen Ostml und CIC-7 erstmalig beschrieben [Lange *et al.*, 2006].

Dabei war wohl die Erkenntnis, dass Ostml als essentielle β -Untereinheit von CIC-7 fungiert, die interessanteste Entdeckung [Lange *et al.*, 2006]. Zudem zeigen Topologieuntersuchungen, dass Ostml ein mit 10 putativen Glykosylierungsstellen im N-Terminus (in Maus und Mensch) hochgradig glykosyliertes Typ-1-Transmembranprotein ist.

welches spät endosomal/lysosomal in der Zelle lokalisiert. Auch wurde eine Lokalisation von Ostm-1 in der *ruffeld border* von Osteoklasten beschrieben. Lokalisationsuntersuchungen mit Ostm1- und ClC-7-spezifischen Antikörpern sowie Immunpräzipitationen beweisen die Interaktion von Ostm1 und ClC-7 *in vivo* bzw. *in vitro*. Auch konnte ein Retentionsverhalten von Ostm1 im endoplasmatischen Retikulum (ER) in ClC-7-defizienten Mäusen und bei Einzeltransfektion von Ostm1-cDNA festgestellt werden, welches eine Interaktion beider schon im ER voraussetzt. Folglich wird deutlich das ClC-7 für den Transport von Ostm1 zu den Lysosomen essentiell ist [Lange *et al.*, 2006].

Des Weiteren konnte Ostm1 erstmalig ein möglicher funktioneller Mechanismus, die Stabilisierung von endogenen ClC-7, zugeordnet werden, da in Ostm1-defizienten *gl*-Mäusen die ClC-7-Proteinmenge auf weniger als 10% des Wildtypniveaus reduziert vorlag.

Prozessierungsuntersuchungen erwiesen eine Spaltung von Ostm1 auf dem Weg zum Lysosomen [Lange *et al.*, 2006], als die postulierte Rolle des möglicherweise sekretierten N-Terminus (Glykopeptid) als Botenstoff zur Aktivierung von Signalkaskaden im Wnt/ β -Catenin-Signalwege stützen würde [Feigin *et al.*, 2008].

Charakteristische Phänotypen bzw. Erkrankungen von Ostm1-defizienten Mäusen werden in Kapitel 1.4 zusammen mit ClC-7 betrachtet.

1.4 Zusammenhang zwischen Ostm1 und ClC-7

In bisher analysierten Geweben konnte bei vorhandener ClC-7 Expression auch eine Expression seiner β -Untereinheit Osm1 detektiert werden ([Brandt und Jentsch, 1995] sowie [Chalhoub *et al.*, 2003], [Fischer *et al.*, 2003], [Lange *et al.*, 2006]). Auch konnte *in vivo* die Colokalisation von Ostm1 und ClC-7 in spät-endosomalen/lysosomalen Kompartimenten nachgewiesen werden [Lange *et al.*, 2006]. In Betrachtung der Notwendigkeit von ClC-7 zur Ansäuerung von späten Endosomen/Lysosomen sowie der Resorptionslakune und der postulierten Funktion von Ostm1 als Schutz des ClC-7 vor lysosomalen Abbau, erklären sich die identischen Phänotypen der Ostm1- bzw. ClC-7-defizienten Mäuse (ausgewählte Beispiele in Abb. 1.4). Charakteristische pathologische Phänotypen sind dabei Kleinwuchs (deformierter Körperbau), unterbleibender Zahndurchbruch, graues Fell im Agouti-Hintergrund, erhöhte Knochendichte/gestörte Bildung der *ruffeld border* (Osteopetrose), Retina- und Neurodegeneration, sowie Ablagerungen von Speichermaterial in Neuronen und renalen proximalen Tubuli ([Kornak *et al.*, 2001], [Chalhoub *et al.*, 2003], [Kasper *et al.*, 2005], [Lange *et al.*, 2006]).

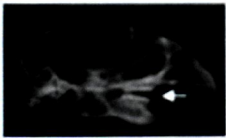
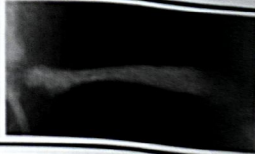
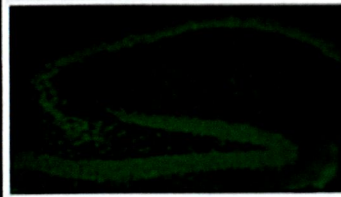
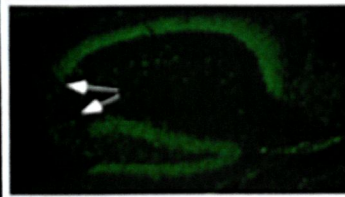
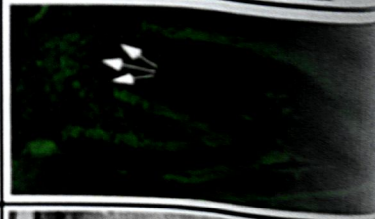
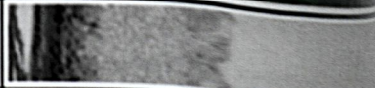
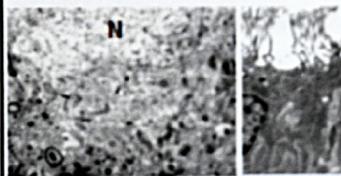
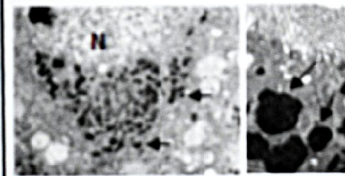
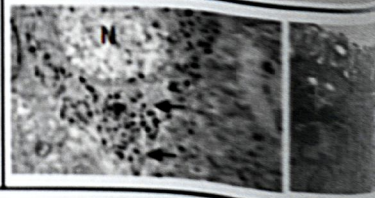
	Wildtyp Maus (<i>Clcn7^{+/+}, Ostm1^{+/+}</i>)	CIC-7-defiziente Maus (<i>Clcn7^{-/-}</i>)	Ostm1-defiziente Maus (<i>Ostm1^{-/-}</i>)
Osteopetrose/ Zahnlosigkeit			
Neurodegeneration im Hippocampus			
Retinadegeneration			
Speichermaterial in Lysosomen von Neuronen und Zellen des renalen proximalen Tubulus			

Abbildung 1.4: Phänotypen von Ostm1- bzw. CIC-7-defizienten Mäusen im Vergleich zur Wildtyp Maus 1. Reihe: Zuordnung der Genotypen. 2. Reihe/ Osteopetrose und Zahnlosigkeit: *Clcn7^{-/-}*-Tiere weisen im Vergleich zu WT-Tieren in der Van-Kossa-Färbung der Tibia (kalzifiziertes Material schwarz) eine erhöhte Knochendichte sowie einem Verlust des Markraumes auf (Osteopetrose-Phänotyp). Auch *Ostm1^{-/-}*-Tiere zeigen eine Erhöhung der Knochendichte in der Röntgenaufnahme der Tibia. Zudem sind die Ostm1- bzw. CIC-7-defizienten Mäuse zahnlos (unterbleibenden Zahndurchbruch). Hier nur gezeigt für *Clcn7^{-/-}*-Tiere im Vergleich (Pfeile). 3. Reihe/ Neurodegeneration: NeuN-Färbung (Neuron-specific Nuclear Protein) in hippocampalen Schnitten. *gl-* (p47) und CIC-7-KO-Tiere (p30) haben v.a. in der CA3-Region des Hippocampus (Pfeile) einen deutlichen Verlust von NeuN-positiven Neuronen im Vergleich zur WT-Maus (p47). 4. Reihe/ Retinadegeneration: Methylenblau gefärbte Semidünnschnitte. Reduzierte Photoschicht sowie innere Kernschicht der defizienten Mäuse. 5. Reihe/ Speichermaterial in Lysosomen von Neuronen und Zellen des renalen proximalen Tubulus: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von kortikalen Neuronen (links) und Zellen des proximalen Nierentubulus (rechts). In den *gl-* und CIC-7-KO-Tieren zeichnen sich Akkumulationen von elektronendichtem Speichermaterial in beiden betrachteten gewebspezifischen Zelltypen ab (Pfeile), p30-44. N, Nukleus. (ausgewählte Abbildungen aus [Kornak et al., 2001], [Kasper et al., 2005], [Lange et al., 2006])

Es konnte gezeigt werden, dass schon bei dominant-negativer Mutation des CIC-7s im heterozygoten Zustand, mit einer einhergehenden Funktionsreduktion des CIC-7-Proteins um etwa 25%, ein starker (Osteopetrose-) Phänotyp besteht [Kornak et al., 2001], welcher einen möglichen Ostm1-spezifischen Phänotyp in *gl*-Mäusen, mit weniger als 10% der CIC-7 Proteinmenge, überdecken könnte. Folglich könnte also die Reduktion bzw. das Ausbleiben des CIC-7s auf Proteinebene für beide identische Phänotypen der Ostm1- bzw. CIC-7-defizienten Mäuse verantwortlich sein.

Jüngste Ergebnisse bestätigen das enge Zusammenspiel von CIC-7 und Ostm1, da eine Ko-Regulierung der Transkription beider Gene (*Clcn7* und *Ostm1*) in Osteoklasten durch denselben Transkriptionsfaktor, Microphthalmia, gezeigt werden konnte [Meadows et al., 2007].

2. Fragestellung

Nachdem Ostml als essentielle β -Untereinheit von CIC-7 identifiziert wurde [Lange et al. 2006], soll nun im Rahmen dieser Arbeit die submolekulare Interaktion zwischen CIC-7 und Ostml untersucht werden. Dabei sollen zunächst Chimäre von Ostml generiert werden, welche eine Untersuchung der Interaktion zwischen beiden Proteinen auf einzelne Domänen bis hin zu Aminosäuren von Ostml begrenzt. Anschließende Lokalisations- und Interaktionsuntersuchungen sollen letztendlich Aufschluss über die für die Interaktion zwischen Ostml und CIC-7 essentiellen Aminosäuren geben. Zudem sollte die Methode des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) für Ostml und CIC-7 als andere Darstellungsmöglichkeit zum Interaktionsverhalten etabliert werden.

Aufgrund der enormen Reduktion von CIC-7 in Ostml-defizienten *gl*-Mäusen [Lange et al., 2006], ist eine mögliche Schutzfunktion von Ostml für CIC-7 denkbar, welche in dieser Arbeit ebenso auf molekularer Ebene betrachtet werden soll.



Abbildung 1: Submolekulare Lokalisation von Ostml in Abhängigkeit von CIC-7.

Schematische Darstellung a. CIC-7 (grün) in Verbindung mit Ostml (rot) in der Zelle. b. CIC-7 (grün) in Verbindung mit Ostml (rot) in der Zelle. Die Abbildung ist in zwei Teile unterteilt: 'a' und 'b'. Teil 'a' zeigt die Lokalisation von Ostml in Abhängigkeit von CIC-7. Teil 'b' zeigt die Lokalisation von Ostml in Abhängigkeit von CIC-7.

PM: Plasmamembran, ME: Mitochondrien, Golgi: Golgi-Apparat, Lys: Lysosom, TGN: Trans-Golgi-Netzwerk, ERN: Endoplasmatisches Retikulum, ER: Endoplasmatisches Retikulum.

3. Ergebnisse

Der folgende Ergebnisteil repräsentiert die Resultate meiner im Rahmen der Diplomarbeit verfassten Fragestellungen. Der erste Teil beschäftigt sich zunächst eingehend mit der Generierung der Ostml-Chimäre, welche die Grundlage für die folgend durchgeführten Lokalisations- und Interaktionsuntersuchungen zwischen CIC-7 und Ostml bzw. dessen Chimären darstellen. Außerdem wurden schon veröffentlichte und bzgl. meiner Fragestellung relevante Untersuchungsergebnisse reproduziert. Im zweiten Teil hingegen soll die postulierte Aufgabe von Ostml, der Schutzfunktion von CIC-7 vor lysosomaler Degradation, untersucht werden.

3.1 Subzelluläre Lokalisationsuntersuchungen

Wie schon in der Einleitung dargelegt, ist die subzelluläre Lokalisation von Ostml abhängig von der Anwesenheit des CIC-7s. *In vivo* colokalisiert Ostml mit CIC-7 in späten Endosomen/Lysosomen. Selbiges Verhalten konnte auch *in vivo* durch transiente Transfektion gezeigt werden. In CIC-7-defizienten Mäusen und bei Einzeltransfektion von Ostml-cDNA lag Ostml hingegen retikulär und perinukleär in den Zellen vor [Lange *et al.*, 2006]. Die Interaktion zwischen Ostml und CIC-7 und die damit einhergehende Lokalisationsänderung von Ostml sind dabei die Voraussetzung für die subzellulären Lokalisationsuntersuchung (Abb. 3.1.). Da mit Hilfe der Lokalisationsuntersuchung die Ostml-Domänen, welche die Interaktion zwischen Ostml und CIC-7 realisieren, identifiziert werden sollen, war es unablässig, entsprechende Chimäre zu generieren.

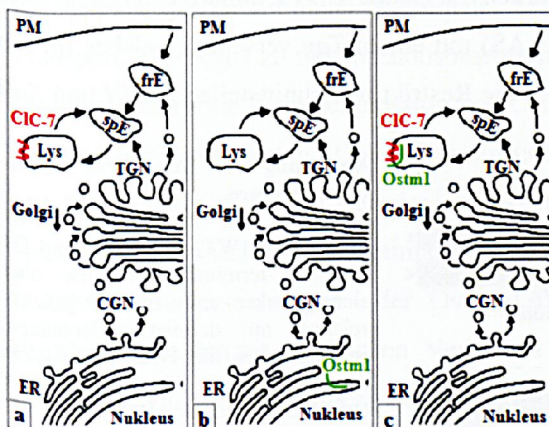


Abbildung 3.1: Subzelluläre Lokalisation von Ostml in Abhängigkeit von CIC-7

Schematische Darstellung. a, CIC-7 (rot) ist unabhängig von Ostml im Lysosomen (späten Endosomen) lokalisiert. b, Ostml (grün) hingegen verbleibt ohne CIC-7 retikulär und perinukleär in der Zelle verteilt (in *Cln7^{-/-}*-Tieren). c, *In vivo* werden beide Proteine exprimiert, so dass CIC-7 Ostml durch Interaktion zum Lysosomen transportiert.

PM, Plasmamembran; frE, frühe Endosomen; spE, späte Endosomen; Lys, Lysosomen; TGN, trans-Golgi-Netzwerk; CGN, cis-Golgi-Netzwerk; ER, Endoplasmatisches Retikulum

3.1.1 Generierte Ostml-CD4-Chimäre

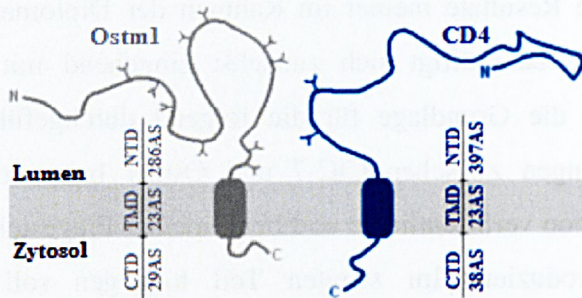


Abbildung 3.2: Topologievergleich von Ostml und CD4 Sowohl Ostml (links, grau) als auch CD4 (rechts, blau) sind Typ-I-Transmembranproteine mit einem kurzen zytosolisch vorliegenden C-Terminus und einem langen, glykosylierten luminalen N-Terminus. CTD, C-terminale Domäne; TMD, Transmembran-domäne; NTD, N-terminale Domäne. Y-Zeichen symbolisiert die putativen N-Glykosylierungsstellen.

Diese Forschungsarbeit betrachtet die Interaktion zwischen Ostml und CIC-7 begrenzt auf Ostml, so dass dementsprechend nur Ostml-Chimäre hergestellt wurden. Da zunächst die für die Interaktion relevante Domäne von Ostml ermittelt werden sollte, wurden Chimäre aus Ostml und CD4 ('cluster of differentiation 4') hergestellt. Die Wahl fiel auf CD4, da es zum einen eine ähnliche Topologie, aber zum anderen eine abweichende zelluläre

Lokalisation im Vergleich zu Ostml aufweist, da CD4 in der Zytoplasmamembran vorliegt. Sowohl Ostml als auch CD4 sind Typ-I-Transmembranproteine mit Glykosylierungsstellen und annähernd gleichlangen Aminosäuresequenzen (Abb. 3.2). Die Generierung der Ostml-CD4-Chimäre erfolgte mittels rekombinanter PCR, wobei die für die Domänen (NTD, TMD, CTD) der Proteine kodierenden cDNAs entsprechend der Typ-I-Transmembranprotein-Topologie in allen möglichen Variationen kombiniert worden (Abb. 3.3). Die Domänen wurden dabei über die Bestimmung der Hydrophobizitäten ermittelt (nach [Kyte und Doolittle, 1982]), welche als Ergebnis die definierten TMD von Ostml auf die AS Val-287 bis Leu-309 und von CD4 auf die AS Ala-398 bis Val-420 begrenzt (in Summe je 23 AS für TMD). Für die spätere Detektion wurden die Ostml-CD4-Chimäre C-terminal über eine kurze Aminosäuresequenz als Linker (13 AS) mit einem Tag versehen, welches für ein EGFP kodiert. Dazu wurden die Chimäre über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *Sall*

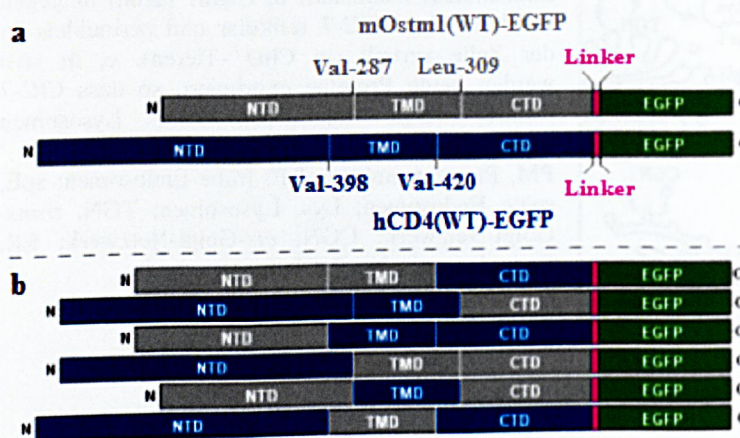


Abbildung 3.3: Generierte Ostml-CD4-Chimäre

a, Schema der Proteinsequenz von Maus-Ostml(WT) und humanem CD4 (WT); C-terminal verbunden über einen Linker mit EGFP; gekennzeichnet mit definierten Domänen, ermittelt über die Hydrophobizitäten der AS-Sequenz. Als Vorstufen der Ostml-CD4-Chimär-Mutagenese. b, Kombination der Ostml- und CD4-Domänen in allen Variationen. Chimäre für die anschließenden Lokalisationsuntersuchungen.

in den Vector EGFP-N3 eingefügt. Ergänzend muss erwähnt werden, dass die cDNA für Ostm1 von der Maus (mOstm1), die cDNA für CD4 vom Menschen (hCD4) und die cDNA für CIC-7 von der Ratte verwendet wurde.

3.1.2 Subzelluläre Lokalisationsuntersuchungen der Ostm1- CD4-Chimäre

Im nun folgenden Abschnitt sind die Ergebnisse der subzellulären Lokalisationsuntersuchungen der Ostm1-CD4-Chimäre dargestellt. Zunächst wird jedoch das Verhalten von Wildtyp-Ostm1 in Abhängigkeit von CIC-7 in verschiedenen Zelltypen dargestellt. Anschließend wird die Lokalisation der einzelnen Ostm1-CD4-Chimäre qualitativ und quantitativ in Ab- und Anwesenheit von CIC-7 untersucht. Zusammenfassend wird die subzelluläre Lokalisation der Ostm1-CD4-Chimäre in An- und Abwesenheit von CIC-7 Zellen aufwiesen und erst bei Koexpression von CIC-7 die Lysosomen, entsprechend der Lokalisation *in vivo*, erreichen.

3.1.2.1 Subzelluläre Lokalisation von WT-Ostm1 in Abhängigkeit von CIC-7

Die nun folgenden Versuchsergebnisse repräsentieren die spät-endosomale/lysosomale Colokalisation von Ostm1 und CIC-7, sowie die retikuläre und perinukleäre Verteilung von Ostm1 in Abwesenheit von CIC-7. Für die Untersuchung wurden HeLa- und CIC-7-KO-Zellen mit Ostm1-Myc (CT) und CIC-7 bzw. Ostm1-GFP und CIC-7-HA (CT) transfiziert (Abb. 3.4). Einzeln transfiziertes Ostm1 lag in allen Zelltypen netzförmig, retikulär verteilt vor. Koexprimiert man hingegen Ostm1 mit CIC-7, wird eine Überlagerung beider Proteine in den Immunfluoreszenzen ersichtlich. Die zusätzliche Detektion von endogenem Lamp-1, welches als spät-endosomaler/lysosomaler Marker dient, zeigt das CIC-7 essentiell für den Transport von Ostm1 zu späten Endosomen/Lysosomen ist. (Abb. 3.4).

Die Expressionsrate bei Koexpression von Ostm1 und CIC-7 steht stark in Abhängigkeit des eingesetzten transfizierten cDNA-Verhältnisses. Der Einsatz der cDNAs von Ostm1-GFP in pEGFP-N3 und CIC-7 mit C-terminalen HA-Epitop in pCI-neo im molaren Verhältnis 1:20 in HeLa-Zellen erwies sich als optimal und fand dementsprechend auch Anwendung bei den Lokalisationsuntersuchungen der Ostm1-CD4 Chimäre. Bei Einzeltransfektionen wurde der abwesende Partner im gleichen Verhältnis durch seinen Leervektor ersetzt. Um mögliche Kreuzreaktivitäten oder unspezifische Bindungen der Antikörper auszuschließen, wurden zum einen Antikörper gegen dasselbe Protein mit unterschiedlichen Zielepitopen verwendet und zum anderen Antikörpern in nicht transfizierten Zellen oder ggf. KO-Zellen getestet. Endogenes CIC-7 in HeLa-Zellen konnte dabei vernachlässigt werden, da alle

überexprimierten WT-Ostm1-Konstrukte eine retikuläre und perinukleäre Verteilung in den Zellen aufwiesen und erst bei Koexpression von CIC-7 die Lysosomen, entsprechend der Lokalisation *in vivo*, erreichten.

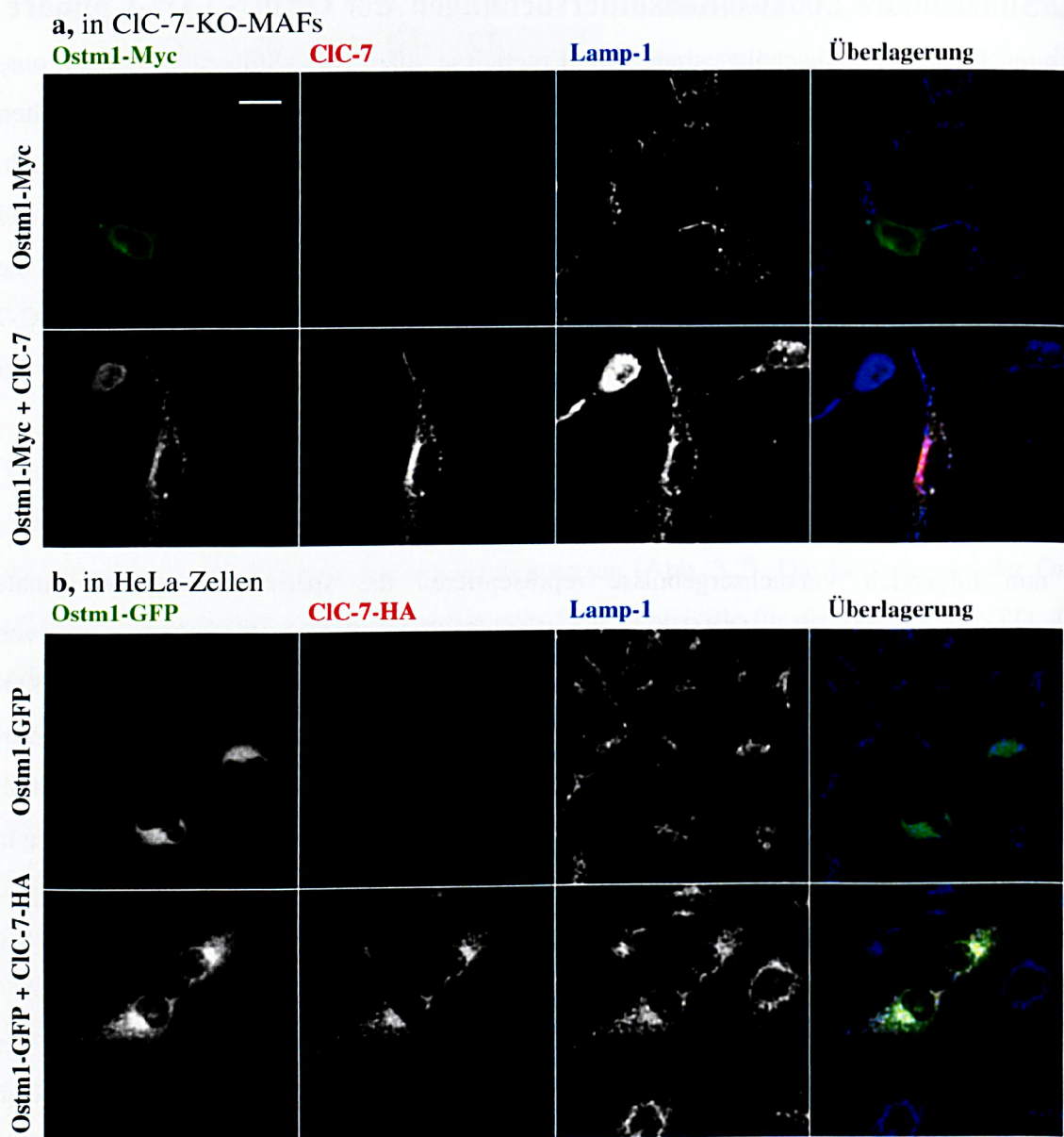


Abbildung 3.4.: Vorversuche zur Expression von Ostm1 und CIC-7 **a**, Transiente Transfektion von Ostm1-Myc-cDNA ohne (obere Reihe) und mit (darunter) CIC-7-cDNA in CIC-7-KO-Zellen. **b**, Transiente Transfektion von Ostm1-GFP-cDNA ohne (obere Reihe) und mit (darunter) CIC-7-HA cDNA in HeLa-Zellen. Die Detektion erfolgte mit Antikörpern in **a**, gegen Myc, CIC-7 und Lamp-1 und in **b**, gegen HA und Lamp-1. Maßstab 10µm.

In beiden Versuchen liegt Ostm1(grün in Überlagerung) unabhängig vom verwendeten Konstrukt bzw. Zelltyp nach Einzeltransfektion retikulär und perinukleär verteilt in der Zelle vor und colokalisiert nicht mit dem spät-endosomalen/ lysosomalen Marker Lamp-1(blau). Bei Koexpression von Ostm1(grün) und CIC-7(rot) unabhängig vom verwendeten Konstrukt bzw. Zelltyp kolokalisieren beide Proteine in Lamp-1 positiven Strukturen (in Überlagerung).

3.1.2.2 Subzelluläre Lokalisation mit Quantifizierung der einzelnen Ostml-CD4-Chimäre in Ab- und Anwesenheit von CIC-7

Zur Untersuchung des Lokalisationsverhaltens der einzelnen Ostml-CD4-Chimäre in Abhängigkeit von CIC-7 wurden die Chimäre in zwei Versuchansätzen zum einen allein und zum anderen mit CIC-7-HA in HeLa-Zellen überexprimiert und mit Hilfe der Immunfluoreszenzanalyse ausgewertet. Zudem wurden den überexprimierten Ostml-CD4-Chimären zelluläre Kompartimente entsprechend ihrer zellulären Lokalisation in vier Kategorien (Endoplasmatisches Retikulum (ER), Lysosomen (Lys), Plasmamembran (PM) und undefiniert (u.d.)) zugeordnet und quantitativ ausgewertet. Die Zuordnung für die lysosomale Lokalisation erfolgte durch zusätzliche Detektion des spät-endosomalen/lysosomalen Markerproteins Lamp-1. Die anderen Aufenthaltsorte wurden nach entsprechend charakteristischen zellulären Strukturen und Lokalisationen (ohne Markerproteine) bestimmt.

Folgend werden die Ergebnisse der einzelnen Ostml-CD4-Chimäre bzgl. ihrer subzellulären Lokalisation mit Quantifizierung in Ab- und Anwesenheit von CLC-7 dargestellt. Abgebildete Immunfluoreszenzaufnahmen repräsentieren dabei nur das überwiegend vorliegende zelluläre Lokalisationsverhalten. Zunächst wurden jedoch Kontroll-Transfektionen vorgenommen, um das zelluläre Verhalten von CIC-7-HA, des Leervektors EGFP-N3, sowie Antikörperspezifitäten zu prüfen.

Kontrollen

Um verwendete Antikörper auf Kreuzreaktivitäten oder unspezifische Bindungen zu überprüfen und das Lokalisationsverhalten von EGFP in Abhängigkeit von CIC-7-HA zu studieren, wurden entsprechende transiente Transfektionen vorgenommen und Antikörper eingesetzt. Im Falle untransfiziert vorliegender HeLa-Zellen konnte nach Einsatz der Lamp-1- und HA-Antikörper dementsprechend nur Lamp-1 (blau) detektiert werden (Abb. 3.5.a). Wurde hingegen CIC-7 mit C-terminalem HA-Epitop transfiziert und die beiden Antikörper eingesetzt, konnten sowohl späte Endosomen/Lysosomen als auch CIC-7-HA detektiert werden (Abb. 3.5.b). Dabei kolokalisiert CIC-7 wie erwartet mit den spät-endosomalen/lysosomalen Vesikeln. Die Detektion des EGFP in Ab- bzw. Anwesenheit von CIC-7-HA wurde mit den gleichen Antikörpern durchgeführt. Dabei lag exprimiertes EGFP in beiden Fällen aufgrund seiner Löslichkeit zytosolisch vor und kolokalisierte weder mit Lamp-1 noch mit CIC-7 (Abb. 3.5.c/d).

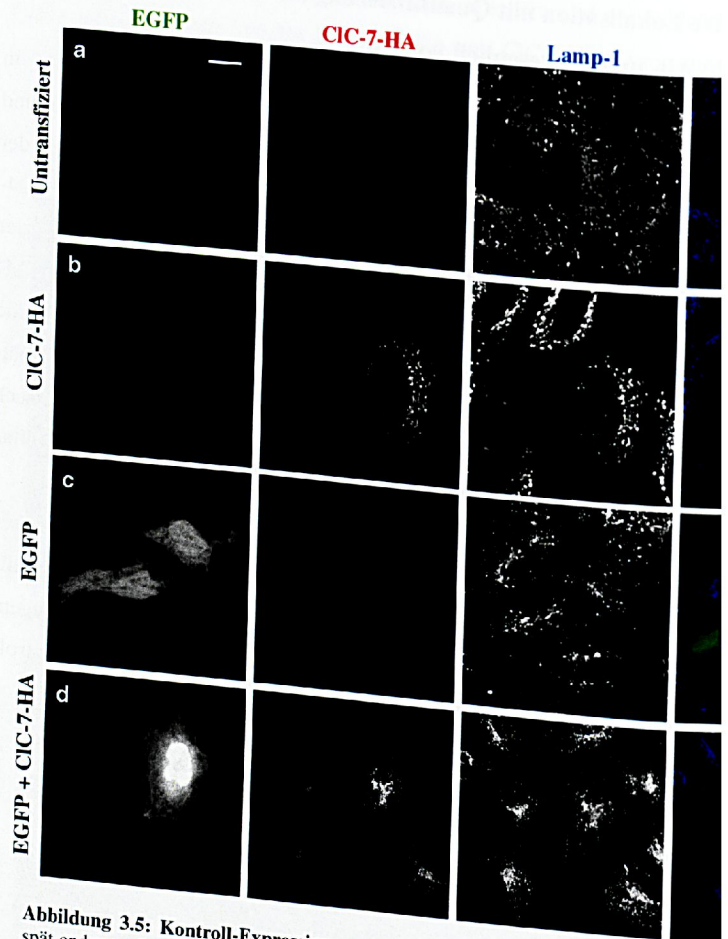


Abbildung 3.5: Kontroll-Expression von CIC-7-HA und EGFP in HeLa-Zellen
 spät-endosomale/lysosomale Kompartimente durch Detektion von endogenem Lamp-1
 In **b** konnte transfiziertes CIC7-HA (rot), im Gegensatz zu **a** (untransfizierte Zellen) de-
 welches mit Lamp-1 kolokalisiert. **c** und **d** hingegen illustrieren die zelluläre La-
 transfizierten EGFP, welches aufgrund seiner Löslichkeit zytoplasmatisch vorliegt (grün
 kolokalisiert EGFP in **d** bei Koexpression nicht mit CIC-7-HA, wobei hingegen wiede-
 und Lamp-1(blau) kolokalisieren (violett).
 Für die Detektion von CIC-7-HA wurden HA- Antikörper verwendet. Maßstab 10µm.

Ostm1-EGFP

In HeLa-Zellen liegt *Ostm1*-EGFP retikulär und perinukleär vor und kolokalisiert nicht mit Lamp-1 (blau) (Abb. 3.6.a). Bei Koexpression mit rCIC-7-HA ändert sich hingegen die Lokalisation von *Ostm1*; *Ostm1* und CIC-7 überlagern mit Lysosomen in punktförmiger Verteilung (Abb. 3.6.b). Quantitativ betrachtet liegt *Ostm1* ohne CIC-7 mit über 80% im endoplasmatischen Retikulum vor (Abb. 3.7). Mit CIC-7 koexprimiertes *Ostm1* wechselt dagegen seinen zellulären Aufenthaltsort mit etwa 75% zu Lysosomen. Wie zu erwarten war interagiert *Ostm1* mit CIC-7.

Schematische Darstellung des verwendeten Konstruktes, *Ostm1*-EGFP:

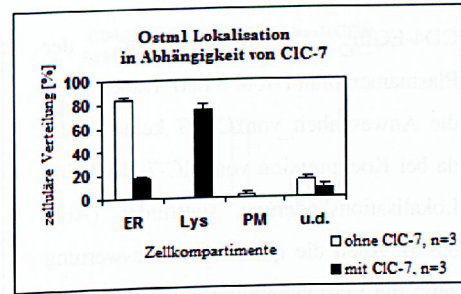


Abbildung 3.7: Quantifizierung der *Ostm1*-EGFP-Lokalisation in Abhängigkeit von CIC-7-HA
Prozentuale Zuordnung der ermittelten zellulären Verteilung des *Ostm1*-Konstruktes zu den definierten Kompartimenten in Abhängigkeit von CIC-7. Ersichtlich wird ein Lokalisationswechsel des *Ostm1* vom ER ohne CIC-7 zu Lysosomen mit CIC-7. Weiße Balken entsprechen Werten von *Ostm1* ohne CIC-7-Expression, Schwarze Balken Werte von *Ostm1* mit koexprimiertem CIC-7. Fehlerbalken zeigen Standardfehler. n, Anzahl der Versuchsdurchläufe (pro Versuchsdurchlauf mehr als 100 Zellen ausgewertet).

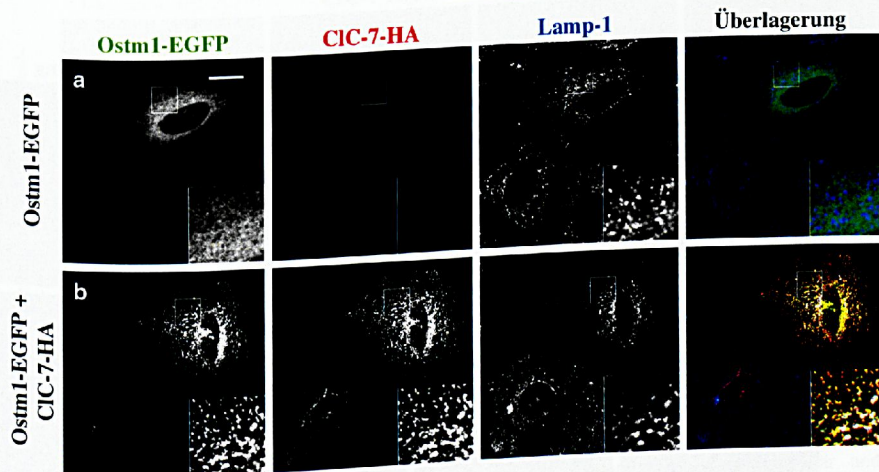


Abbildung 3.6: Subzelluläre Lokalisation von *Ostm1*-EGFP in Abhängigkeit von CIC-7 in HeLa-Zellen
a, In Einzeltransfektionen liegt exprimiertes *Ostm1*-EGFP (grün) retikulär und perinukleär verteilt in der Zelle vor und kolokalisiert nicht mit Lamp-1 (blau). **b**, Bei Koexpression von *Ostm1*-EGFP (grün) und CIC-7-HA (rot) hingegen wechselt *Ostm1* seine zelluläre Verteilung. *Ostm1* kolokalisiert mit CIC-7 in und Lamp-1-positiven Strukturen, den Lysosomen. Die Detektion erfolgte mit Antikörpern gegen Lamp-1 und HA für CIC-7-HA. Maßstab 10µm. 4-fache Vergrößerung des ausgewählten Quadrates.

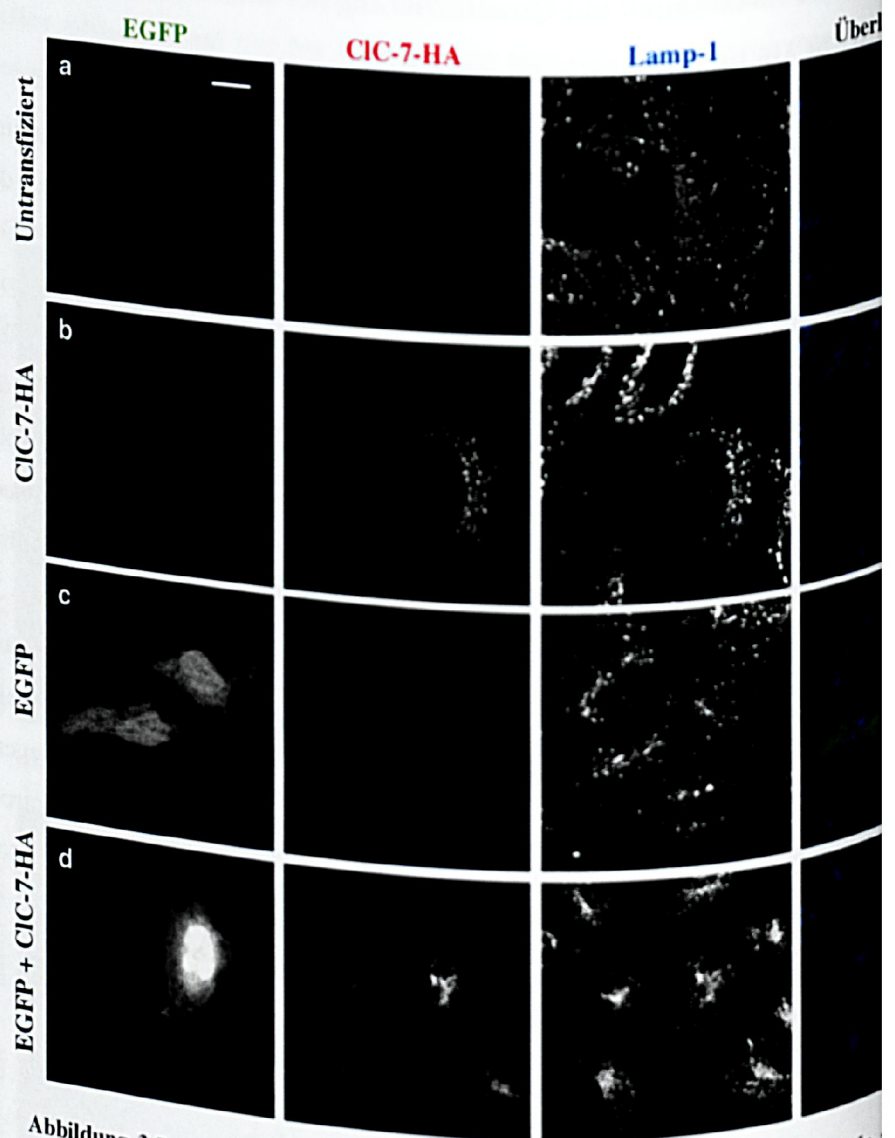


Abbildung 3.5: Kontroll-Expression von CIC-7-HA und EGFP in HeLa-Zellen. In **a** spät-endosomale/lysosomale Kompartimente durch Detektion von endogenem Lamp-1 (blau). In **b** konnte transfiziertes CIC7-HA (rot), im Gegensatz zu **a** (untransfizierte Zellen) detektiert werden, welches mit Lamp-1 kolokalisiert. **c** und **d** hingegen illustrieren die zelluläre Lokalisation von EGFP, welches aufgrund seiner Löslichkeit zytoplasmatisch vorliegt (grün). In **d** kolokalisiert EGFP in **d** bei Koexpression nicht mit CIC-7-HA, wobei hingegen wiederum EGFP und Lamp-1 (blau) kolokalisieren (violett). Für die Detektion von CIC-7-HA wurden HA- Antikörper verwendet. Maßstab 10µm.

Ostm1-EGFP

In HeLa-Zellen liegt Ostm1-EGFP retikulär und perinukleär vor und kolokalisiert nicht mit Lamp-1 (blau) (Abb. 3.6.a). Bei Koexpression mit rCIC-7-HA ändert sich hingegen die Lokalisation von Ostm1; Ostm1 und CIC-7 überlagern mit Lysosomen in punktförmiger Verteilung (Abb. 3.6.b). Quantitativ betrachtet liegt Ostm1 ohne CIC-7 mit über 80% im endoplasmatischen Retikulum vor (Abb. 3.7). Mit CIC-7 koexprimiertes Ostm1 wechselt dagegen seinen zellulären Aufenthaltsort mit etwa 75% zu Lysosomen. Wie zu erwarten war interagiert Ostm1 mit CIC-7.

Schematische Darstellung des verwendeten Konstruktes, Ostm1-EGFP:

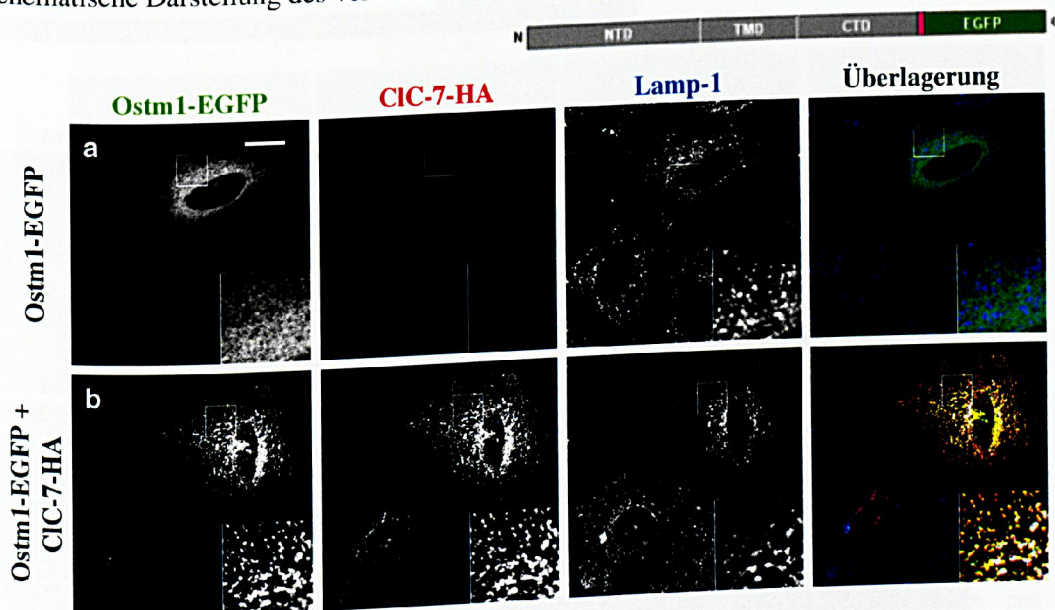


Abbildung 3.6: Subzelluläre Lokalisation von Ostm1-EGFP in Abhängigkeit von CIC-7 in HeLa-Zellen a, In Einzeltransfektionen liegt exprimiertes Ostm1-EGFP (grün) retikulär und perinukleär verteilt in der Zelle vor und kolokalisiert nicht mit Lamp-1 (blau). b, Bei Koexpression von Ostm1-EGFP (grün) und CIC-7-HA (rot) hingegen wechselt Ostm1 seine zelluläre Verteilung. Ostm1 kolokalisiert mit CIC-7 in und Lamp-1-positiven Strukturen, den Lysosomen. Die Detektion erfolgte mit Antikörpern gegen Lamp-1 und HA für CIC-7-HA. Maßstab 10µm. 4-fache Vergrößerung des ausgewählten Quadrates.

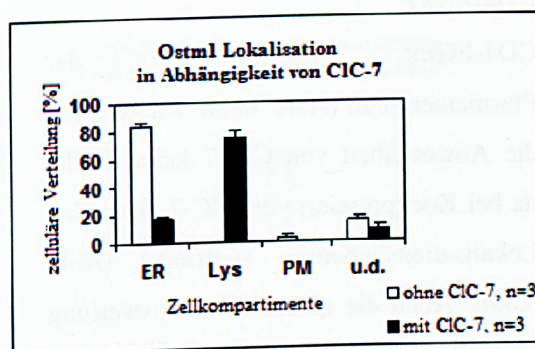


Abbildung 3.7: Quantifizierung der Ostm1-EGFP-Lokalisation in Abhängigkeit von CIC-7-HA Prozentuale Zuordnung der ermittelten zellulären Verteilung des Ostm1-Konstruktes zu den definierten Kompartimenten in Abhängigkeit von CIC-7. Ersichtlich wird ein Lokalisationswechsel des Ostm1 vom ER ohne CIC-7 zu Lysosomen mit CIC-7.

Weißer Balken entsprechen Werten von Ostm1 ohne CIC-7-Expression, Schwarze Balken Werte von Ostm1 mit koexprimiertem CIC-7. Fehlerbalken zeigen Standardfehler. n, Anzahl der Versuchsdurchläufe (pro Versuchsdurchlauf mehr als 100 Zellen ausgewertet).

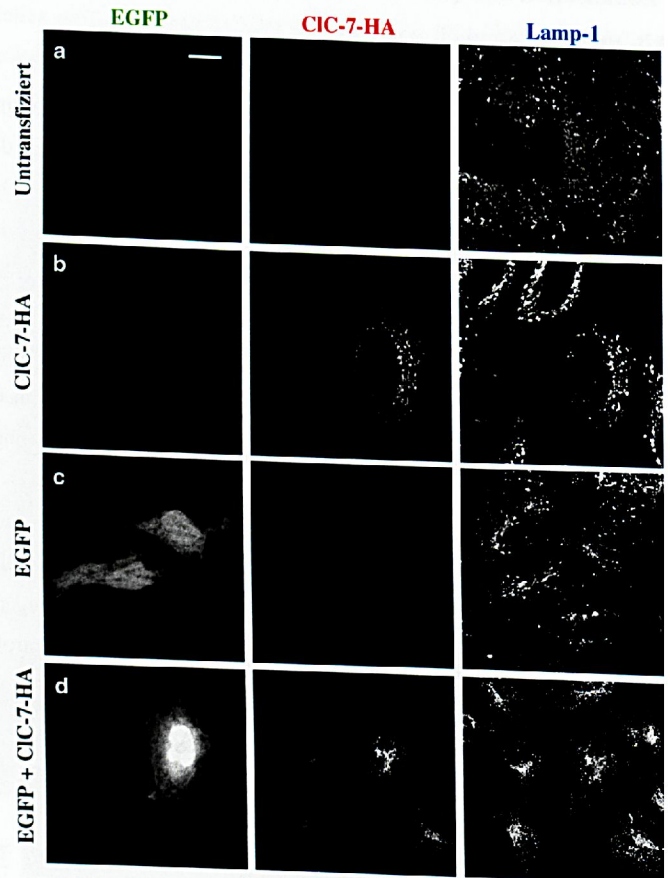


Abbildung 3.5: Kontroll-Expression von CIC-7-HA und EGFP in HeLa
 spät-endosomale/lysosomale Kompartimente durch Detektion von endogenem
 In **b** konnte transfiziertes CIC7-HA (rot), im Gegensatz zu **a** (untransfizierte Ze
 welches mit Lamp-1 kolokalisiert. **c** und **d** hingegen illustrieren die zell
 transfiziert EGFP, welches aufgrund seiner Löslichkeit zytoplasmatisch vorli
 kolokalisiert EGFP in **d** bei Koexpression nicht mit CIC-7-HA, wobei hingege
 und Lamp-1(blau) kolokalisieren (violett).
 Für die Detektion von CIC-7-HA wurden HA- Antikörper verwendet. Maßstab

Ostm1-EGFP

In HeLa-Zellen liegt Ostm1-EGFP retikulär und perinukleär vor und kolokalisiert nicht mit Lamp-1 (blau) (Abb. 3.6.a). Bei Koexpression mit rCIC-7-HA ändert sich hingegen die Lokalisation von Ostm1; Ostm1 und CIC-7 überlagern mit Lysosomen in punktförmiger Verteilung (Abb. 3.6.b). Quantitativ betrachtet liegt Ostm1 ohne CIC-7 mit über 80% im endoplasmatischen Retikulum vor (Abb. 3.7). Mit CIC-7 koexprimiertes Ostm1 wechselt dagegen seinen zellulären Aufenthaltsort mit etwa 75% zu Lysosomen. Wie zu erwarten war interagiert Ostm1 mit CIC-7.

Schematische Darstellung des verwendeten Konstruktes, Ostm1-EGFP:

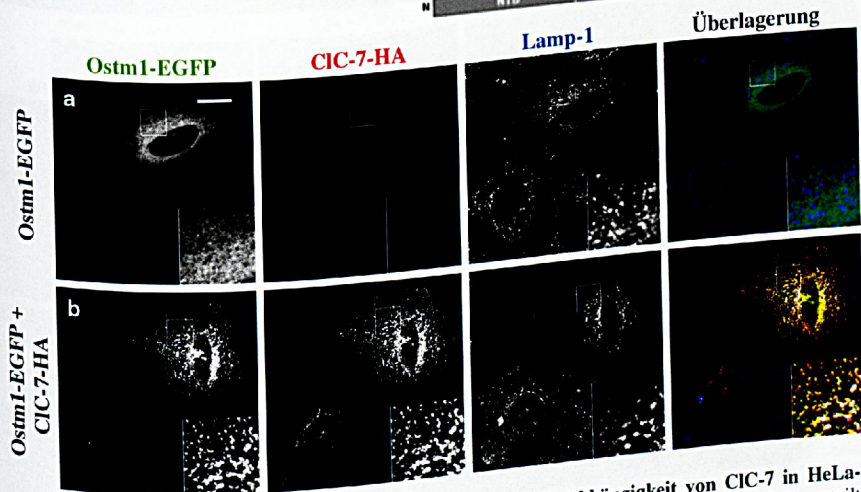


Abbildung 3.6: Subzelluläre Lokalisation von Ostm1-EGFP (grün) retikulär und perinukleär verteilt in HeLa-Zellen **a**, In Einzeltransfektionen liegt exprimiertes Ostm1-EGFP (grün) in der Zelle vor und kolokalisiert nicht mit Lamp-1 (blau). **b**, Bei Koexpression von Ostm1-EGFP (grün) und CIC-7-HA (rot) hingegen wechselt Ostm1 seine zelluläre Verteilung. Ostm1 kolokalisiert mit Lamp-1 und Lamp-1-positiven Strukturen, den Lysosomen. Die Detektion erfolgte mit Antikörpern gegen Lamp-1 und HA für CIC-7-HA. Maßstab 10µm. 4-fache Vergrößerung des ausgewählten Quadrates.

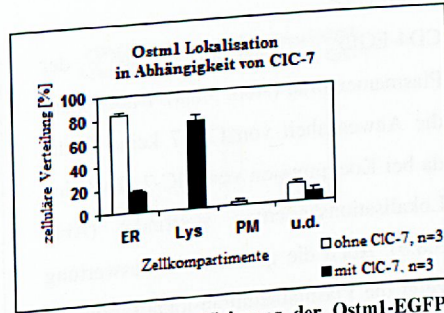
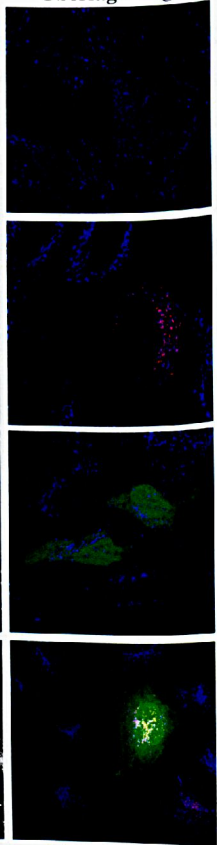


Abbildung 3.7: Quantifizierung der Ostm1-EGFP-Lokalisation in Abhängigkeit von CIC-7-HA. Prozentuale Zuordnung der ermittelten zellulären Verteilung des Ostm1-Konstruktes zu den definierten Kompartimenten in Abhängigkeit von CIC-7. Ersichtlich wird ein Lokalisationswechsel des Ostm1 vom ER ohne CIC-7 zu Lysosomen mit CIC-7. Weiße Balken entsprechen Werten von Ostm1 ohne CIC-7-Expression, Schwarze Balken Werte von Ostm1 mit koexprimiertem CIC-7. Fehlerbalken zeigen Standardfehler. n, Anzahl der Versuchsdurchläufe (pro Versuchsdurchlauf mehr als 100 Zellen ausgewertet).

Überlagerung



-Zellen In a-d wurden Lamp-1 (blau) gefärbt. (blau) detektiert werden, uläre Lokalisation des (grün). Demzufolge n wiederum CIC-7(rot)

10µm.

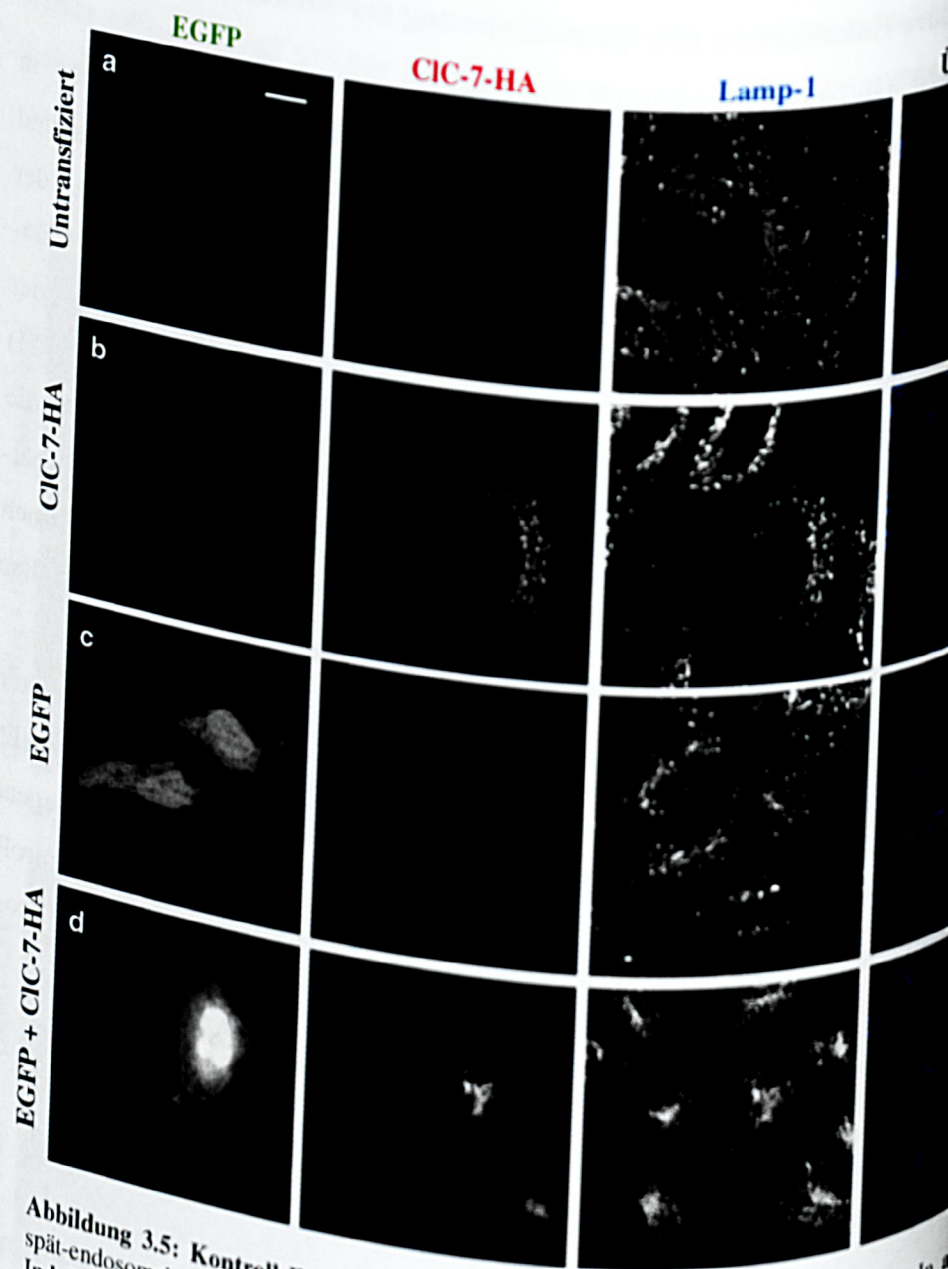


Abbildung 3.5: Kontroll-Expression von CIC-7-HA und EGFP in HeLa-Zellen In a spät-endosomale/lysosomale Kompartimente durch Detektion von endogenem Lamp-1 (blau). In b konnte transfiziertes CIC7-HA (rot), im Gegensatz zu a (untransfizierte Zellen) detektiert werden. In c wurde EGFP (grün) transfiziert, welches aufgrund seiner Löslichkeit zytoplasmatisch vorliegt (grün). D zeigt die Koexpression von EGFP und CIC-7-HA, wobei EGFP und Lamp-1 (blau) colokalisieren (violett). Für die Detektion von CIC-7-HA wurden HA- Antikörper verwendet. Maßstab 10µm.

Ostm1-EGFP

In HeLa-Zellen liegt *Ostm1-EGFP* retikulär und perinukleär vor und kolokalisiert nicht mit Lamp-1 (blau) (Abb. 3.6.a). Bei Koexpression mit rCIC-7-HA ändert sich hingegen die Lokalisation von *Ostm1*; *Ostm1* und CIC-7 überlagern mit Lysosomen in punktförmiger Verteilung (Abb. 3.6.b). Quantitativ betrachtet liegt *Ostm1* ohne CIC-7 mit über 80% im endoplasmatischen Retikulum vor (Abb. 3.7). Mit CIC-7 koexprimiertes *Ostm1* wechselt dagegen seinen zellulären Aufenthaltsort mit etwa 75% zu Lysosomen. Wie zu erwarten war interagiert *Ostm1* mit CIC-7.

Schematische Darstellung des verwendeten Konstruktes, *Ostm1-EGFP*:

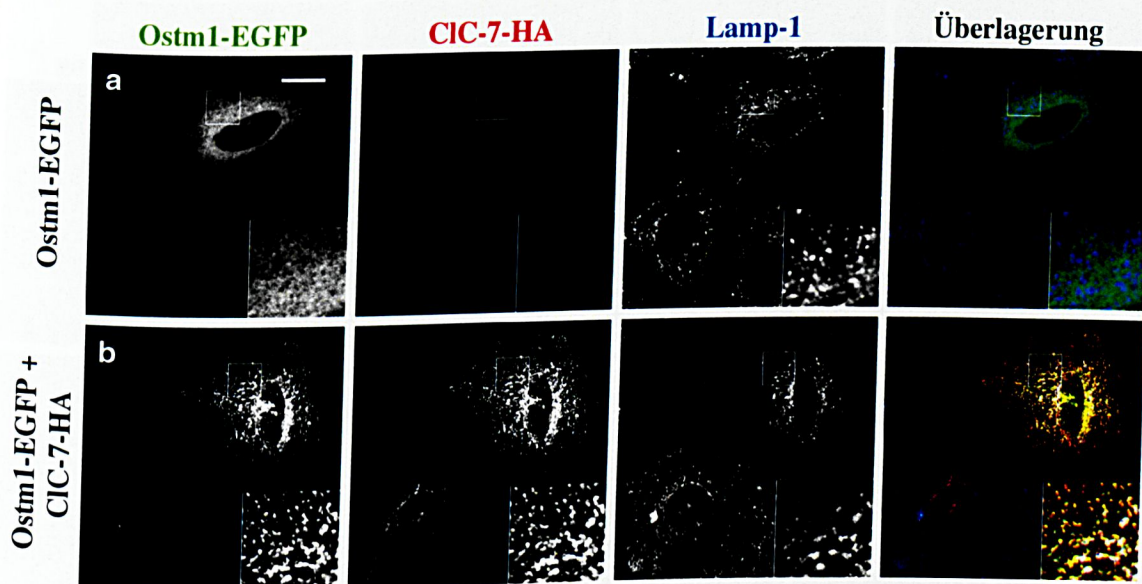


Abbildung 3.6: Subzelluläre Lokalisation von *Ostm1-EGFP* in Abhängigkeit von CIC-7 in HeLa-Zellen **a**, In Einzeltransfektionen liegt exprimiertes *Ostm1-EGFP* (grün) retikulär und perinukleär verteilt in der Zelle vor und kolokalisiert nicht mit Lamp-1 (blau). **b**, Bei Koexpression von *Ostm1-EGFP* (grün) und CIC-7-HA (rot) hingegen wechselt *Ostm1* seine zelluläre Verteilung. *Ostm1* kolokalisiert mit CIC-7 in Lamp-1-positiven Strukturen, den Lysosomen. Die Detektion erfolgte mit Antikörpern gegen Lamp-1 und HA für CIC-7-HA. Maßstab 10µm. 4-fache Vergrößerung des ausgewählten Quadrates.

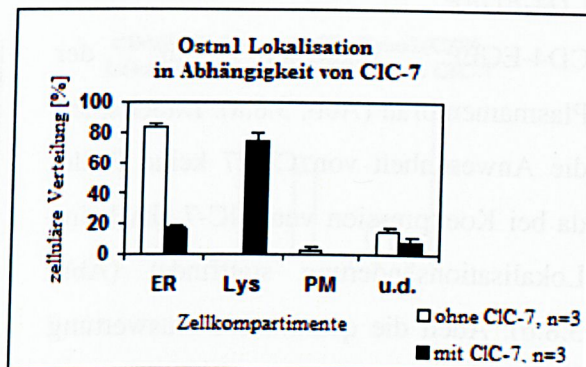


Abbildung 3.7: Quantifizierung der *Ostm1-EGFP*-Lokalisation in Abhängigkeit von CIC-7-HA Prozentuale Zuordnung der ermittelten zellulären Verteilung des *Ostm1*-Konstruktes zu den definierten Kompartimenten in Abhängigkeit von CIC-7. Ersichtlich wird ein Lokalisationswechsel des *Ostm1* vom ER ohne CIC-7 zu Lysosomen mit CIC-7. Weiße Balken entsprechen Werten von *Ostm1* ohne CIC-7-Expression, Schwarze Balken Werte von *Ostm1* mit koexprimiertem CIC-7. Fehlerbalken zeigen Standardfehler. n, Anzahl der Versuchsdurchläufe (pro Versuchsdurchlauf mehr als 100 Zellen ausgewertet).

CD4-EGFP

CD4-EGFP lokalisiert an der Plasmamembran (Abb. 3.8.a). Dabei spielt die Anwesenheit von CIC-7 keine Rolle, da bei Koexpression von CIC-7-HA keine Lokalisationsänderung stattfindet (Abb. 3.8.b). Auch die quantitative Auswertung zeigt die Plasmamembran-lokalisierung des CD4 (Abb. 3.9). CD4 und CIC-7 interagieren folglich nicht. Diese Ergebnisse veranschaulichen zudem das unterschiedliche Lokalisationsverhalten beider Ausgangskonstrukte, Ostml- und CD4-EGFP, in Abhängigkeit von CIC-7.

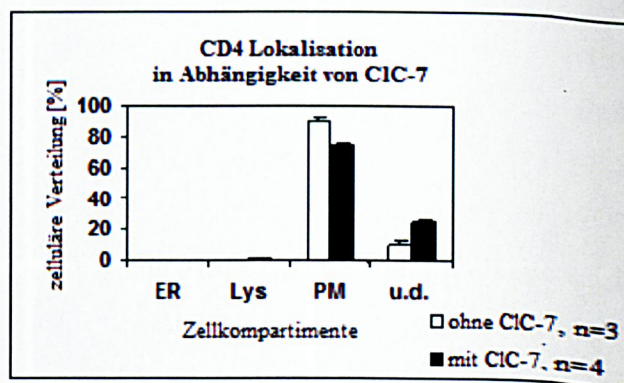


Abbildung 3.9: Quantifizierung der CD4-EGFP-Lokalisation in Abhängigkeit von CIC-7-HA. Prozentuale Zuordnung der ermittelten zellulären Verteilung des CD4-Konstruktes zu den definierten Kompartimenten in Abhängigkeit von CIC-7. Ersichtlich wird das CD4 unabhängig von der Koexpression von CIC-7 ausschließlich an der Plasmamembran lokalisiert ist. Weiße Balken entsprechen Werten von CD4 ohne CIC-7-Expression, Schwarze Balken Werte von CD4 mit koexprimiertem CIC-7. Fehlerbalken zeigen Standardfehler. n, Anzahl der Versuchsdurchläufe (pro Versuchsdurchlauf mehr als 100 Zellen ausgewertet).

Schematische Darstellung des verwendeten Konstruktes, **CD4-EGFP**:

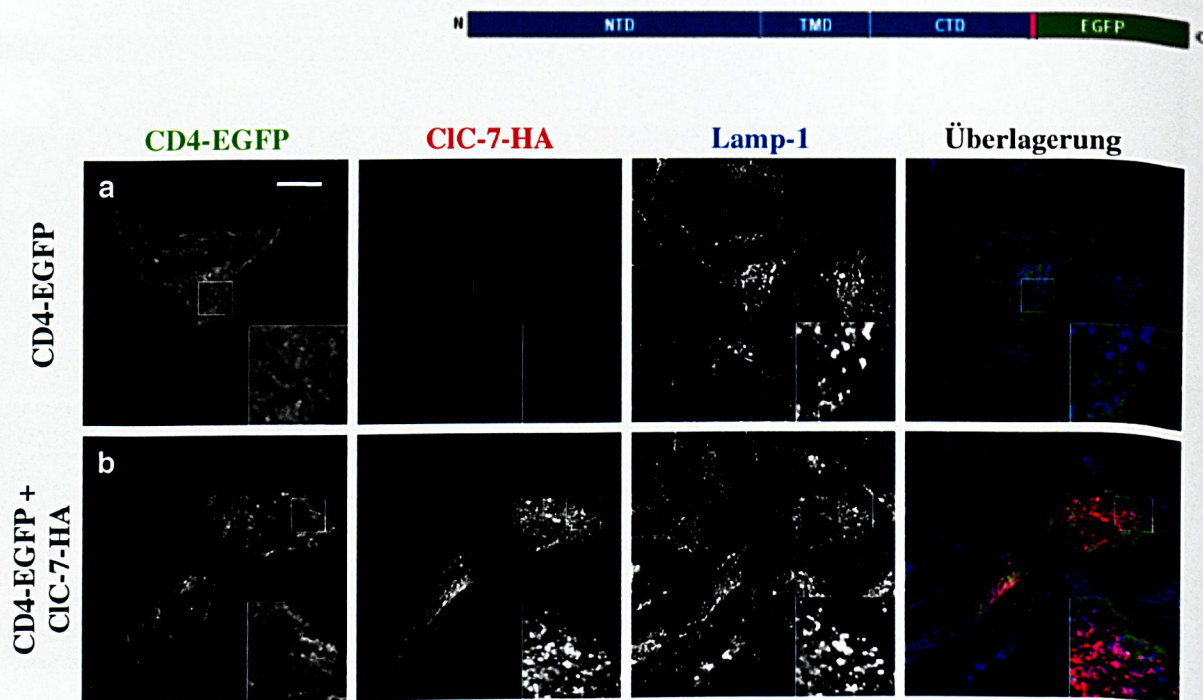


Abbildung 3.8: Subzelluläre Lokalisation von CD4-EGFP in Abhängigkeit von CIC-7 in HeLa-Zellen. a,b, CD4-EGFP (gün) ist primär an der Plasmamembran lokalisiert, unabhängig ob CIC-7-HA koexprimiert wurde. b, CIC-7-HA (rot) hingegen liegt mit endogenem Lamp-1 (blau) colokalisiert in spät-endosomalen/lysosomalen Vesikeln vor. Die Detektion erfolgte mit Antikörpern gegen Lamp-1 und HA für CIC-7-HA. Maßstab 10µm. 4-fache Vergrößerung des ausgewählten Quadrates.

CD4-Ostm1-Ostm1-EGFP

Die Chimäre lokalisieren nach Einzeltransfektion überwiegend an der Plasmamembran (quantitativ zu 56%), jedoch verbleiben 22% im endoplasmatischen Retikulum (Abb. 3.10a und Abb. 3.11). In Anwesenheit von CIC-7 wird jedoch eine Lokalisationsänderung deutlich. Die Chimäre koloalisieren mit CIC-7 im Lysosomen in etwa 75% der betrachteten Zellen (Abb. 3.10.b und Abb. 3.11). Eine Interaktion zwischen beiden Proteinen scheint daher gegeben zu sein.

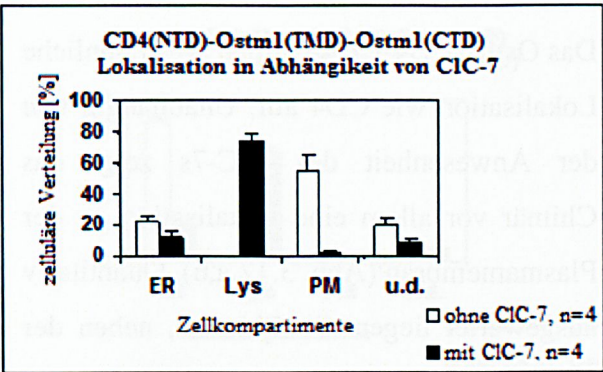


Abbildung 3.11: Quantifizierung der CD4-Ostm1-Ostm1-EGFP-Lokalisation in Abhängigkeit von CIC-7-HA. Prozentuale Zuordnung der ermittelten zellulären Verteilung des Konstruktes zu den definierten Kompartimenten in Abhängigkeit von CIC-7. Ersichtlich wird ein Lokalisationswechsel des Konstruktes zu Lysosomen mit CIC-7. Weiße Balken entsprechen Werten des Konstruktes ohne CIC-7-Expression, Schwarze Balken Werte des Konstruktes mit koexprimiertem CIC-7. Fehlerbalken zeigen Standardfehler. n, Anzahl der Versuchsdurchläufe (pro Versuchsdurchlauf mehr als 100 Zellen ausgewertet).

Schematische Darstellung des verwendeten Konstruktes, CD4-Ostm1-Ostm1-EGFP:

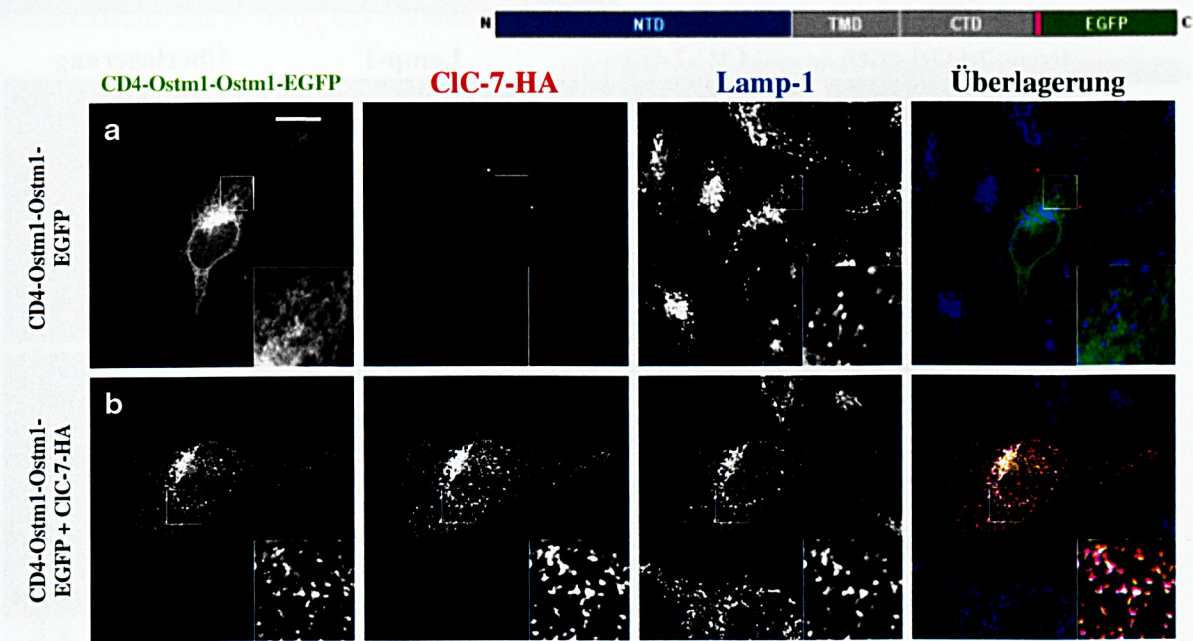


Abbildung 3.10: Subzelluläre Lokalisation von CD4-Ostm1-Ostm1-EGFP in Abhängigkeit von CIC-7 in HeLa-Zellen. a, Einzelexprimiertes CD4-Ostm1-Ostm1-EGFP-Konstrukt ist hier retikulär und perinukleär in der Zelle verteilt (sonst auch in der Plasmamembran). Es koloalisiert nicht mit Lamp-1 positiven Vesikeln. b, Bei Koexpression mit CIC-7-HA liegt das Konstrukt zusammen mit CIC-7 in weißen punktförmigen, Lamp-1-positiven Kompartimenten vor. Es fand folglich ein Lokalisationswechsel statt. Die Detektion erfolgte mit Antikörpern gegen Lamp-1 und HA für CIC-7-HA. Maßstab 10µm. 4-fache Vergrößerung des ausgewählten Quadrates.

Osm1-CD4-CD4-EGFP

Das Osm1-CD4-CD4-Chimär weist ähnliche Lokalisation wie CD4 auf. Unabhängig von der Anwesenheit des CIC-7s zeigt das Chimär vor allem eine Lokalisation an der Plasmamembran (Abb. 3.12.a,b). Quantitativ ausgewertet liegen die Chimäre, neben der geringen perinukleären Lokalisation, mit über 51% in Einzel- und Koexpression mit CIC-7 an der Plasmamembran vor (Abb. 3.13). Daher ist wohl keine Interaktion zwischen Chimär und CIC-7 zu bestehen.

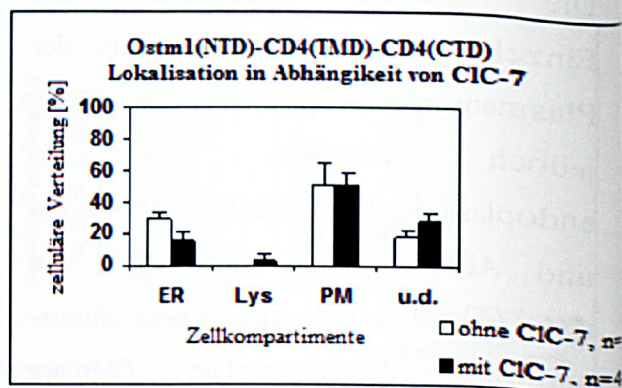


Abbildung 3.13: Quantifizierung der Osm1-CD4-CD4-EGFP-Lokalisation in Abhängigkeit von CIC-7-HA
Prozentuale Zuordnung der ermittelten zellulären Verteilung des Konstruktes zu den definierten Kompartimenten in Abhängigkeit von CIC-7. Es ist kein Lokalisationswechsel des Konstruktes ersichtlich. Weiße Balken entsprechen Werten des Konstruktes ohne CIC-7-Expression, Schwarze Balken Werte des Konstruktes mit koexprimiertem CIC-7. Fehlerbalken zeigen Standardfehler. n, Anzahl der Versuchsdurchläufe (pro Versuchsdurchlauf mehr als 100 Zellen ausgewertet).

Schematische Darstellung des verwendeten Konstruktes, Osm1-CD4-CD4-EGFP:

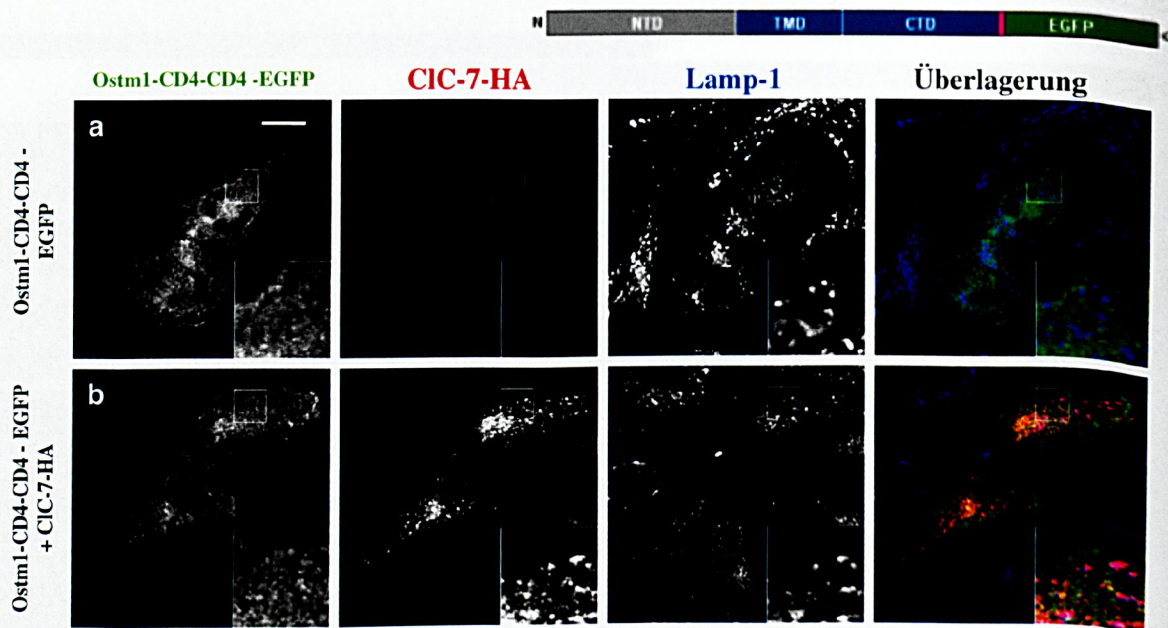


Abbildung 3.12: Subzelluläre Lokalisation von Osm1-CD4-CD4-EGFP in Abhängigkeit von CIC-7 in HeLa-Zellen. a, b, Einzelexprimiertes Osm1-CD4-CD4-EGFP-Konstrukt weist kein Lokalisationswechsel in Abhängigkeit von CIC-7 auf. Das Konstrukt liegt v.a. an der Plasmamembran vor. b, Eine Kolokalisation ist wiederum nur für CIC-7-HA und Lamp-1 ersichtlich. Die Detektion erfolgte mit Antikörpern gegen Lamp-1 und HA für CIC-7-HA. Maßstab 10µm. 4-fache Vergrößerung des ausgewählten Quadrates.

Ostm1-Ostm1-CD4-EGFP

Die Analyse der Lokalisation von Ostm1-Ostm1-CD4-EGFP ergab eine Lokalisationsänderung vom endoplasmatischen Retikulum zum Lysosomen bei Anwesenheit von CIC-7. Einzel-exprimiertes Ostm1-Ostm1-CD4-Chimär lokalisiert dabei mit über 87% im ER und liegt im Falle der Koexpression von CIC-7, neben geringfügiger perinukleärer Lokalisation, im Lysosomen vor (Abb. 3.14.a, b und Abb. 3.15.). Demzufolge scheint Ostm1-Ostm1-CD4 mit CIC-7 zu interagieren.

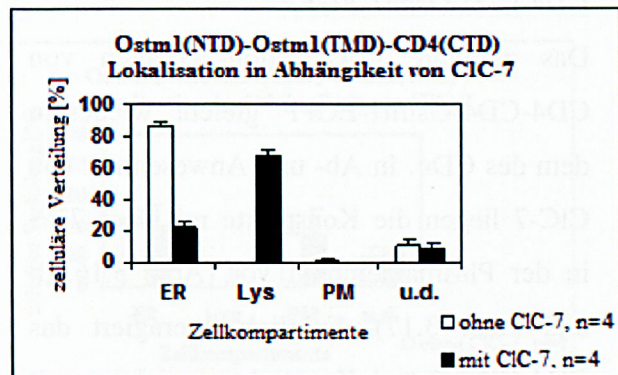


Abbildung 3.15: Quantifizierung der Ostm1-Ostm1-CD4-EGFP-Lokalisation in Abhängigkeit von CIC-7-HA. Prozentuale Zuordnung der ermittelten zellulären Verteilung des Konstruktes zu den definierten Kompartimenten in Abhängigkeit von CIC-7. Das Konstrukt ändert seine subzelluläre Lokalisation bei Anwesenheit von CIC-7 zu Lysosomen. Bei Einzelexpression liegt das Konstrukt nahezu 100%ig im ER lokalisiert vor. Weiße Balken entsprechen Werten des Konstruktes ohne CIC-7-Expression, Schwarze Balken Werte des Konstruktes mit koexprimiertem CIC-7. Fehlerbalken zeigen Standardfehler. n, Anzahl der Versuchsdurchläufe (pro Versuchsdurchlauf mehr als 100 Zellen ausgewertet).

Schematische Darstellung des verwendeten Konstruktes, Ostm1- Ostm1-CD4-EGFP:

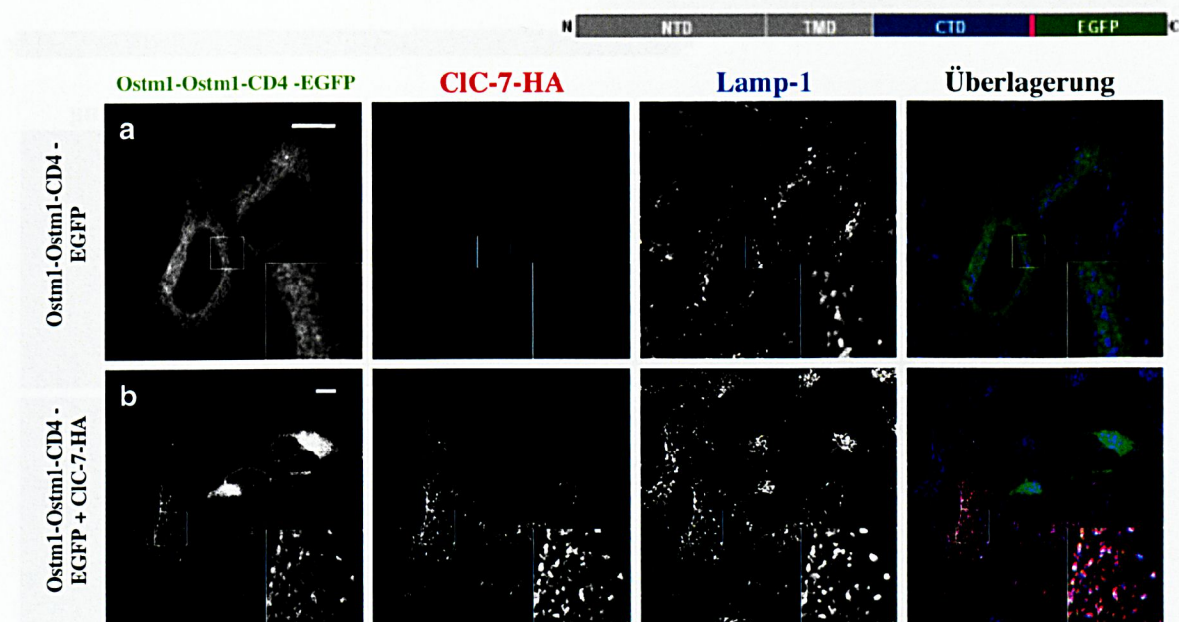


Abbildung 3.14: Subzelluläre Lokalisation von Ostm1-Ostm1-CD4-EGFP in Abhängigkeit von CIC-7 in HeLa-Zellen. a, Einzel-exprimiertes Ostm1-Ostm1-CD4-EGFP-Konstrukt ist retikulär und perinukleär in der Zelle verteilt. b, Bei Koexpression mit CIC-7-HA ist das Konstrukt hingegen zu Lysosomen verschoben, überlagert also letztendlich mit der Detektion von CIC-7 und Lamp-1- positiven Kompartimenten. Die Detektion erfolgte mit Antikörpern gegen Lamp-1 und HA für CIC-7-HA. Maßstab 10µm. 4-fache Vergrößerung des ausgewählten Quadrates.

CD4-CD4-Ostm1-EGFP

Das zelluläre Lokalisationsverhalten von CD4-CD4-Ostm1-EGFP gleicht wiederum dem des CD4. In Ab- und Anwesenheit von CIC-7 liegen die Konstrukte mit über 73% in der Plasmamembran vor (Abb. 3.16.a,b und Abb. 3.17). Folglich interagiert das CD4-CD4-Ostm1-Konstrukt nicht mit CIC-7.

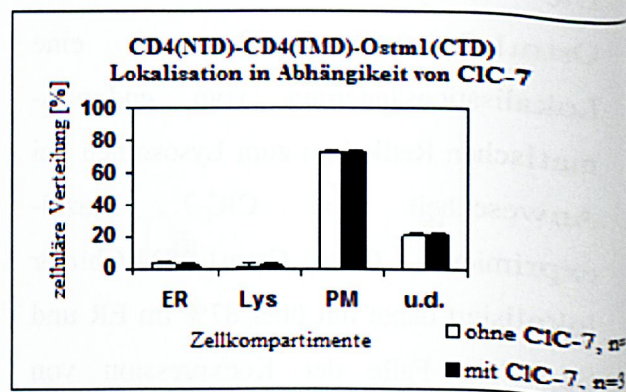


Abbildung 3.17.: Quantifizierung der CD4-CD4-Ostm1-EGFP-Lokalisation in Abhängigkeit von CIC-7-HA. Prozentuale Zuordnung der ermittelten zellulären Verteilung des Konstruktes zu den definierten Kompartimenten in Abhängigkeit von CIC-7. Das Konstrukt ist an der Plasmamembran lokalisiert, unabhängig von Einzel- oder Koexpression mit CIC-7. Die subzelluläre Verteilung ist nahezu identisch. Weiße Balken entsprechen Werten des Konstruktes ohne CIC-7-Expression, Schwarze Balken Werte des Konstruktes mit koexprimiertem CIC-7. Fehlerbalken zeigen Standardfehler. n, Anzahl der Versuchsdurchläufe (pro Versuchsdurchlauf mehr als 100 Zellen ausgewertet).

Schematische Darstellung des verwendeten Konstruktes, CD4-CD4-Ostm1-EGFP:

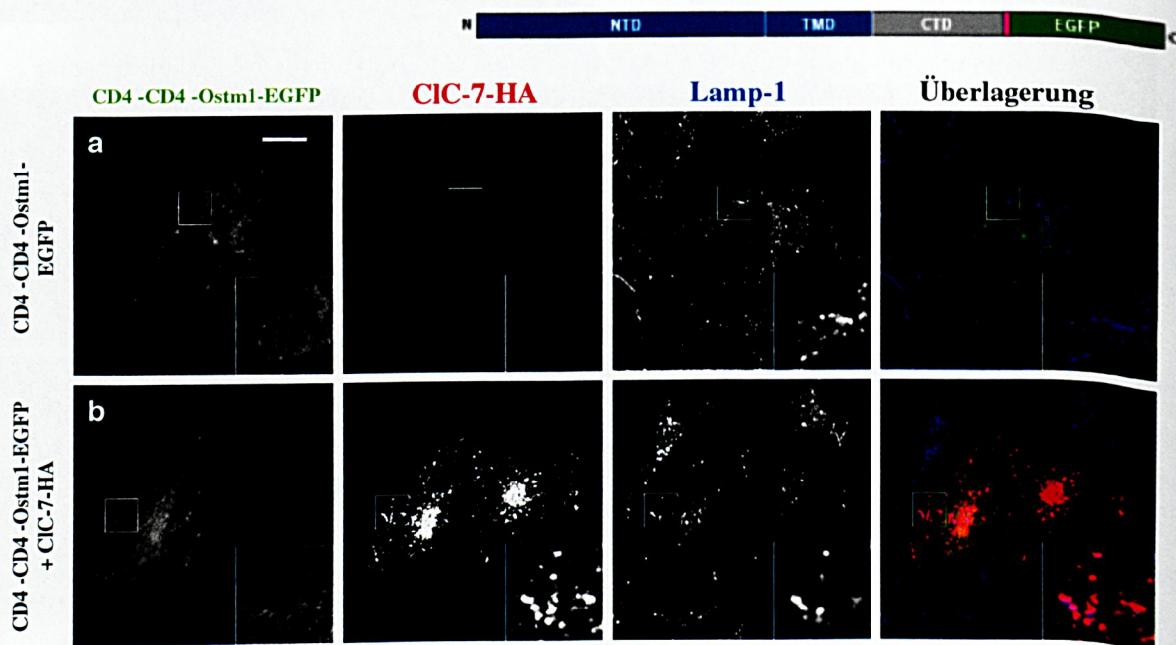


Abbildung 3.16: Subzelluläre Lokalisation von CD4-CD4-Ostm1-EGFP in Abhängigkeit von CIC-7 in HeLa-Zellen. a, b, CD4-CD4-Ostm1-EGFP-Konstruktes lokalisiert unabhängig von der Anwesenheit von CIC-7-HA in der Plasmamembran. Es ist also kein Lokalisationswechsel zu verzeichnen. b, CIC-7-HA colokalisiert erneut mit Lamp-1 positiven Strukturen. Die Detektion erfolgte mit Antikörpern gegen Lamp-1 und HA für CIC-7-HA. Maßstab 10µm. 4-fache Vergrößerung des ausgewählten Quadrates.

Ostm1-CD4-Ostm1-EGFP

Untersuchungen des Ostm1-CD4-Ostm1-Chimär ergaben eine Lokalisation an der Plasmamembran und im endoplasmatischen Retikulum unabhängig von koexprimiertem CIC-7 (Abb. 3.18.a,b und Abb. 3.19). Eine Colokalisation der Chimäre mit CIC-7 lag dabei nicht vor, so dass eine Interaktion zwischen beiden Proteinen ausgeschlossen werden kann.

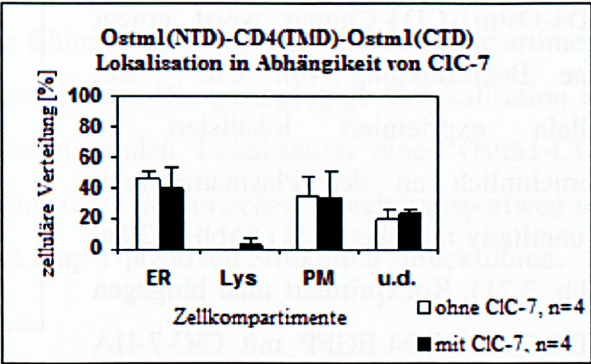


Abbildung 3.19: Quantifizierung der Ostm1-CD4-Ostm1-EGFP-Lokalisation in Abhängigkeit von CIC-7-HA. Prozentuale Zuordnung der ermittelten zellulären Verteilung des Konstruktes zu den definierten Kompartimenten in Abhängigkeit von CIC-7. Das Konstrukt ist sowohl im ER als auch an der Plasmamembran lokalisiert unabhängig CIC-7. Weiße Balken entsprechen Werten des Konstruktes ohne CIC-7-Expression, Schwarze Balken Werte des Konstruktes mit koexprimiertem CIC-7. Fehlerbalken zeigen Standardfehler. n, Anzahl der Versuchsdurchläufe (pro Versuchsdurchlauf mehr als 100 Zellen ausgewertet).

Schematische Darstellung des verwendeten Konstruktes, *Ostm1-CD4-Ostm1-EGFP*:

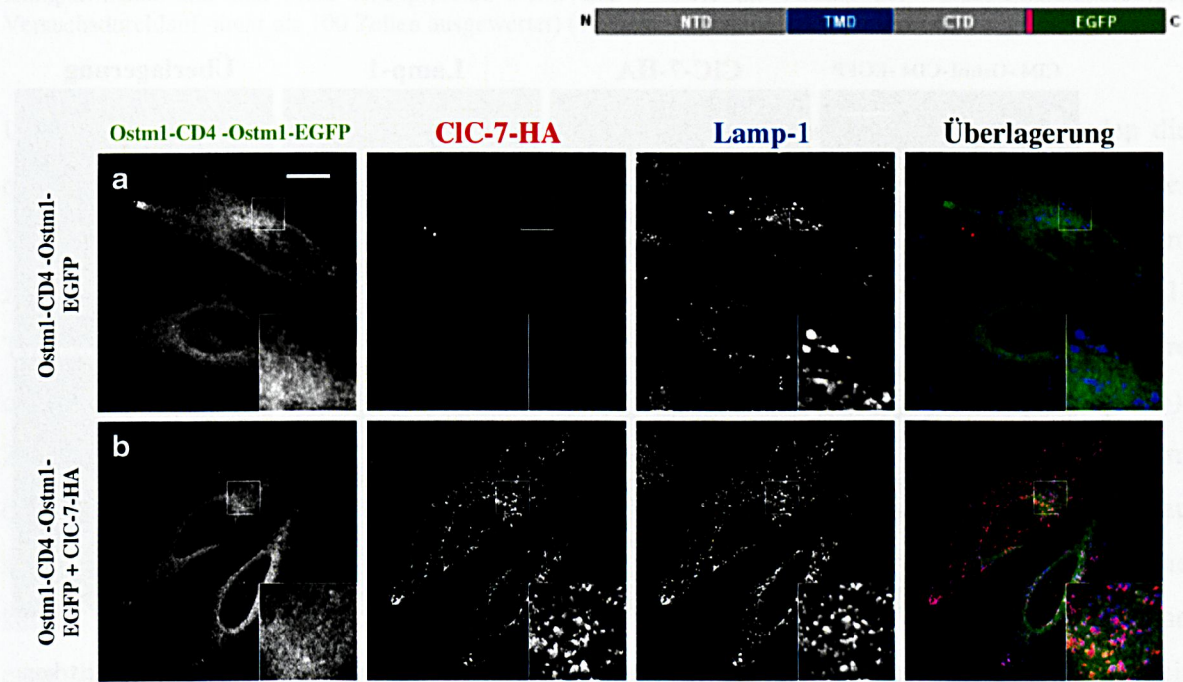


Abbildung 3.18: Subzelluläre Lokalisation von Ostm1-CD4-Ostm1-EGFP in Abhängigkeit von CIC-7 in HeLa-Zellen. a, b, Das Konstrukt liegt im ER (wie hier abgebildet) und in der Plasmamembran vor. Demzufolge ist kein Lokalisationswechsel bei Koexpression von CIC-7 zu sehen. b, CIC-7 colokalisiert mit Lamp-1. Die Detektion erfolgte mit Antikörpern gegen Lamp-1 und HA für CIC-7-HA. Maßstab 10µm. 4-fache Vergrößerung des ausgewählten Quadrates.

CD4-Ostm1-CD4-EGFP

Die Untersuchung der Lokalisation des CD4-Ostm1-CD4-Chimär weist erneut eine Beeinflussung von CIC-7 auf. Allein expriemiert lokalisiert es vornehmlich an der Plasmamembran (quantitativ mit über 71%) (Abb. 3.20.a, Abb. 3.21). Koexprimiert man hingegen CD4-Ostm1-CD4-EGFP mit CIC-7-HA kolokalisiert es mit CIC-7 in Lysosomen (Abb. 3.22.b). Demzufolge scheinen beide Proteine zu interagieren.

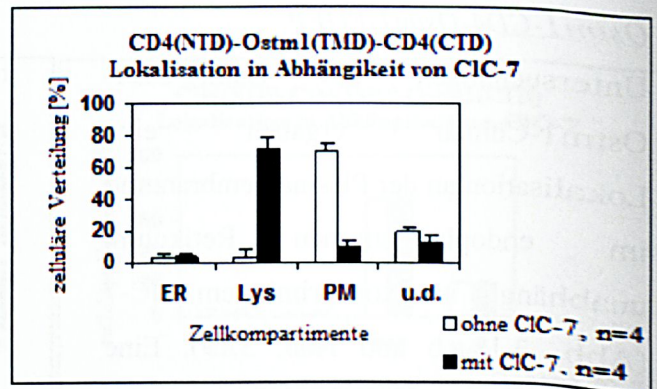


Abbildung 3.21: Quantifizierung der CD4-Ostm1-CD4-EGFP-Lokalisation in Abhängigkeit von CIC-7-HA. Prozentuale Zuordnung der ermittelten zellulären Verteilung des Konstruktes zu den definierten Kompartimenten in Abhängigkeit von CIC-7. Ersichtlich wird ein Lokalisationswechsel des Konstruktes vom ER ohne CIC-7 zu Lysosomen mit CIC-7. Weiße Balken entsprechen Werten des Konstruktes ohne CIC-7-Expression, Schwarze Balken Werte des Konstruktes mit koexprimiertem CIC-7. Fehlerbalken zeigen Standardfehler. n, Anzahl der Versuchsdurchläufe (pro Versuchsdurchlauf mehr als 100 Zellen ausgewertet).

Schematische Darstellung des verwendeten Konstruktes, CD4-Ostm1-CD4-EGFP:

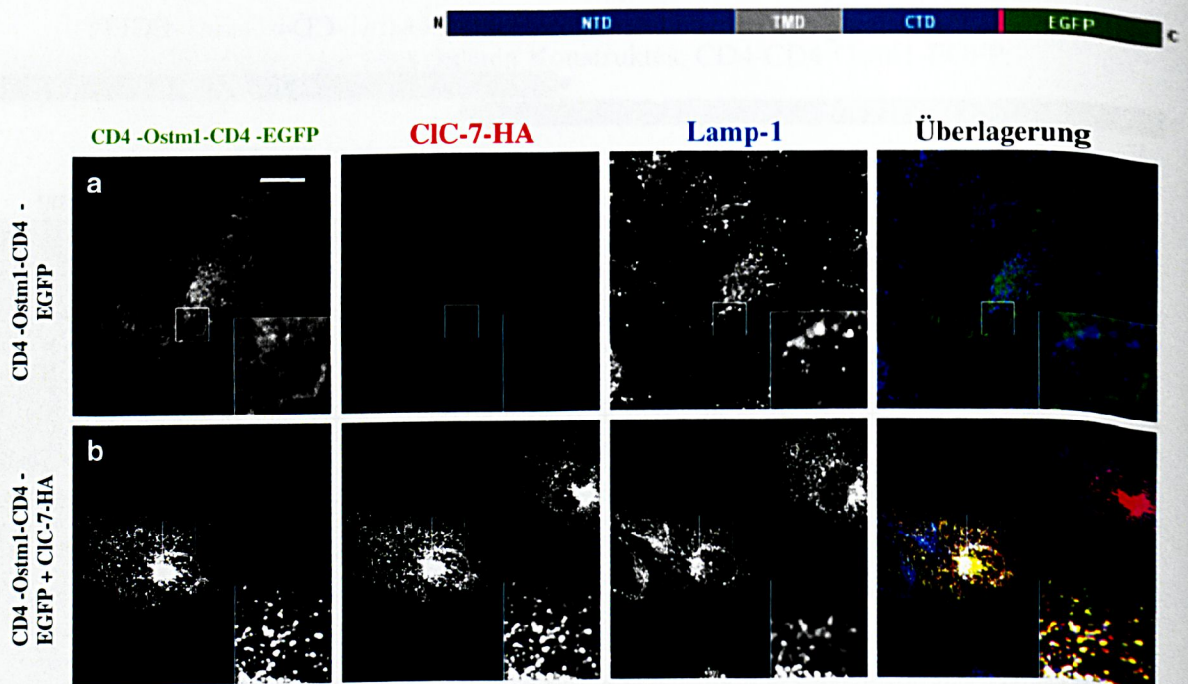


Abbildung 3.20: Subzelluläre Lokalisation von CD4-Ostm1-CD4-Ostm1-EGFP in Abhängigkeit von CIC-7 in HeLa-Zellen. Das Konstrukt CD4-Ostm1-CD4-Ostm1-EGFP weist ein Lokalisationswechsel in Abhängigkeit der Koexpression von CIC-7 auf. **a**, Bei Einzelexpression liegt es in der Plasmamembran vor und kolokalisiert nur minimal mit Lamp-1-positiven Strukturen. **b**, Koexprimiert mit CIC-7-HA hingegen kolokalisiert das Konstrukt mit Lamp-1 und CIC-7. Die Detektion erfolgte mit Antikörpern gegen Lamp-1 und HA für CIC-7-HA. Maßstab 10μm. 4-fache Vergrößerung des ausgewählten Quadrates.

In der nun folgenden Tabelle sind die Quantifizierungen der einzelnen Ostml-CD4-Chimäre bzgl. ihrer subzellulären Lokalisation in Ab- und Anwesenheit von CIC-7 zusammengefasst (Tab.3.1.). Die nicht 100%ige Zuordnung der Chimäre zu einem der vier Zellkompartimente erklärt sich vor allem durch Überexpressionsartefakte. Die geringfügige Colokalisation mit Lysosomen (kleiner 5%) im Falle der überwiegenden Lokalisation eines Ostml-CD4-Chimäras an der Plasmamembran, lässt sich auf den sekretorischen Proteintransportweg und der damit einhergehenden Colokalisation von Lamp-1-positiven Strukturen zurückführen.

Ostml-CD4-Chimäre, in Domänen + C-terminalen Tag		NTD	WT - Ostml		WT- CD4-		CD4-	Ostml-	Ostml-	CD4-	Ostml-	CD4-	Ostml-	CD4-	Ostml-	CD4-
		TMD					Ostml-	CD4-	Ostml-	CD4-	Ostml-	CD4-	Ostml-	CD4-	Ostml-	CD4-
		CTD					Ostml-	Ostml-	Ostml-	CD4-	Ostml-	Ostml-	Ostml-	Ostml-	Ostml-	CD4-
		Tag					EGFP									
n		3	3	4	4	4	4	4	4	3	4	4	3	4	4	4
CIC-7		-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
prozentuale Verteilung	Endopl. Retikulum	83,1	17,5	0	0	22,8	13,1	29,7	16,1	87,5	22,5	4,0	2,1	45,3	39,6	4,1
	Lysosomen	0,2	75,6	0	0,6	0	75,4	0	3,7	0	69,0	1,5	3,1	0,0	3,7	72,2
	Plasmamembran	2,1	0	90,0	74,7	56,9	2,5	51,8	52,1	1,0	0	73,5	73,8	35,1	32,8	71,6
	undefiniert	14,5	6,9	10,0	24,6	20,4	9,1	18,5	28,1	11,6	8,5	21,0	21,0	19,5	23,9	20,2

Tabelle 3.1: Übersicht – subzelluläre Verteilung der Ostml-CD4-Chimäre in Abhängigkeit von CIC-7. Zusammenfassung der einzelnen Quantifizierungen aus 3.2.2. der Ostml-CD4-Chimäre bzgl. ihrer subzellulären Lokalisation. Den Chimären, in Domänen aufgeteilt, sind die prozentualen Verteilungen auf definierte Kompartimente mit und ohne Koexpression von CIC-7 sowie die Anzahl der Versuchsdurchläufe (pro Versuchsdurchlauf mehr als 100 Zellen ausgewertet) (+/- bzw. n, grau unterlegt) zugeordnet.

Um die Ergebnisse der Lokalisationsuntersuchungen vergleichend darzustellen, wurden die quantitativ analysierten, lysosomalen Lokalisation der einzelnen Chimäre und der Wildtypkonstrukte in Abhängigkeit von CIC-7 in folgendem Balkendiagramm zusammengefasst (Abb. 3.22). Bei Koexpression von CIC-7 sind die Chimäre mit Ostml-Transmembrandomäne zu über 70% in Lysosomen lokalisiert. Hingegen zeigen die Chimäre ohne Ostml-Transmembrandomäne nur eine geringfügige lysosomale Lokalisation (< 10%). Zudem wurde ein gepaarter t-Tests mit zweiseitiger Verteilung durchgeführt, um entsprechend signifikante Abweichungen von WT-Ostml-EGFP mit CIC-7-HA zu analysieren. Auffallend ist, dass die Ostml-CD4-Chimäre mit Ostml-Transmembrandomäne keinen signifikanten Unterschied aufweisen. Die Chimäre mit CD4-Transmembrandomäne ergab sich jedoch ein signifikanter Unterschied, demzufolge kolokalisierten sie in Anwesenheit von CIC-7 nicht mit Lysosomen. Die Ergebnisse der Lokalisationsuntersuchungen deuten darauf hin, dass die Transmembrandomäne von Ostml die Interaktion mit CIC-7 ermöglicht.

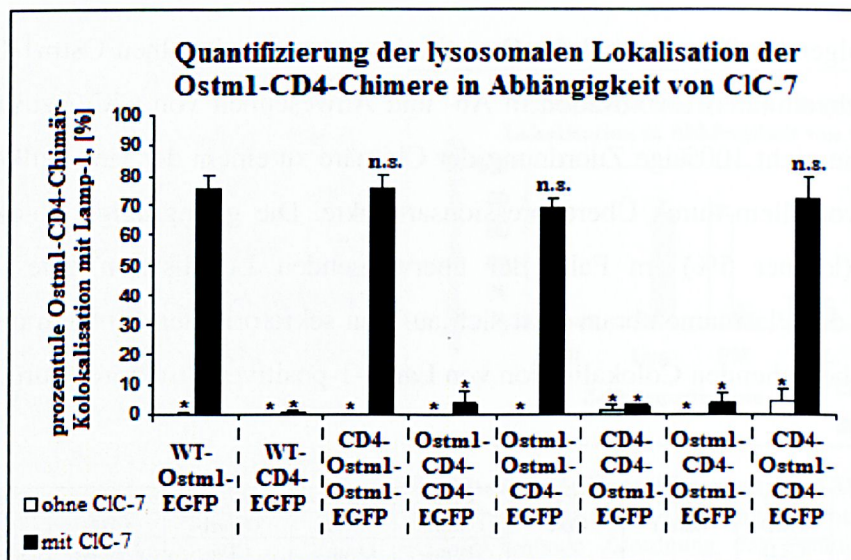


Abbildung 3.22: Quantifizierung der Ostml-CD4-Chimäre bzgl. ihrer lysosomalen Lokalisation in Abhängigkeit von CIC-7 Zusammenfassende graphische Darstellung für die lysosomale Verteilung der Konstrukte in Abhängigkeit von CIC-7. Prozentuale Zuordnung der ermittelten lysosomalen Verteilung der Konstrukte (Kokalisation mit Lamp-1 positiven Vesikeln) ohne (weiße Balken) und mit (schwarze Balken) Koexpression von CIC-7. Es wird deutlich, dass die Chimäre ohne Ostml-TMD signifikant von der lysosomalen Verteilung des WT-Ostml in Anwesenheit von CIC-7 abweichen. Die Konstrukte mit Ostml-TMD hingegen zeigen ähnliche lysosomale Lokalisationen wie WT-Ostml bei koexprimiertem CIC-7. In Abwesenheit von CIC-7 zeigen alle Konstrukte nur eine minimale Kokalisation mit Lamp-1, was einen bestehenden Lokalisationswechsel zu Lysosomen vergleichend verdeutlicht. Die Daten weisen darauf hin, dass die TMD von Ostml für den Lokalisationswechsel zu Lysosomen und damit für die Interaktion mit CIC-7 verantwortlich zu sein scheint.

Fehlerbalken zeigen Standardfehler. Gepaarter t-Test mit zweiseitiger Verteilung, Basismatrix WT-Ostml-EGFP mit CIC-7-HA, * $p < 0,01$; n.s., nicht signifikant.

3.1.2.3 Quantifizierung der Ostml-CD4-Chimäre bezüglich ihrer retikulären Lokalisation in Abwesenheit von CIC-7

Da WT-Ostml ohne CIC-7 im ER zurückgehalten wird, ist es interessant, den Mechanismus der Retention von Ostml genauer zu untersuchen. Um das Retentionsverhalten von Ostml bzgl. seiner Domänen studieren zu können, wurde in folgender graphischen Darstellung (Abb. 3.23) die retikuläre Lokalisation der Ostml-CD4-Chimäre ohne CIC-7 (Ergebnisse aus 3.1.2.2) abgebildet. Die Abbildung veranschaulicht, dass nur das Wildtyp-Ostml und das Ostml-Ostml-CD4-Chimär nahezu vollkommen im ER zurückgehalten werden. Auch der gepaarte t-Test mit zweiseitiger Verteilung zeigte, ausgenommen für Ostml-Ostml-CD4-EGFP, eine signifikante Abweichung ($p < 0,02$) der Ostml-CD4-Chimäre von Ostml-EGFP bzgl. ihrer retikulären Lokalisation. Aus den Untersuchungen der Ostml-CD4-Chimär-Lokalisation lässt sich also schlussfolgern, dass der C-Terminus von Ostml nicht zur Retention von Ostml beiträgt.

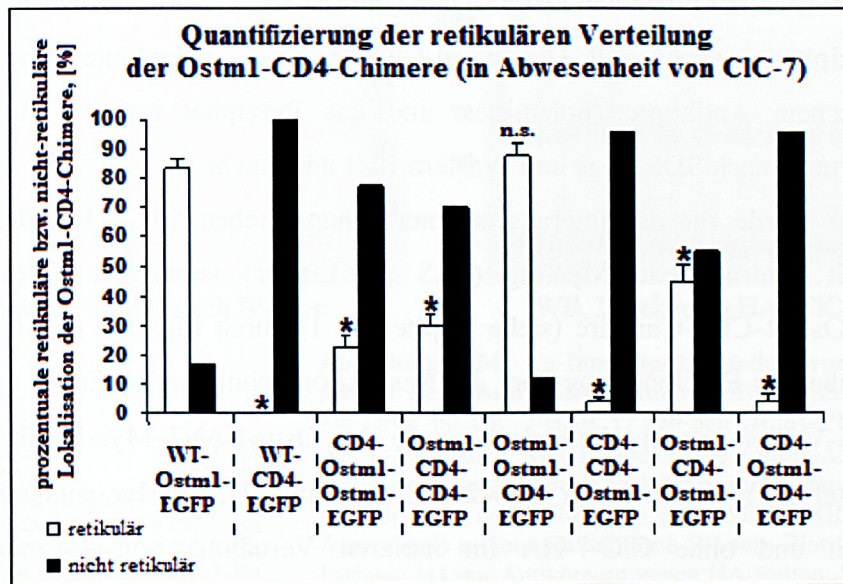


Abbildung 3.23: Quantifizierung der Ostml-CD4-Chimäre bzgl. ihrer retikulären Lokalisation in Abwesenheit von CIC-7 Zusammenfassende graphische Darstellung für die subzelluläre Verteilung Ostml-CD4-Chimäre in Abwesenheit von CIC-7. Prozentuale Zuordnung der ermittelten retikulären (weiße Balken) und nicht-retikulären Verteilungen (schwarze Balken) der einzelexprimierten Konstrukte. Alle Ostml-CD4-Chimäre, außer dem Ostml-Ostml-CD4-Chimär, weisen eine signifikante Abweichung zur retikulären Verteilung des WT-Ostml-EGFP in Abwesenheit von CIC-7 auf. Folglich wird neben dem WT-Ostml, nur das Ostml(NTD)-Ostml(TMD)-CD4(CTD)-EGFP-Konstrukt im ER zurückgehalten, alle anderen liegen in anderen Kompartimenten der Zelle lokalisiert vor. Fehlerbalken zeigen Standardfehler. Gepaarter t-Test mit zweiseitiger Verteilung, Basismatrix WT-Ostml-EGFP, * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; n.s., nicht signifikant.

3.2 Interaktionsuntersuchungen zwischen Ostml-CD4-Chimären und CIC-7 mittels Co-Immunopräzipitation, GST-Pulldown und FRET

Mit den nun folgenden Methoden soll erneut die Interaktionsdomäne von Ostml analysiert werden, um die Ergebnisse der Lokalisationsuntersuchungen zu bestätigen. Mit Hilfe der biochemischen Methode Co-Immunopräzipitation sollen zunächst alle generierten Ostml-CD4-Chimäre auf CIC-7 Interaktion untersucht werden. Der anschließend dargestellte GST-Pulldown dient als Negativkontrolle, der ausbleibenden Interaktion zwischen GST-fusioniertem Ostml-CT und CIC-7. Schließlich wurden ausgewählte Ostml-CD4-Chimäre mit CIC-7 auf FRET untersucht.

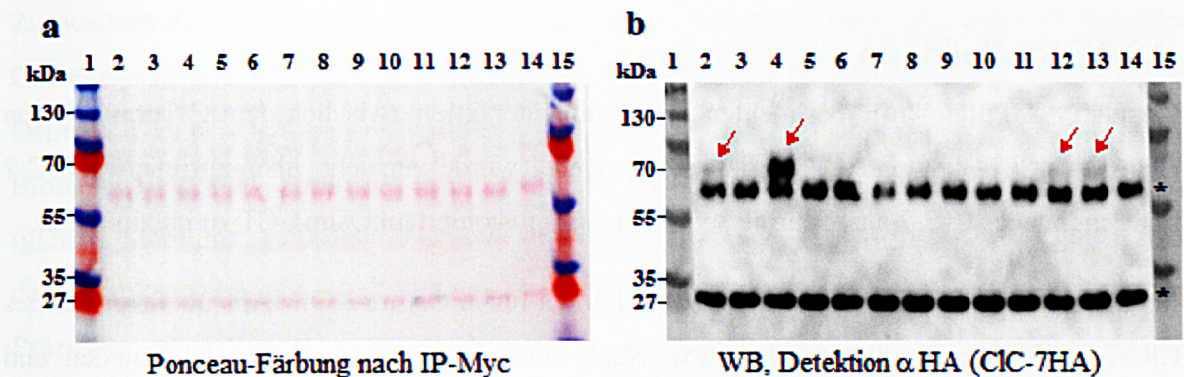
3.2.1 Co-Immunopräzipitation

Um die Interaktion der einzelnen Ostml-Domänen mit CIC-7 zu untersuchen, wurde die Co-Immunopräzipitation angewandt. Dazu wird CIC-7 bzw. das potentielle Ostml-CD4-Chimär mit spezifischem Antikörper präzipitiert und das Präzipitat auf die Anwesenheit des Bindungspartners nach SDS-Page und Western Blot untersucht.

Experimentel wurde für die Interaktionsuntersuchung neben CIC-7-HA die Ostml-CD4-Chimäre mit C-terminalem Myc-tag (3AS als Linker) verwendet. Dafür wurden die generierten Ostml-CD4-Chimäre (siehe Kapitel 3.1.1) durch Ligation mit dem Myc-Epitop und anschließender Einklonierung über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *NotI* in den pcDNA3.1+-Vector erstellt. Außerdem wurde das Ostml-ΔNT-Myc-Konstrukt verwendet (siehe Kapitel 3.4). Nun wurden HEK293-Zellen mit cDNA Myc-getagter Ostml-CD4-Chimäre mit und ohne CIC-7-HA im molaren Verhältnis von 1:4 transfiziert. Nach Expression und Zelllyse erfolgte die Präzipitation mit an Protein-G-Sepharose gekoppelten Antikörpern, wobei in zwei verschiedenen Versuchsansätzen, je nach verwendeten Antikörper (anti-HA bzw. anti-Myc), zuerst einer der beiden potentiellen Interaktionspartner durch direkte Bindung an den Antikörper-Protein-G-Sepharose Komplex präzipitiert wurde. Bei gegebener Bindung des kotransfizierten Interaktionspartners an das präzipitierte Protein, kann jenes nach SDS-PAGE durch Immundetektion im Western Blot visualisiert werden.

Am Beispiel der Immunopräzipitation mittels eines gegen Myc-Epitope gerichteten Antikörpers sollen die folgenden Ergebnisse repräsentativ für die besprochene Analyse stehen. In diesem speziellen Fall wurden 2 µg Ostml-CD4-Chimär cDNA und 8 µg CIC-7-HA cDNA transfiziert (bei Einzeltransfektion wurde mit entsprechendem Leervektor auf 10 µg "aufgefüllt"). Nach einer Expressionszeit von 24 Stunden und anschließender Zelllyse wurden die Ostml-CD4-Chimäre (mit C-terminalen Myc-tag) mit anti-Myc-Antikörper-Protein-G-Sepharose-Komplexen aus dem Zellextrakt präzipitiert. Schließlich wurden 40 µl der in 2xProbenpuffer mobilisierten Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach Western Blot und Poncau-Färbung mit HA-Antikörpern detektiert (Abb. 3.24).

Neben den beiden unspezifischen Banden bei etwa 65 kDa und 27 kDa, zeichnen sich vor allem in den Spuren 2, 4, 12 und 13 offensichtlich die für CIC-7-HA spezifische Banden bei ca. 70 kDa ab. Demzufolge wurde CIC-7-HA durch WT-Ostml (Spur 2 und 13), Ostml-Ostml-CD4-Myc (Spur 4) und Ostml-ΔNT (Spur 13) präzipitiert. Da eine Interaktion zwischen CIC-7 und Ostml-Ostml-CD4-Myc gegeben ist und zugleich eine Präzipitation von CIC-7-HA durch CD4-CD4-Ostml-Myc ausblieb (Spur 5), kann man die Interaktion



C Auftragung:

Spuren	1	Proteinmarker	
	2	WT-Ostm1-Myc	+ CIC-7 -HA
	3	WT-CD4-Myc	+ CIC-7 -HA
	4	Ostm1-Ostm1-CD4-Myc	+ CIC-7 -HA
	5	CD4-CD4-Ostm1-Myc	+ CIC-7 -HA
	6	CD4-Ostm1-CD4-Myc	+ CIC-7 -HA
	7	Ostm1-CD4-Ostm1-Myc	+ CIC-7 -HA
	8	CD4-Ostm1-Ostm1-Myc	+ CIC-7 -HA
	9	Ostm1-CD4-CD4-Myc	+ CIC-7 -HA
	10	-	CIC-7 -HA
	11	pcDNA3.1.(+)-Vector	+ CIC-7 -HA
	12	Ostm1-ΔNT-Myc	+ CIC-7 -HA
	13	WT-Ostm1-Myc	+ CIC-7 -HA
	14	-	-
	15	Proteinmarker	

Abbildung 3.24: Co-Immunpräzipitation von CIC-7-HA mittels der Ostm1-CD4-Chimäre HEK293-Zellen wurden mit DNA für CIC-7-HA(CT) und den Ostm1-CD4-Chimären mit C-terminalen Myc-Epitop sowie Ostm1-ΔNT-Myc(CT) transfiziert. Eluate wurden nach Immunpräzipitation gegen das Myc-Epitop der Chimäre per SDS-PAGE (10%iges Agarosegel) aufgetrennt und nach Western Blot und Ponceau-Färbung (a) mit Antikörpern gegen HA-Epitop detektiert (b). Die Ponceau-Färbung zeigt dabei die äquivalente Auftragung der Präzipitate. (Die Beladung des Gels ist in c dargestellt.) b, In den Spuren 2, 4, 12 und 13 ist eine Bande bei etwa 70 kDa (Pfeile), welche in den Kontrollen fehlt (Spuren 10,11,14). Folglich Copräzipitierte CIC-7-HA mit dem WT-Ostm1-Konstrukt, Ostm1(NTD)- Ostm1(TMD)- CD4(CTD)- Myc(CT) und Ostm1-ΔNT-Myc.

* unspezifische Bande.

zwischen CIC-7 und Ostm1 auf den N-Terminus und die Transmembrandomäne von Ostm1 begrenzen. Auch der N-Terminus von Ostm1 kann als Interaktionsdomäne ausgeschlossen werden, da CIC-7 mit dem Ostm1-ΔNT interagiert und CIC-7-HA durch Ostm1-CD4-CD4-Myc (Spur 9) und Ostm1-CD4-Ostm1-Myc (Spur 7) nicht präzipitiert wurde. Folglich lässt sich die Interaktionsdomäne von Ostm1 auf seine Transmembrandomäne reduzieren. Die Ergebnisse der Co-Immunopräzipitation deuten wiederum darauf hin, dass die Ostm1-Transmembrandomäne die Interaktion mit CIC-7 ermöglicht.

Da jedoch die Inputkontrolle, die Detektion von CIC-7-HA und der Ostm1-CD4-Chimäre fehlt, ist eine ausbleibende Präzipitation von CIC-7-HA durch eine nicht erfolgte Expression eines Interaktionspartners nicht auszuschließen. Zudem hätten die Konstrukte mit Ostm1 als TMD in der Spur 6 bzw. 8 nach den gegebenen Resultaten ebenso CIC-7-HA präzipitieren sollen.

Kontrollen: Koexpression von CIC-7-HA und CD4-Myc (Spur 3), Einzelexpression von CIC-7-HA (Spur 10), Koexpression von CIC-7-HA mit pcDNA3.1.+(Leer-)Vector (Spur 11), untransfiziert (Spur 14)

3.2.2 GST-Pulldown

Mittels GST-Pulldown-Experimenten wurde die Interaktion zwischen dem C-Terminus von Ostml(AS 307-328) und CIC-7 untersucht. Dabei wurde versucht, überexprimiertes CIC-7 bzw. endogenes CIC-7 aus Gehirnlysaten mit GST-fusioniertem Ostml-CT zu präzipitieren.

In einem ersten Versuch wurde der GST-Pulldown für in Ostml-KO-MAFs überexprimiertes CIC-7-EGFP durchgeführt (Abb. 3.25). Nach einer Expressionszeit von 24 Stunden und anschließender Zelllyse wurden Proteinextrakte mit Glutathion-Sepharose gekoppelten GST bzw. GST-fusioniertem Ostml-CT inkubiert. Anschließend wurden die gebundenen Proteine eluiert und neben den Proteinlysaten untransfizierter und CIC-7-EGFP-transfizierter Ostml-KO-MAF-Zellen mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Western Blot wurde CIC-7-EGFP mit EGFP-Antikörpern detektiert. Dabei zeigen nur die Spuren eine Bande bei ca. 110 kDa in denen Proteinlysate CIC-7-EGFP-transfizierter Zellen aufgetragen wurden. Hingegen blieb eine CIC-7 Detektion in den Spuren aufgetragener Proteinextrakte untransfizierter Zellen bzw. im GST-Pulldown präzipitierter Proteine aus. Außerdem wurde nach Strippen der gleichen Membran auf die $\mu 2$ -Untereinheit des AP2-Komplexes (AP-50) durch Detektion getestet, welches eine spezifische Bande bei 50 kDa in allen Spuren außer der Spur mit an Glutathion-Sepharose gekoppeltem GST gebundenen Proteine. Da AP-2 mit dem Ostml-CT interagiert (nach unveröffentlichten Daten der AG Jentsch) erklärt sich die spezifische Detektion seiner $\mu 2$ -Untereinheit im an Glutathion-Sepharose gekoppeltem GST-Ostml-CT Präzipitat. (nicht gezeigt: Eine Ponceau-Färbungen nach erfolgtem Western Blot diente als Kontrolle des Einsatzes gleicher Mengen an GST-Proteinen bzw. Gewebelysaten.)

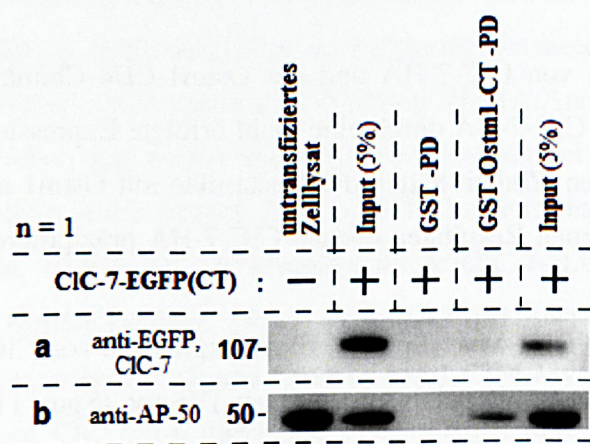


Abbildung 3.25: GST-Pulldown: CIC-7-Präzipitation mittels GST-Ostml-CT Ostml-KO-MAFs wurden mit DNA für CIC-7-EGFP transfiziert. Nach Präzipitation mit an Glutathion-Sepharose gekoppelten GST bzw. GST-Ostml-CT (AS307-328) erfolgte die Auftrennung der Lysate und Eluate per SDS-PAGE. Anschließend wurden nach Western Blot mit Antikörpern gegen EGFP (CIC-7) und $\mu 2$ der Untereinheit von AP-2 detektiert. Im Input-Lysat mit exprimiertem CIC-7-EGFP konnten sowohl CIC-7 als auch $\mu 2$ (AP-50) nachgewiesen werden. Im Lysat von untransfizierten Zellen ließ sich hingegen nur $\mu 2$ nachweisen. Auch zeigte die Spur mit Präzipitat an Glutathion-Sepharose gekoppeltem GST-Ostml-CT eine $\mu 2$ spezifische Bande. n, Anzahl der Versuche

Zur weiteren Analyse der Interaktion zwischen dem C-Terminus von Ostm1 und CIC-7 wurden Gewebelysate aus WT-Mausgehirnen hergesellt und CIC-7 versucht mit an GST-fusioniertem Ostm1-CT zu präzipitieren. Wiederum ließ sich CIC-7 nur in der Inputkontrolle des Western Blots bei 70 kDa nachweisen (Abb. 3.26). Die Detektion von der μ 2a Untereinheit von AP-2 (gleiche Membran, gestrippt) hingegen zeigte neben einer spezifischen Bande bei 50 kDa in der Inputkontrolle des GST-Ostm1-CT-Pulldowns, auch eine sehr schwache Bande im Präzipitat an GST-fusioniertem Ostm1-CT. Außerdem weist die Ponceau-Färbung als Kontrolle den Einsatz gleicher Mengen an GST-Proteinen nach.

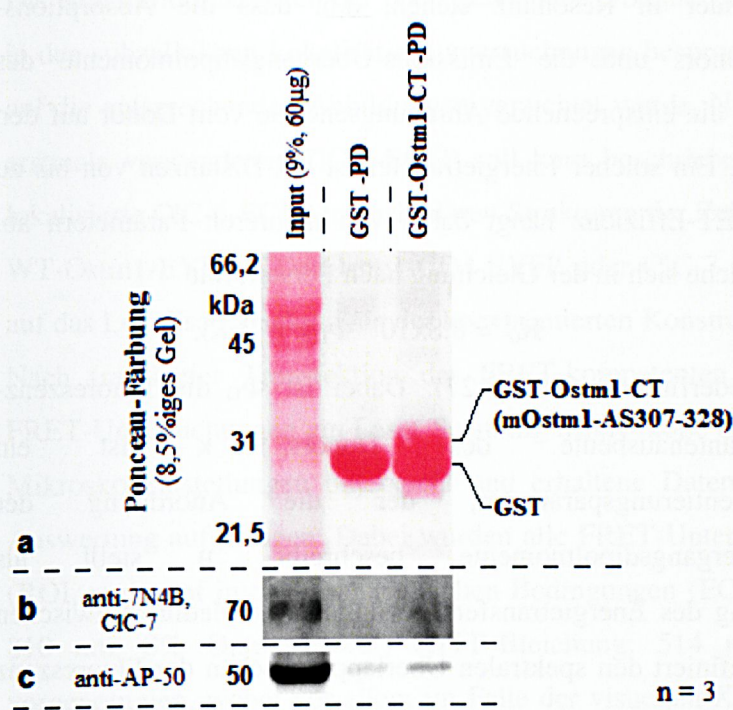


Abbildung 3.26: GST-Pulldown: CIC-7- Präzipitation mittels GST-Ostm1-CT aus Gehirnllysaten
 Gewebelysate aus WT-Mausgehirnen wurden nach Präzipitation mit an Glutathion-Sepharose gekoppeltem GST bzw. GST-Ostm-CT (AS307-328), zusammen mit Input-Lysat per SDS-PAGE aufgetrennt und nach Western Blot mit Antikörpern gegen CIC-7(a) und μ 2 der Untereinheit von AP-2 (b) detektiert. Im Input-Lysat konnte CIC-7 und μ 2 nachgewiesen werden. Eine CIC-7-Detektion blieb hingegen in den Präzipitaten des GST-Pulldown aus. Zudem konnte μ 2 an Glutathion-Sepharose gekoppeltem GST-Ostm-CT gebundenen Proteinen nachgewiesen werden. Die Ponceau-Färbung zeigt die äquivalente Auftragung der Präzipitate bzw. GST-Proteine. n, Anzahl der Versuche (Exemplarisches Ergebnis von drei unabhängigen Durchführungen)

Die Ergebnisse beider GST-Pulldowns deuten darauf hin, dass die C-terminale Domäne von Ostm1 nicht zur Interaktion mit CIC-7 beiträgt, da eine Detektion von CIC-7 an GST-fusioniertem Ostm1-CT gebundenen Proteinen ausblieb. Dabei diente die Detektion der μ 2a Untereinheit von AP-2 als Kontrolle der Funktion des Pulldown.

3.2.3 FRET-Untersuchungen

Neben den Lokalisationsuntersuchungen, sowie (Co-)Immunopräzipitationen und GST-Pulldown ermöglicht auch der so genannte Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) die Analysen von Wechselwirkung zwischen Proteinen. Mittels FRET können zudem Distanzen zwischen Proteinen bestimmen werden. In einem typischen FRET-Experiment wird das zu untersuchende "Proteinpaar" mit einem Donor- bzw. einem Akzeptor-Fluorophor verknüpft. Bei vorhandenem FRET überträgt ein angeregter Donor-Chromophor einen Teil seiner Elektronenanregungsenergie strahlungslos, in Form einer intermolekularen *long range* Dipol-Dipol-Kopplung auf einen geeigneten Akzeptor. Dabei müssen die Singulett-Singulett-Übergänge der Sonden miteinander in Resonanz stehen, d.h. dass die Absorptions-Übergangsdipolmomente des Donors und die Emissions-Übergangsdipolmomente des Akzeptors gekoppelt sind, so dass die entsprechende Anregungsenergie vom Donor auf den Akzeptor übertragen werden kann. Ein solcher Energietransfer ist bei Distanzen von bis zu 10nm (100 Å) möglich. Die FRET-Effizienz hängt dabei von mehreren Parametern ab,

welche sich in der Gleichung nach Förster, mit

$$E_{\text{FRET}} = \frac{1}{1 + \left(\frac{R}{R_0} \right)^6}$$

Abbildung 3.27: Gleichung nach Förster, zur Bestimmung der FRET-Effizienz, E_{FRET} .

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-23} \Phi_D \kappa^2 \eta^{-4} J(\lambda),$$

wiederfinden (Abb. 3.27). Dabei ist Φ_D die Fluoreszenz-Quantenausbeute des Donors, κ ist ein Orientierungsparameter, der die Anordnung der Übergangsdipolmomente beschreibt, η stellt als

Refraktionsindex die Beeinflussung des Energietransfers bezüglich des Mediums zwischen den Fluorophoren dar, und $J(\lambda)$ definiert den spektralen Überlapp zwischen der Fluoreszenz des Donors und der Absorption des Akzeptors. Aus der Förster-Gleichung kann man folgern, dass Intensität des FRET-Signals mit der 6. Potenz des Abstands beider Fluorophore abnimmt. Der Förster-Radius R_0 beschreibt die Distanz bei dem die Transfer-Effizienz zwischen Donor und Akzeptor 50% beträgt ([Förster, 1948], [Lakowicz, 1999]) (Abb. 3.31).

In diese Arbeit wurden das Fluorophorenpaar YFP als Akzeptor (*yellow fluorescent protein*) und CFP (*cyan fluorescent protein*) als Donor verwendet, um einen Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) zu ermöglichen. Der Förster-Radius R_0 des Fluorophorenpaares beträgt 4,9. nm. Der Nachweis von FRET erfolgte hierbei durch Messen der CFP-Emmission vor und nach Akzeptorbleichung. In diesem Prozess wird der Akzeptorfluorophor lichtinduziert irreversibel zerstört, so dass ein vorher gegebener Energietransfer von Donor zu Akzeptor unterbunden wird [Gadella und Jovin, 1995].

FRET dient in dieser Arbeit primär als zusätzliche Methode zur Prüfung vorliegender Versuchsergebnisse, dass die Ostml-TMD für die Interaktion zwischen Ostml und CIC-7 verantwortlich ist. Deshalb wurde die Auswahl der zu analysierenden Interaktionspartner limitiert. Untersucht wurde FRET zwischen den Donoren CIC-7-CFP (CT) bzw. CIC-6-CFP (CT) und den Akzeptoren WT-Ostml-YFP(CT), CD4-Ostml-CD4-YFP(CT) und CIC-7-YFP (CT). Zur Generierung von WT-Ostml-YFP bzw. CD4-Ostml-CD4-YFP wurden die Ostml-Chimäre (siehe Kapitel 3.1.1) durch Restriktionsverdau und anschließender Einklonierung über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *Sall* mit EYFP, im Vector pEYFP-N3, „getagt“.

Die Immunfluoreszenzen der oben genannten Proteine zeigten gleiches Verhalten wie schon in den subzellulären Lokalisationsuntersuchungen besprochen (siehe Kapitel 3.1.2.2), so dass auf die entsprechenden Abbildungen verzichtet wurde. Nur die subzelluläre Lokalisation des erstmals verwendeten CIC-6-ECFP soll kurz beschrieben werden. In Immunfluoreszenzen lokalisierte CIC-6-ECFP in vesikulären Strukturen der Zelle, unabhängig von koexprimiertem WT-Ostml-EYFP, CD4-Ostml-CD4-EYFP oder CIC-7-YFP. Auch hatte es keinen Einfluß auf das Lokalisationsverhalten der koexprimierten Konstrukte.

Nach transienter Transfektion der FRET-kompetenten Proteine in HeLa-Zellen wurden FRET-Untersuchungen am Laser Scanning Mikroskope LSM 510 (Zeiss) mit entsprechenden Mikroskopeinstellungen untersucht und erhaltene Daten in graphischen Darstellungen zur Auswertung aufgetragen. Dabei wurden alle FRET-Untersuchungen in gleichgroßen Arealen (ROI, region of interes) unter gleichen Bedingungen (ECFP-Anregung: Zwei-Photonenlaser, 810 nm, 8% Output-Power; EYFP-Bleichung: 514 nm, 1 min, 100% Output-Power) vorgenommen, wobei vor allem im Falle der visuellen Koloalisation jene Areale bevorzugt gemessen wurden. Folgend wurden die FRET-Resultate getrennt vom verwendeten Donor, CIC-7-ECFP bzw. CIC-6-ECFP (als Kontrolle) betrachtet. Dabei wurden zunächst die Emissionsintensitäten definierter Wellenlängen vor und nach dem Bleichen in Einzel- und Kotransfektion graphisch dargestellt und anschließend eine zusammenfassende Quantifizierung der FRET-Effizienz vorgenommen. Zur Auswertung der YFP-Fluoreszenzänderung wurden die Emissionsintensitäten auf den entsprechenden Intensitätswert von 479 nm (vor bzw. nach dem Bleichen) normalisiert. Um Aussagen zu CFP-Fluoreszenzänderung treffen zu können, wurden die Emissionsintensitäten vor und nach dem Bleichen auf die Intensität von 479 nm vor dem Bleichen normalisiert. Letztere Emissionsintensitäten wurden zur Berechnung der FRET-Effizienz verwendet, wobei die gemittelten Emissionsintensitäten im Bereich von 436 nm – 498 nm einbezogen wurden.

Die FRET-Messungen von CIC-7-ECFP ergab eine für ECFP typische Emissionskurve vor und nach Bestrahlung bei 514 nm ("Bleichen"), mit den Maxima bei 468 nm und 500 nm (Abb. 3.28.b). Auffällig ist jedoch die drastische Abnahme der CFP-Fluoreszenz nach dem Bleichen (Abb. 3.32.a), welche gemittelt bei 13,6% liegt (Abb. 3. 28.i) und dementsprechend bei der Auswertung von FRET-Untersuchungen bei Koexpression berücksichtigt werden muss. Die bei den FRET-Messungen von koexprimierten CIC-7-ECFP und Ostml-EYFP resultierende Emissionskurve vor dem Bleichen des Akzeptors, hat einen für FRET zwischen ECFP und EYFP charakteristischen Verlauf. Dabei liegen die Emissionskurven von CFP (Maxima bei 468 nm und 500 nm) und YFP (Maximum bei 532 nm) übereinander gelagert vor. Nach dem Bleichen des Akzeptors ist auch hier wieder eine Abnahme der CFP-Fluoreszenz ersichtlich (Abb. 3.28.c). Außerdem wird die Zerstörung des Akzeptorfluorophors nach Bleichen durch die YFP-Fluoreszenzabnahme deutlich (Abb. 3. 28.d). Die Untersuchungen des FRET-Verhaltens zwischen CD4-Ostml-CD4-EYFP und CIC-7-ECFP ergaben ähnlich Resultate. Vor dem Bleichen ist ein FRET-typischer Emissionskurvenverlauf zusehen, welcher nach dem Bleichen auf den CFP typischen Emissionskurvenverlauf zurück fällt. Auch ist eine Abnahme der CFP-Fluoreszenz zu beobachten (Abb. 3.28.e). Mit CIC-7-EYFP koexprimiertes CIC-7-ECFP zeigt ein deutliches FRET-Signal. Neben der CFP-Emission zeichnet sich eine starke YFP-Emission ab, wobei letztere wiederum nach Bleichen ausbleibt (Abb. 3.28.h). Es wird aber eine geringfügige Zunahme der CFP-Fluoreszenz deutlich (Abb. 3.28.g).

Die FRET-Effizienzen der einzelnen Akzeptoren bezüglich des Donors CIC-7-ECFP wurden ermittelt (Abb. 3. 28.i). Da CIC-7-ECFP nach "Bleichen" selbst stark an Fluoreszenz verloren hat, muss jene Abnahme zu den einzelnen FRET-Effizienzen addiert werden. So beträgt die FRET-Effizienz zwischen CIC-7-ECFP und Ostml-EYFP ca. 11%, zwischen CIC-7-ECFP und CD4-Ostml-CD4-EYFP etwa 8% und zwischen CIC-7-ECFP und CIC-7-EYFP knapp 20% (Abb. 3.30). Das Vorhandensein des FRET-typischen Emissionkurvenverlaufes sowie die FRET-Effizienzen deuten darauf hin, dass eine Interaktion der betrachteten Proteinpaaire besteht.

Zusätzlich wurde die Emission der einzeltransfizierten YFP-Konstrukte unter gleichen Bedingungen detektiert und graphisch dargestellt, um eine Anregung des YFP ohne CFP ausschließen zu können (Abb. 3. 28.j-l). Dabei wurden die Emissionsintensitäten des exprimierten YFP-Konstruktes auf die gemittelte Emissionsintensität bei 479 nm vor Bleichen

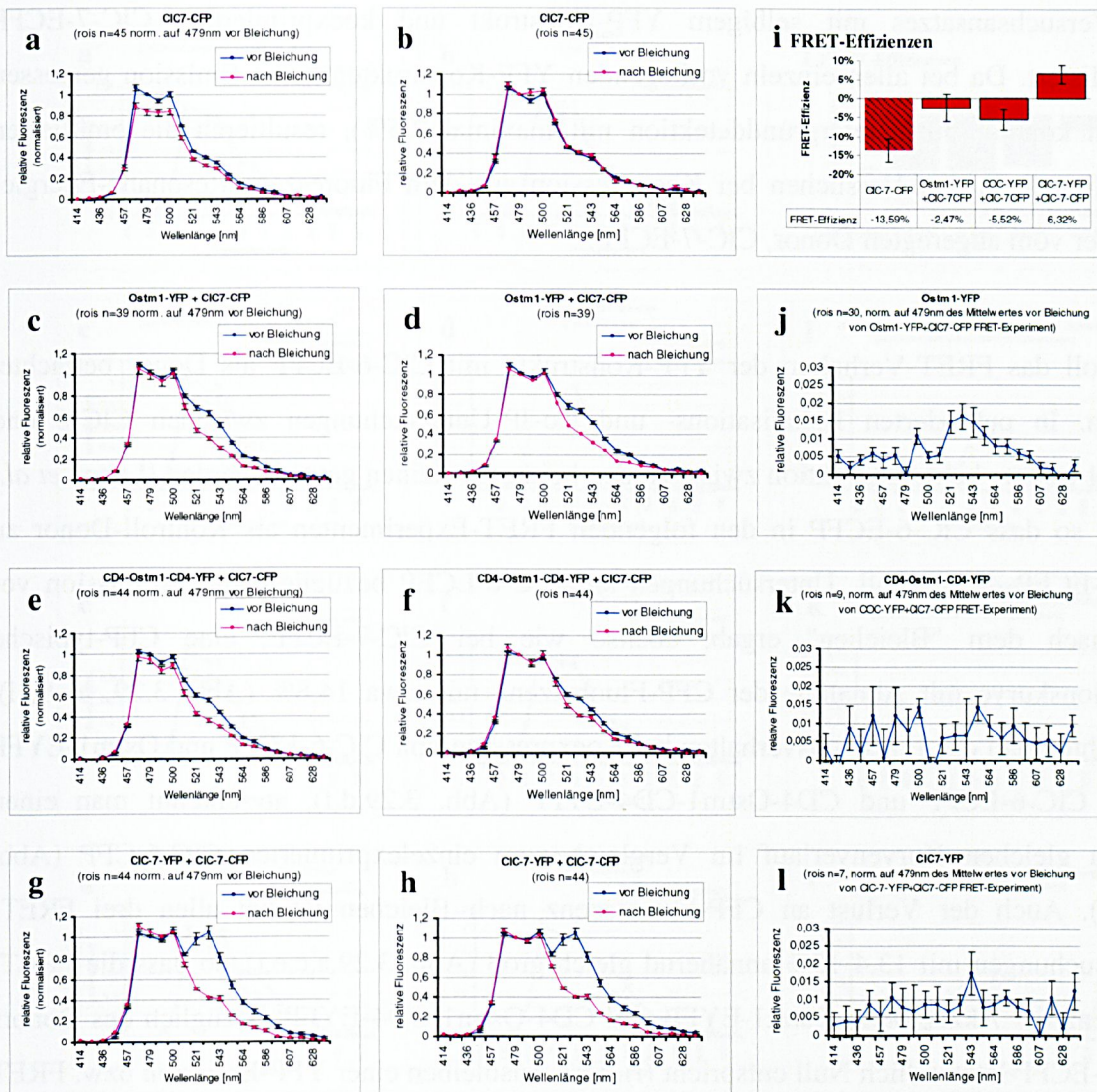


Abbildung 3.28: In vivo-FRET-Analysen zwischen CIC-7-CFP-Donor und potentiellen YFP-Akzeptor-Konstrukten in HeLa-Zellen a-h Nach Transfektion der cDNAs des Donorfluorophors, CIC-7-ECFP, und potentiellen der EYFP-Akzeptor-Konstrukten in HeLa-Zellen und anschließender Expression (24 h) wurden FRET-Messungen durchgeführt. Dabei wurden nach Anregung des Donor-CFP (Zwei-Photonlaser, 810 nm) die Emissionsintensitäten gegen ausgewählte Wellenlängen definierter ROI aufgetragen (blauer Graph). Nach Bleichen des Akzeptors bei 514 nm (1min, 100% Output-Power) wurden die Intensitäten des Donor-CFPs erneut aufgenommen (roter Graph). a, c, e, g, Bei der Auftragung wurden die Intensitäten vor und nach Bleichung zur Betrachtung der CFP-Änderung auf die Intensität bei 479 nm vor dem Bleichen normalisiert. b, d, f, h, Zur Betrachtung der YFP-Änderung wurden hingegen die Intensitäten auf die jeweilige Intensität vor bzw. nach Bleichen auf die Intensität bei 479 nm normalisiert. Die graphische Darstellung in i, illustriert die vorläufigen FRET-Effizienzen, ermittelt aus dem Vergleich der CFP-Fluoreszenzänderung der Emissionsintensitäten im Bereich von 436 nm – 489 nm vor und nach dem Bleichen aus a, c, e, g, der einzelnen Konstrukte-Kombinationen. In a und b ist ein typischer CFP-Emissionskurvenverlauf ersichtlich, jedoch wird in a eine starke Abnahme der CFP-Intensität deutlich, welche vermutlich auf das „Durchbluten“ der YFP-Bleichung zurückzuführen ist, und bei der Bestimmung der realen FRET-Effizienzen für die einzelnen potentiellen YFP-Akzeptoren mit einberechnet werden muss (hier nicht gezeigt). Bei der Betrachtung der Graphen c-h konnte mehr oder weniger vor dem Bleichen eine FRET-typische Emissionskurve (Überlagerung von CFP- und YFP-Emissionskurve) detektiert werden, welche nach Bleichen des YFP wiederum die CFP-typische Emissionskurve annimmt. Jedoch ist wiederum ein Bleichen von CFP, v.a. in c und e, ersichtlich. Letztendlich macht das stärkste FRET die CIC-7-ECFP/CIC-7-EYFP Kombination. Aber auch Ostm1-EYFP (c, d, i) sowie CD4(NTD)-Ostm1(TMD)-CD4(CTD)-YFP (e, f, i) zeigen FRET, welches auf eine Interaktion der Ostm1-TMD mit CIC-7 hindeutet. j-l dienen der Kontrolle des Ausbleibens einer Anregung der YFP-Akzeptoren bei 405 nm (gleiche Parametereinstellung, normalisiert auf die gemittelte Intensität bei 479 nm vor Bleichen mit koexprimiertem CIC-7-ECFP). n, Anzahl der gemessenen ROI.

des Versuchsansatzes mit selbigem YFP-Konstrukt und koexprimiertem CIC-7-ECFP normalisiert. Da bei allen einzeln vorliegenden YFP-Konstrukten keine Emission gemessen werden konnte (nur Hintergrunddetektion mit maximal 2,5%), resultieren die emittierten YFP-Signale in den Versuchen bei Koexpression aus dem Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer vom angeregten Donor, CIC-7-ECFP.

Nun soll das FRET-Verhalten der YFP-Konstrukte mit CIC-6-ECFP als Donor betrachtet werden. In publizierten Lokalisations- und Co-IP-Untersuchungen zwischen CIC-6 und Ostm-1 konnte keine Interaktion zwischen den beiden Proteinen gezeigt werden [Lange *et al.*, 2006], so dass CIC-6-ECFP in den folgenden FRET-Experimenten als Kontroll-Donor zu CIC-7-ECFP dienen soll. Untersuchungen am CIC-6-ECFP bezüglich seiner Emission vor und nach dem "Bleichen" ergab, ebenso wie bei CIC-7-ECFP, eine CFP-typische Emissionskurve mit Abnahme der CFP-Fluoreszenz um etwa 14,8% (Abb. 3.29. a, b, i). Betrachtet man das Emissionsverhalten bei Koexpression von CIC-6-ECFP und Ostm1-EYFP sowie CIC-6-ECFP und CD4-Ostm1-CD4-EYFP (Abb. 3.29.d,f), so erkennt man einen nahezu gleichen Kurvenverlauf im Vergleich zum einzelexprimierten CIC-6-CFP (Abb. 3.29.b). Auch der Verlust an CFP-Fluoreszenz nach Bleichen ist bei allen drei FRET-Untersuchungen mit 13,4-15% annähernd gleich groß (Abb. 3.29.a,c,e,i), so dass die FRET-Effizienz der Akzeptoren, Ostm1-EYFP und CD4-Ostm1-CD4-EYFP, bezüglich des Donors CIC-6-ECFP letztendlich Null entspricht (i). Das Ausbleiben einer YFP-Emission bzw. FRET deutet auf eine ausbleiben Interaktion zwischen den betrachteten Proteinen hin, welche den veröffentlichten Lokalisations- und Co-IP-Untersuchungen zwischen CIC-6 und Ostm-1 entsprechen. Zwischen CIC-7-EYFP und CIC-6-ECFP hingegen scheint FRET vorhanden zu sein, da ein FRET-typischer Emissionskurvenverlauf (positiv für CFP- und YFP-Emission) detektiert wurde (Abb. 3.29.h). Nach Bleichen des Akzeptors wird hingegen wiederum ein CFP typischer Emissionskurvenverlauf, mit geringfügiger Abnahme an CFP-Fluoreszenz, ersichtlich (Abb. 3.29.g). Die FRET-Effizienz zwischen CIC-7-EYFP und CIC-6-ECFP beträgt nach Berücksichtigung des Bleichverhaltens einzeln vorliegendem CIC-7-ECFP etwa 11%, was stark auf eine Interaktion zwischen CIC-7-EYFP und CIC-6-ECFP hindeutet (Abb. 3.30).

Das Ausbleiben einer Emission der YFP-Konstrukte nach Anregung unter gleichen Bedingungen diente hingegen wiederum als Kontrolle (Abb. 3.29.j-l).

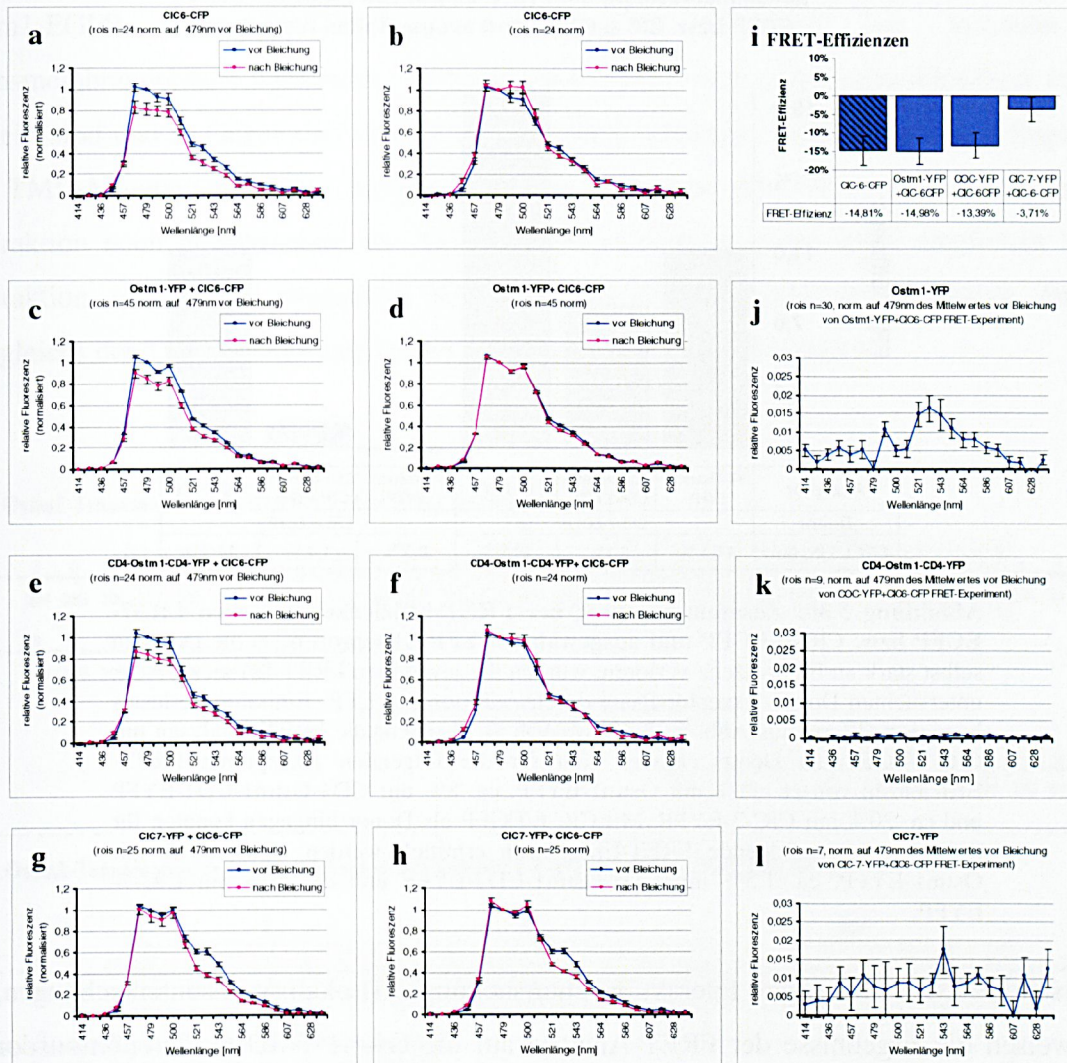


Abbildung 3.29: *in vivo*-FRET-Analysen zwischen CIC-6-CFP-Donor und potentiellen YFP-Akzeptor-Konstrukten in HeLa-Zellen (Kontrolle) a-h Nach Transfektion der cDNAs des Kontroll-Donor-fluorophors, CIC-6-ECFP, und der EYFP-Akzeptor-Konstrukten in HeLa-Zellen und anschließender Expression (24 h) wurden FRET-Messungen durchgeführt. Die Anregung des Donor-CFPs erfolgte mit einem Zwei-Photonenlaser (810 nm), das Bleichen mit einem 514nm-Laser (1 min, 100% Output-Power). Vergleichend wurden die Emissionsintensitäten gegen ausgewählte Wellenlängen definierter ROI aufgetragen (vor Bleichen blauer, nach Bleichen roter Graph), wobei in a, c, e, g (Betrachtung der CFP-Änderung) die Intensitäten vor und nach Bleichen auf die Intensität bei 479 nm vor dem Bleichen normalisiert und in b, d, f, h, (Betrachtung der YFP-Änderung) die Intensitäten auf die jeweilige Intensität vor bzw. nach Bleichen bei 479nm normalisiert wurden. In i sind die vorläufigen FRET-Effizienzen (Differenz aus den CFP-Emissionsintensitäten im Bereich von 436 nm - 489 nm vor und nach dem Bleichen) der einzelnen Konstrukt-Kombinationen dargestellt, welche noch durch den CFP-Verlust beim „Durchbluten“ des YFP-Bleichens korrigiert werden müssen. a und b, CIC-6-EGFP alleine, zeigt ein CFP-typischen Emissionskurvenverlauf, mit Abnahme der CFP-Intensität nach "Bleichen". Auch in der Betrachtung der Emissionsintensitäten von CIC-6-EGFP koexprimierten Ostm1-EYFP (c, d, i) bzw. CD4(NTD)-Ostm1(TMD)-CD4(CTD)-YFP (e, f, i) konnte YFP durch Energietransfer von CFP nicht angeregt werden, so dass vor und nach Bleichen ein CFP-typischer Emissionskurvenverlauf detektiert wurde. Ein fehlendes FRET-Signal deutet dabei auf eine ausbleibende Interaktion zwischen CIC-6 und Ostm1 bzw. dem Ostm1-Chimär hin. (i, FRET-Effizienz nahezu Null nach Abzug des CFP-Bleichens). g,h, Bei Koexpression von CIC-6-ECFP und CIC-7-EYFP, zeichnet sich hingegen ein FRET-typische Emissionskurvenverlauf (Überlagerung von CFP- und YFP-Emissionskurve) vor Bleichen ab, welcher nach Bleichen des YFP wiederum den CFP-typischen Verlauf annimmt. j-l dienen der Kontrolle des Ausbleibens einer Anregung der YFP-Akzeptoren bei 405 nm (gleiche Parametereinstellung, normalisiert auf die gemittelte Intensität bei 479 nm vor Bleichen mit koexprimiertem CIC-6-ECFP). n, Anzahl der gemessenen ROI.

Zusammenfassung der FRET-Effizienzen zwischen CIC-7-ECFP bzw. CIC-6-ECFP und ausgewählten Akzeptoren

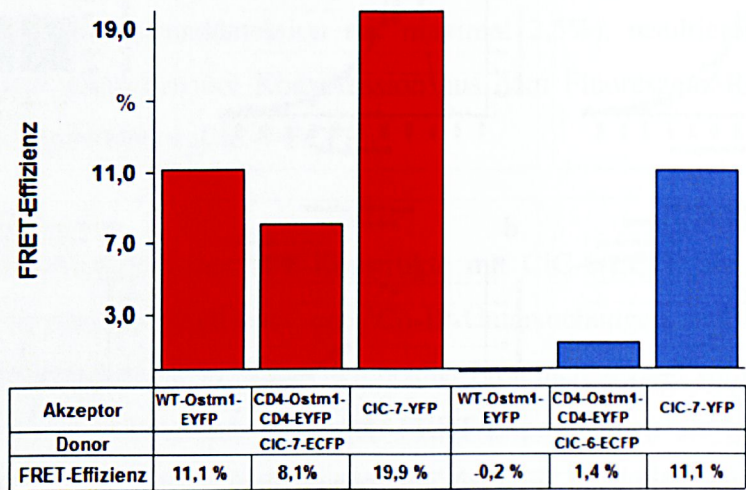


Abbildung 3.30: Zusammenfassung der FRET-Effizienzen zwischen CIC-7-ECFP bzw. CIC-6-ECFP und ausgewählten YFP-Akzeptoren Da die Donoren selbst stark an Fluoreszenz verloren, wurden die jeweiligen FRET-Effizienzen der untersuchten Donor-Akzeptor-Paare durch Addition des CFP- Emissionsverlustes korrigiert (Werte aus Abb. 3.32 i bzw. Abb. 3.33 i). Für die FRET-Analysen mit CIC-7-EGFP als Donor ergaben sich für die folgenden Akzeptoren FRET-Effizienzen von ca. 11% mit Ostm1-EYFP, ca. 8% mit CD4-Ostm1-CD4-EYFP und ca. 20% mit CIC-7-EYFP. Mit CIC-6-EGFP als Donor hingegen konnten für die Akzeptoren folgende FRET-Effizienzen ermittelt werden; nahezu 0% mit Ostm1-EYFP, ca. 1,5% mit CD4-Ostm1-CD4-EYFP und ca. 11% mit CIC-7-EYFP.

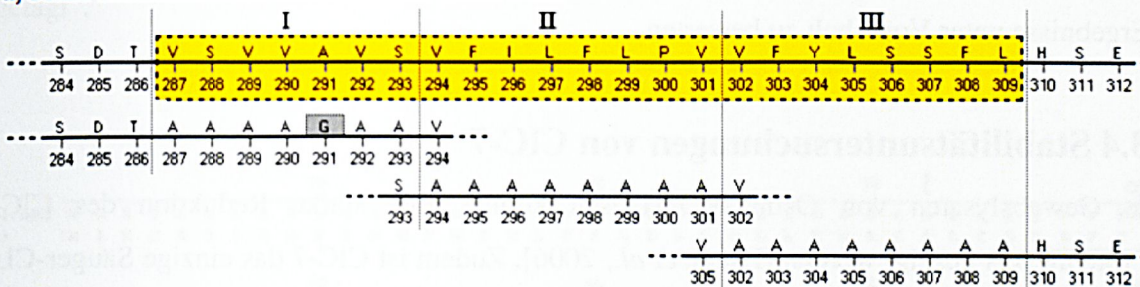
Wie schon in den vorherigen Interaktionsuntersuchungen (Lokalisationsuntersuchungen, Co-IP) weisen die Ergebnisse der FRET-Analyse auf die Ostm1-TMD als Interaktionsdomäne zwischen Ostm1 und CIC-7 hin. Außerdem deuten die FRET-Analysen zwischen CIC-7-ECFP und CIC-7-EYFP bzw. zwischen CIC-6-ECFP und CIC-7-EYFP auf eine Homo- bzw. Heterodimerisierung hin.

3.3 Subzelluläre Lokalisation von Ostm1-Transmembrandomänen-Mutanten in Ostm1-EGFP und CD4-Ostm1-CD4-EGFP

Da die Ergebnisse der Lokalisationsuntersuchungen bzgl. der Ostm1-CD4-Chimäre auf die Transmembrandomäne von Ostm1 als mögliche Interaktionsdomäne hinweisen, wurden Chimäre zur detaillierten Analyse der Transmembrandomäne von Ostm1 generiert. Zu diesem Zweck wurde die Region der DNA, welche für die Transmembrandomäne kodiert, in drei Abschnitte geteilt (7 bzw. 8AS) und durch Alanin bzw. Glycin bei schon gegebenem Alanin ersetzt (Abb. 3.31). Praktisch wurden dazu in einer rekombinanten PCR synthetisierte Primer entsprechend der zur mutierenden cDNA-Region eingesetzt. Es wurden die DNAs von

Ostm1-EGFP und CD4(NTD)-Ostm1(TMD)-CD4(CTD)-EGFP zur Mutation der Transmembrandomäne verwendet, da beide ohne CIC-7 expremiert unterschiedlich zellulär verteilt sind und in Gegenwart von CIC-7 lysosomal vorliegen. Dementsprechend liegen nur die TMD-Mutanten beider Ausgangsschimäre lysosomal mit CIC-7 vor, bei denen die Interaktion noch gewährleistet ist. Außerdem kann man zwischen einer möglichen Nicht-Interaktion oder einer retikulären Retention durch Proteinmissfaltung mittels direkten Vergleichs der TMD-Mutationen beider Ausgangsschimäre unterscheiden.

a, Ostm1-Transmembrandomän-Mutanten in Ostm1-EGFP



b, Ostm1-Transmembrandomän-Mutanten in CD4(NTD)-Ostm1(TMD)-CD4(CTD)-EGFP

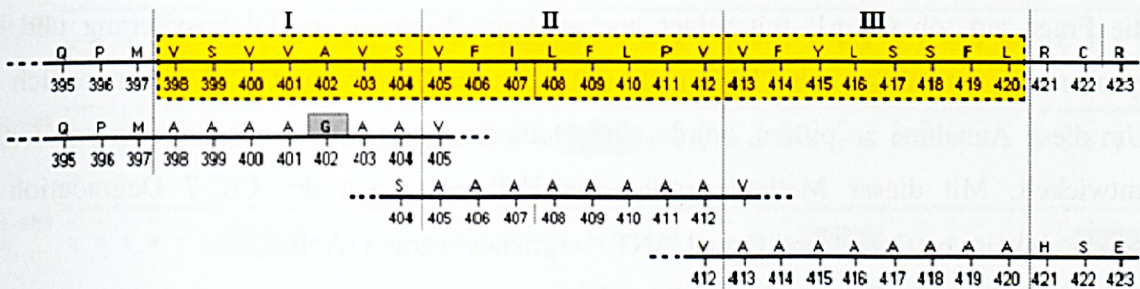


Abbildung 3.31: Klonierungsstrategie für die TMD-Mutanten Ausschnitt der Aminosäuresequenzen von Wildtyp-Ostm1(a) und CD4(NTD)-Ostm1(TMD)-CD4(CTD) (b), wobei die TMD in a und b gelb unterlegt sind. Die TMD sind in drei Abschnitte I, II, III zu 7 bzw. 8AS aufgeteilt. Durch den Austausch der Aminosäuren durch Alanin (bzw. Glycin bei gegebenem Alanin, grau unterlegt), entstehen je drei TMD-Mutanten bzgl. der Ausgangs-peptide (unterhalb der Ausgangs-peptid-Abschnitte dargestellt). Ab- bzw. aufwärts der mutierten Aminosäuresequenzen folgen die AS-Sequenzen der Ausgangskonstrukte.

In ersten Lokalisationsuntersuchungen (analog zu 3.1.) wurden dann die generierten TMD-Mutanten mit und ohne CIC-7-HA in HeLa-Zellen transfiziert. Bei Einzeltransfektion der Transmembrandomän-Mutanten verhielten sich dabei die expremierten Konstrukte wie ihre unmutierten Ausgangskonstrukte, d.h. dass die Ostm1-EGFP mutierten Konstrukte fast ausschließlich retikulär verteilt vorlagen und die CD4-Ostm1-CD4-EGFP mutierten Konstrukte überwiegend an der Plasmamembran lokalisiert waren. Bei Koexpression mit

CIC-7 änderte sich hingegen die subzelluläre Lokalisation der Konstrukte, in denen die ersten acht (I) bzw. folgenden acht (II) Aminosäuren durch Alanin (bzw. Glycin) ersetzt wurden. Dabei colokalisierten sie mit CIC-7 in Lamp-1-positiven Strukturen. Konstrukte, in denen die letzten 8 Aminosäuren der Ostml-Transmembrandomäne mutiert wurden, zeigten dagegen keine Lokalisationsänderung. Folglich deuten die ersten Untersuchungsergebnisse der subzellulären Lokalisation der Ostml-TMD-Mutanten darauf hin, dass die letzten acht Aminosäuren der definierten Transmembrandomäne von Ostml für die Interaktion mit CIC-7 wichtig sind.

Da die Transfektionen zu Lokalisationsuntersuchungen der Ostml-Transmembrandomänen-Mutanten erst einmalig (mit geringer Transfektionseffizienz) durchgeführt wurden und demzufolge auch keine Quantifizierungen erstellt werden konnten, sind diese vorläufigen Ergebnisse unter Vorbehalt zu bewerten.

3.4 Stabilitätsuntersuchungen von CIC-7

In Gewebslysaten von Ostml-KO-Mäusen konnte eine starke Reduktion des CIC-7-Proteinlevels gezeigt werden [Lange *et al.*, 2006]. Zudem ist CIC-7 das einzige Säuger-CLC-Protein, welches keine N-Glykosylierungsstellen aufweist. Damit liegt die Vermutung nahe, dass CIC-7 durch lysosomale Proteine vor Degradation geschützt wird. Letztendlich wirft sich die Frage auf, ob Ostml, mit seiner hochgradigen N-terminalen Glykosylierung und der lysosomalen Interaktion mit CIC-7, nicht selbst für den Schutz von CIC-7 verantwortlich ist. Um diese Annahme zu prüfen, wurde eine Methode zur Stabilitätsuntersuchung von CIC-7 entwickelt. Mit dieser Methode sollen die Halbwertszeiten der CIC-7 Degradation in Abhängigkeit von Ostml und Ostml- Δ NT verglichen werden (Abb. 3.32).

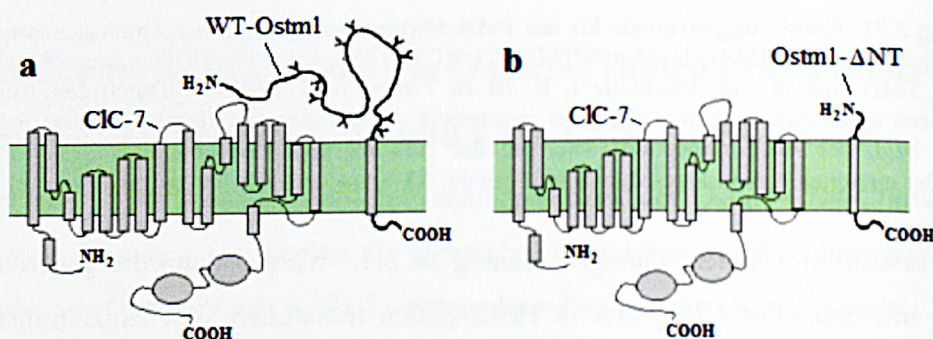


Abbildung 3.32: Stabilitätsuntersuchung – Modell von CIC-7 und seinen zu untersuchenden Interaktionspartnern In a und b ist CIC-7 mit den zu untersuchenden Stabilisatoren dargestellt, wobei in a die *in vivo* vorkommende Interaktion mit WT-Ostml dargestellt ist und b die Interaktion zu Ostml- Δ NT illustriert. Diese Abbildung dient lediglich als Modell zur Untersuchung der postulierten Schutzfunktion des hochgradig glykosylierten WT-Ostml zur lysosomalen Stabilisierung des unglykosylierten CIC-7. (Y an WT-Ostml symbolisieren die putativen N-Glykosylierungsstellen). (Zusammengefügt/ Modifiziert nach [Dutzler *et al.*, 2002] und [Lange *et al.*, 2006])

Für die Stabilitätsuntersuchungen von CIC-7 wurde das Ostml- Δ NT-Konstrukt generiert, in dem die N-terminale Sequenz mit den putativen Glykosylierungsstellen aus der für Wildtyp-Ostml kodierenden cDNA herausgeschnitten wurde. Ostml- Δ NT besteht also folglich aus den ersten Aminosäuren Met-1 bis Thr-39, inklusive der Schnittstelle der Signalpeptidase, und den letzten Aminosäuren, von Cys-279 bis Thr-338, des Wildtyp-Ostml (Abb. 3.33). Praktisch erfolgte die Mutation wiederum mittels rekombinanter PCR mit entsprechenden Primern. Für die folgenden Lokalisationsuntersuchungen von Ostml- Δ NT in Abhängigkeit von CIC-7 und der Stabilitätsuntersuchungen von CIC-7 wurde die neu generierte Mutante wiederum C-terminal mit Myc, in pcDNA3.1+ , bzw. mit EGFP, im Vector pEGFP-N3, „getagt“.

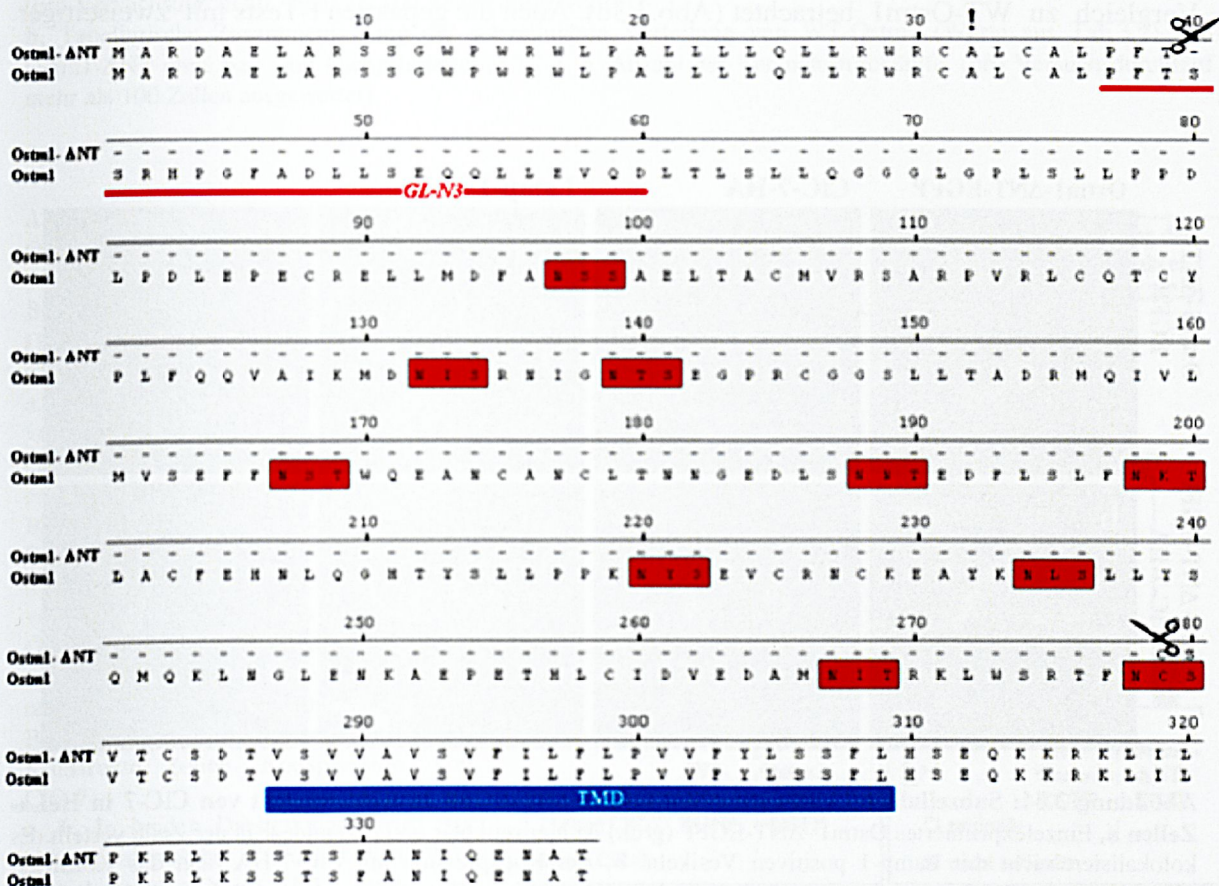


Abbildung 3.33: Vergleich der AS-Sequenz von Ostml- Δ NT und WT-Ostml Die AS-Sequenzen sind untereinander dargestellt, unten von WT-Ostml und darüber von Ostml- Δ NT. Außerdem sind N-Glykosylierung (rot unterlegt) sowie die TMD (blau unterlegt) dargestellt. Zudem ist das Eptiop, gegen welches der gl-N3 Antikörper gerichtet ist, in roter Unterstreichung gekennzeichnet (AS-37 bis AS-60). Die Scheren symbolisieren die aus dem WT-Ostml herausgeschnittene AS-Sequenz zur Generierung des Ostml- Δ NT. ! kennzeichnet die Schnittstelle der Signalpeptidase. TMD, Transmembrandomäne.

3.4.1 Subzelluläre Lokalisation des Ostm1- Δ NT in Abhängigkeit von CIC-7

Da Ostm1- Δ NT als Voraussetzung für die folgende Stabilitätsuntersuchung mit CIC-7 interagieren sollte, wurden subzelluläre Lokalisationsuntersuchungen des Ostm1- Δ NT in Abhängigkeit von CIC-7 vorgenommen. Bei Einzeltransfektion von cDNA des Ostm1- Δ NT-EGFP(CT) sieht man eine retikuläre und perinukleäre Verteilung in HeLa-Zellen (Abb. 3.34.a). Bei Koexpression von Ostm1- Δ NT-EGFP(CT) mit CIC-7-HA(CT) überlagern beide Proteine punktförmig in Lamp-1-positiven Strukturen, den späten Endosomen bzw. Lysosomen (Abb. 3.34.b). Auch in Quantifizierungen der subzellulären Ostm1- Δ NT-Lokalisation wird ein Lokalisationswechsel vom ER in Abwesenheit von CIC-7 zu Lysosomen bei Koexpression mit CIC-7 deutlich (Abb. 3.35). Ebenso wurden die Quantifizierungen der lysosomalen Ostm1- Δ NT-Lokalisation in Abhängigkeit von CIC-7, sowie die Betrachtung der ER-Retention von Ostm1- Δ NT in Abwesenheit von CIC-7 im Vergleich zu WT-Ostm1 betrachtet (Abb.3.36). Auch die gepaarten t-Tests mit zweiseitiger

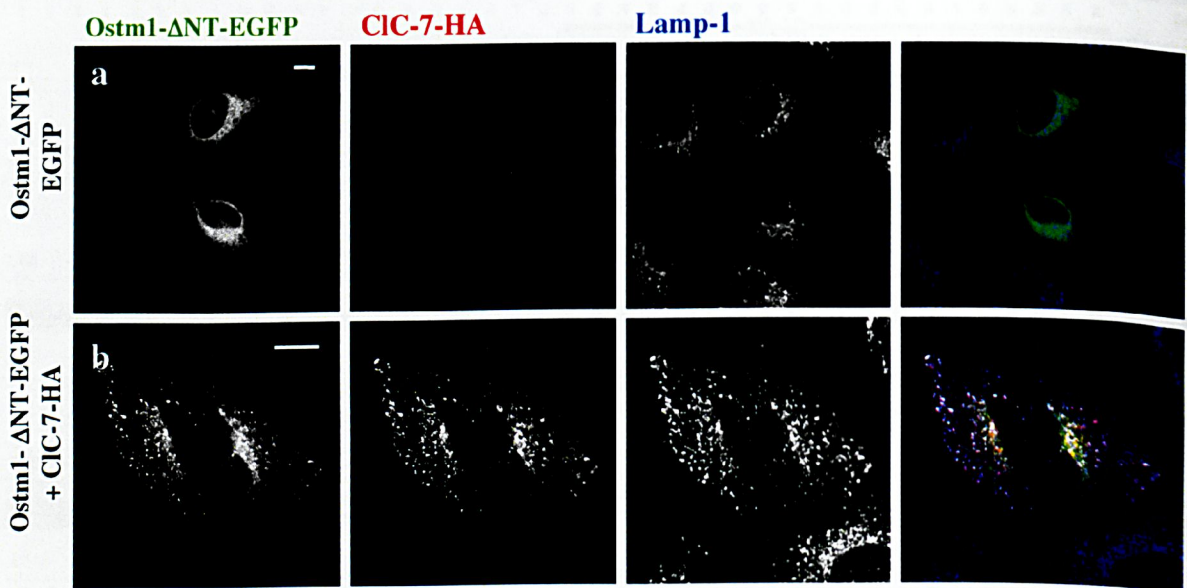


Abbildung 3.34: Subzelluläre Lokalisation von Ostm1- Δ NT-EGFP in Abhängigkeit von CIC-7 in HeLa-Zellen **a**, Einzelexprimiertes Ostm1- Δ NT-EGFP (grün) ist hier retikulär und perinukleär in der Zelle verteilt. Es kolokalisiert nicht mit Lamp-1 positiven Vesikeln. **b**, Bei Koexpression mit CIC-7-HA liegt das Konstrukt zusammen mit CIC-7 in weißen punktförmigen, Lamp-1-positiven Kompartimenten vor. Es fand folglich ein Lokalisationswechsel statt. Die Detektion erfolgte mit Antikörpern gegen Lamp-1 und HA für CIC-7-HA. Maßstab 10 μ m

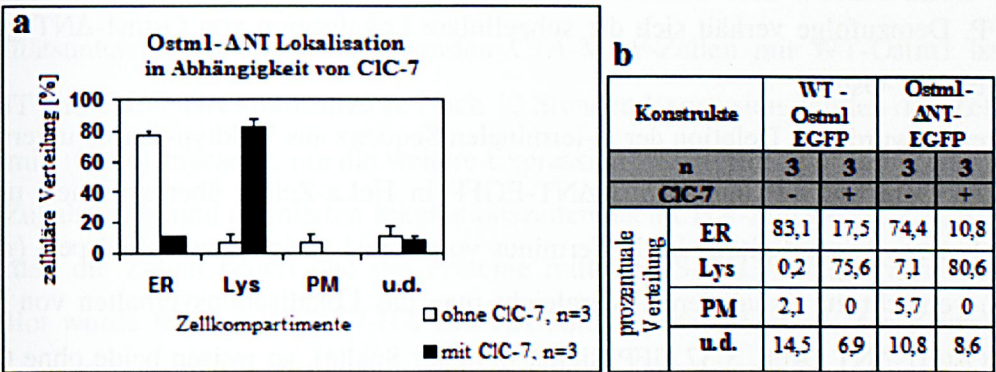


Abbildung 3.35: Quantifizierung der Ostm1-ANT-EGFP-Lokalisation in Abhängigkeit von CIC-7-HA
Prozentuale Zuordnung der ermittelten zellulären Verteilung des Ostm1-ΔNT zu den definierten Kompartimenten in Abhängigkeit von CIC-7, **a** graphisch, **b** in Zahlen. Der Lokalisationswechsel des Ostm1-ΔNT vom ER in Abwesenheit von CIC-7 zu Lysosomen bei Koexpression mit CIC-7 ist deutlich erkennbar. In der Tabelle sieht man die nahezu identische subzelluläre Lokalisation von WT-Ostm1 und Ostm1-ΔNT.

a, Weiße Balken entsprechen Werten von Ostm1-ΔNT ohne CIC-7-Expression, Schwarze Balken Werten von Ostm1-ΔNT mit koexprimiertem CIC-7. Fehlerbalken zeigen Standardfehler. n, Anzahl der Versuchsdurchläufe (pro Versuchsdurchlauf mehr als 100 Zellen ausgewertet).
b, Tabellarische Zusammenfassung der subzellulären Verteilung von WT-Ostm1 (Werte aus Tab.3.1) und Ostm1-ΔNT ohne bzw. mit koexprimiertem CIC-7. n, Anzahl der Versuchsdurchläufe. (pro Versuchsdurchlauf mehr als 100 Zellen ausgewertet).

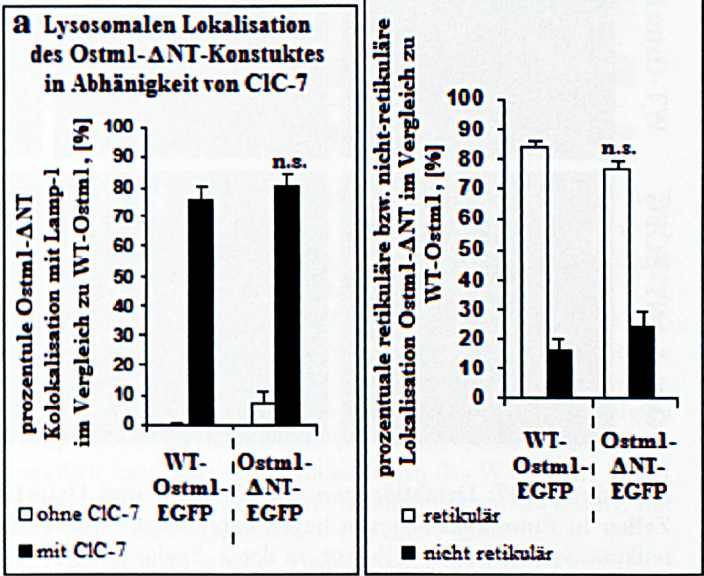
Abbildung 3.36: Quantifizierung der Ostm1-ANT-EGFP-Lokalisation in Abhängigkeit von CIC-7-HA, sowie Betrachtung der ER-Retention von Ostm1-ANT-EGFP in Abwesenheit von CIC-7 im Vergleich zu WT-Ostm1

a, Vergleichende graphische Darstellung von WT-Ostm1 (Werte aus Tab. 3.1.) und Ostm1-ΔNT für die lysosomale prozentual ermittelten Verteilung in Ab- (weiße Balken) und Anwesenheit (schwarze Balken) von CIC-7.

b, Vergleichende graphische Darstellung von WT-Ostm1 (Werte aus Tab. 3.1.) und Ostm1-ΔNT der prozentual ermittelten retikulären (weiße Balken) und nicht-retikulären Verteilungen (schwarze Balken) der einzelexprimierten Konstrukte (ohne Koexpression von CIC-7).

a, b, In beiden Darstellungen wird das nahezu identische Verhalten von WT-Ostm1 und Ostm1-ΔNT bzgl. des Lokalisationswechsels in Abhängigkeit von CIC-7 bzw. der Retentionsverhalten ohne CIC-7 deutlich. **a**, Sowohl WT-Ostm1 als auch Ostm1-ΔNT lokalisieren mit etwa 80% im Lysosomen mit koexprimiertem mit CIC-7. Ohne CIC-7 waren beide Konstrukte nur geringfügig in lysosomalen Kompartimenten anzutreffen. **b**, Bzgl. der Lokalisation ohne CIC-7 sind beide mit über 75% im ER lokalisiert (ER-Retention ohne CIC-7).

Fehlerbalken zeigen Standardfehler. Gepaarter t-Tests mit zweiseitiger Verteilung mit der Basismatrix der lysosomalen WT-Ostm1-EGFP Verteilung in Anwesenheit von CIC-7 (**a**) bzw. mit der Basismatrix der retikulären WT-Ostm1-EGFP Verteilung in Abwesenheit von CIC-7 (**b**); n.s., nicht signifikant.)



Verteilung zeigten keine signifikante Abweichung zwischen Ostml1- Δ NT-EGFP und Ostml1-EGFP. Demzufolge verhält sich die subzelluläre Lokalisation von Ostml1- Δ NT genauso wie die von WT-Ostml1.

Weiterhin wurde die Deletion der N-terminalen Sequenz aus Wildtyp-Ostml1 untersucht. Dazu wurden Ostml1-EGFP und Ostml1- Δ NT-EGFP in HeLa-Zellen überexprimiert und Ostml1 mittels eines gegen Epitope im N-Terminus von Ostml1 gerichteten Antikörpers (*gl*-N3, Abb. 3.33) versucht zu visualisieren. Vergleicht man das Lokalisationsverhalten von WT-Ostml1 und Ostml1- Δ NT (Abb. 3.37 GFP-Signal in erster Spalte), so weisen beide ohne CIC-7 eine Retention im endoplasmatischen Retikulum auf (wie schon gezeigt). Mittels der *gl*-N3-Antikörper konnte WT-Ostml1 detektiert werden. Dieses Signal überlappt mit dem GFP-Signal von WT-Ostml1-EGFP (Abb. 3.37.a). In Ostml1- Δ NT-EGFP transfizierten Zellen blieb hingegen eine Detektion mittels *gl*-N3-Antikörper aus (Abb. 3.37.b). Da WT-Ostml1-EGFP im Gegensatz zu Ostml1- Δ NT-EGFP mit *gl*-N3-Antikörpern detektiert werden konnte, kann man davon ausgehen, dass die Deletion der N-terminalen Sequenz aus Wildtyp-Ostml1 erfolgreich war.

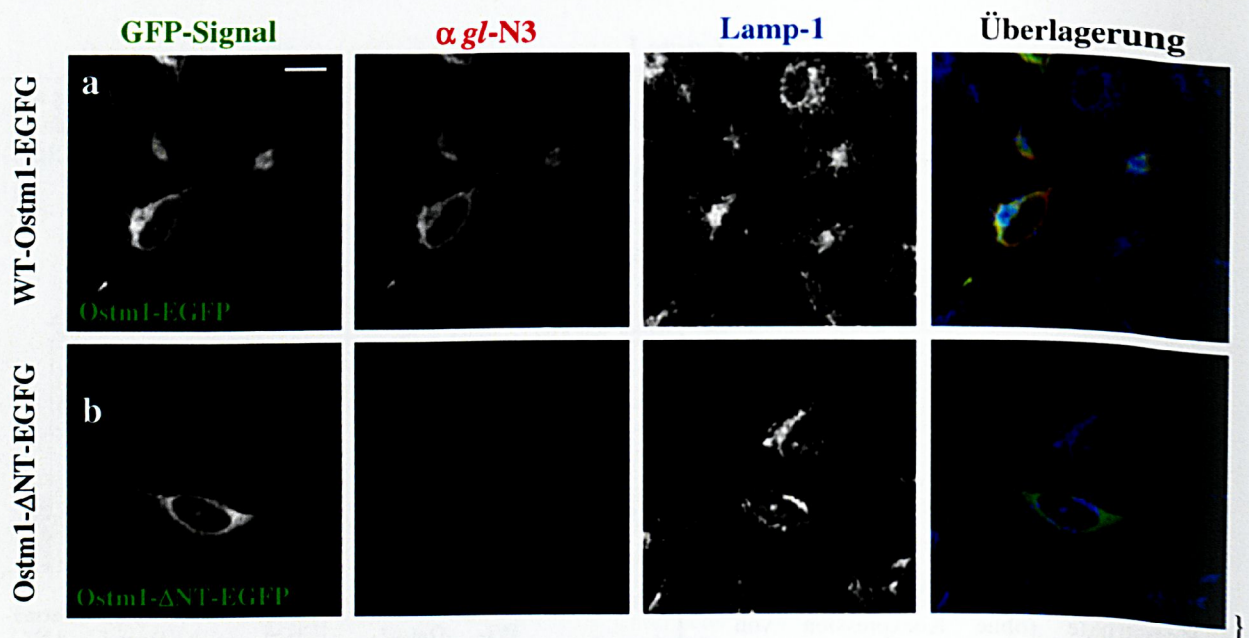


Abbildung 3.37: Detektion von Ostml1-EGFP und Ostml1- Δ NT-EGFP mit *gl*-N3 Antikörpern in HeLa-Zellen In Einzeltransfektionen liegen exprimiertes Ostml1-EGFP (a, grün) und Ostml1- Δ NT-EGFP (b, grün) retikulär verteilt in der Zelle vor. In der 2. Spalte erfolgte die Detektion von Ostml1 mittels *gl*-N3 Antikörper, welche gegen Epitope im N-Terminus von Ostml1 gerichtet sind. **a**, In WT-Ostml1-EGFP transfizierten Zellen erfolgte eine Detektion mit *gl*-N3 Antikörper (rot). Das Signal überlagert mit dem EGFP-Signal. **b**, In Ostml1- Δ NT-EGFP transfizierten Zellen blieb eine Detektion mittels *gl*-N3-Antikörper aus. Deutet auf erfolgreiche Deletion der NT-Sequenz hin.

Auch wurde Lamp-1 (Markerprotein für späte Endosomen/Lysosomen) detektiert (blau), welches jedoch weder mit Ostml1-EGFP noch mit Ostml1- Δ NT-EGFP kolokalisiert.

Die Detektion erfolgte mit Antikörpern gegen Lamp-1 und mit *gl*-N3-Antikörpern gegen Epitope des Ostml1-NT. Maßstab 10 μ m.

3.4.2 Stabilität von CIC-7 in Abhängigkeit von Ostml und Ostml- Δ NT

Zur Stabilitätsuntersuchung von CIC-7 wurden C7A-MAF-Zellen mit WT-Ostml bzw. Ostml- Δ NT und CIC-7-HA kotransfiziert. Nach 12 Stunden Expression wurden den Zellen Cycloheximid (CHX) zugesetzt, um die weitere Expression zu unterbinden. Zum Zeitpunkt der CHX-Zugabe (0 h) und definierten Inkubationszeiten nach CHX-Zugabe (1, 2, 4, 8, 12, 33 h) wurden die Zellen lysiert und die Proteine mittel SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Western Blot wurde Rab4 und CIC-7-HA mit HA-Antikörpern detektiert. Als Kontrolle wurden untransfizierte Zellen nach gleicher Prozedur in SDS-PAGE, Western Blot und Detektion mitgeführt. Die Ponceau-Färbungen und detektiertes Rab4 (vergleichbar größere Halbwertszeit als CIC-7) zeigen dabei die äquivalente Auftragung der Lysate.

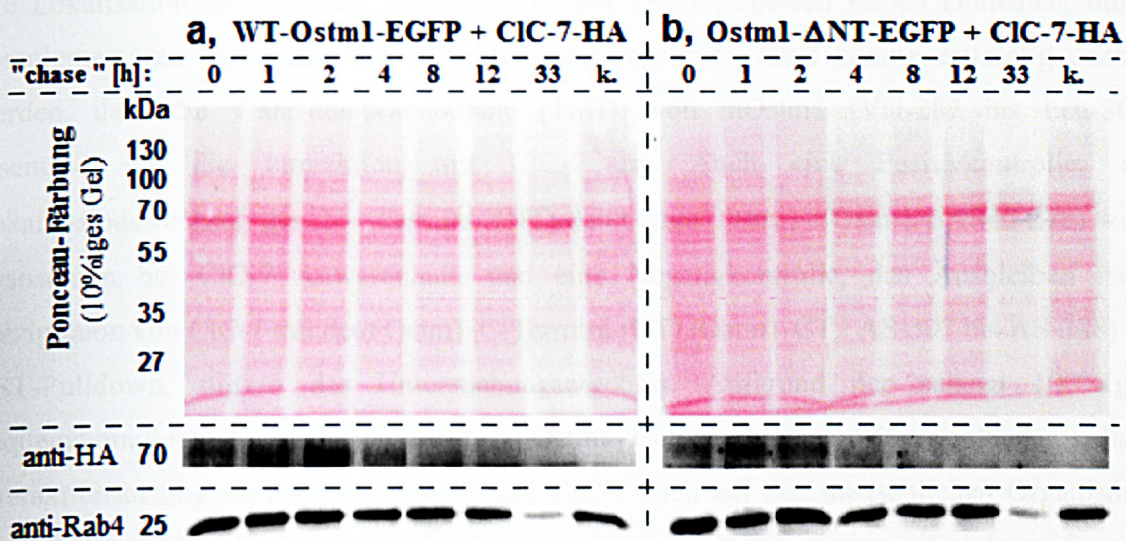


Abbildung 3.38: Stabilitätsuntersuchungen von CIC-7 in Abhängigkeit von WT-Ostml und Ostml- Δ NT C7A-MAF-Zellen wurden **a**, mit cDNA von CIC-HA(CT) und WT-Ostml-EGFP(CT) bzw. **b**, mit cDNA von CIC-HA(CT) und Ostml- Δ NT-EGFP(CT) Ansätze transfiziert. Nach 12h Expression wurde die Expression mit Cycloheximid (CHX) gestoppt. Nach definierten Inkubationszeiten von CHX (0, 1, 2, 4, 8, 12, 33 h) wurden die Zelllysate und das Kontrolllysate (k, untransfizierte Zelle, Lysat zum Zeitpunkt 0 h) letzte Spur der jeweiligen Membranen) mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Western Blot erfolgte die Detektion von CIC-7-HA mit Antikörpern gegen HA-Epitope und gegen das früh-endosomale Rab4. **b**, Dabei war CIC-7 bei Koexpression von CIC-HA mit Ostml- Δ NT-EGFP nach etwa 8 Stunden des erfolgten Epressionsstopp vollständig abgebaut. **a**, Bei Koexpression von CIC-HA mit WT-Ostml-EGFP hingegen war CIC-7 noch nach 12 Stunden vorhanden. Letztendlich kann man also schlussfolgern das WT-Ostml CIC-7 eher stabilisiert/schützt als Ostml ohne N-Terminus, welches zur postulierte Schutzfunktion von Ostml, mit seinem hochgradig glykoylierten N-Terminus, vor lysosomalen Degradation von CIC-7 passt. Die Ponceau-Färbungen und detektiertes Rab4 (vergleichbar größere Halbwertszeit als CIC-7) zeigen dabei die äquivalente Auftragung der Lysate.

Die abgebildeten Western Blot zeigen die Abnahme des CIC-7-Poteinlevels (Bande bei ca. 70 kDa) mit zunehmender Inkubationszeit nach CHX-Zugabe, unabhängig vom eingesetzten Expressionspartner (Abb. 3.38). Jedoch scheint der Abbau von CIC-7 bei Kotransfektion mit

Ostm1- Δ NT schneller zu verlaufen, als bei Koexpression von CIC-7 mit WT-Ostm1. Folglich deuten die Ergebnisse erster Stabilitätsuntersuchungen von CIC-7 darauf hin, dass der N-Terminus von Ostm1 zur Stabilisierung des CIC-7 beiträgt.

Es konnte die zeitliche Abnahme von CIC-7 nach Blockierung der Proteinsynthese im Western Blot nachgewiesen werden, jedoch war eine präzise Differenzierung der Halbwertszeiten von CIC-7 in Anwesenheit von WT-Ostm1 bzw. Ostm1- Δ NT aufgrund geringer Abweichungen und ausbleibender Reproduzierbarkeit nicht möglich.

4. Diskussion

4.1 Die Ostm1-Transmembrandomäne als Interaktionsstelle zwischen Ostm1 und CIC-7

Ostm1 colokalisiert als essentielle β -Untereinheit mit CIC-7 in Lysosomen. Diese Aussage konnte aufgrund von *in vivo* Lokalisationsuntersuchungen gezeigt werden. Zudem konnte eine retikuläre und perinukleäre Retention von Ostm1 in CIC-7-defizienten Mäusen und bei Einzeltransfektion von Ostm1-cDNA beobachtet werden [Lange *et al.*, 2006]. In der vorliegenden Arbeit wurden die beschriebenen Verhalten in einem Lokalisationsassay involviert, um die Interaktion zwischen CIC-7 und Ostm1 auf submolekularer Ebene zu untersuchen.

Die Lokalisationsuntersuchung wurden dabei auf Ostm1, speziell seinen Domänen, durch komplementären Austausch von CD4-Domänen begrenzt. Dabei konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Transmembrandomäne (TMD) von mOstm1 (Val-287 bis Leu-309) essentiell für die Interaktion mit CIC-7 ist. Auch eine Positivkontrolle, der Lokalisationswechsel des N- Termini (NT)-deletierten Ostm1 (Ostm1- Δ AS40-278) zum Lysosomen bei CIC-7 Anwesenheit, und eine Negativkontrolle, das Ausbleiben einer Präzipitation von CIC-7 mit dem Ostm1-C-Termini (CT) (Ostm1-CT, AS-307 bis AS-328) im GST-Pulldown, stützen das Untersuchungsergebnis. Aufgrund der nahezu 100%igen Sequenzhomologie zur humanen Ostm1-Transmembrandomäne, kann diese Interaktionsbedingung zwischen Ostm1 und CIC-7 auch auf den menschlichen Organismus übertragen werden. Im Vergleich der humanen Ostm1-TMD-Sequenz mit anderen Spezies zeichnen sich Vertreter sowohl mit hoher Homologie (u.a. Maus, Schimpanse, Haushuhn -rind, Kugelfisch, Zebrafisch), als auch mit geringfügiger Übereinstimmung (*Ciona intestinalis* (Schlauchsee-Scheide), *C.elegans* (Fadenwurm)) ab, was sich wohl auf ihre Verwandtschaft zurückführen lässt. (Abb. 4.1). Jene Sequenzanalysen veranlassen jedoch die Relevanz von Ostm1, aber auch von CIC-7 als Interaktionspartner, bezüglich ihrer Funktionen in den verschiedenen Organismen zu prüfen. Auch wird bei der Betrachtung auf Sequenzhomologie der Ostm1-TMD deutlich, dass nur ein Tyrosin (Tyr-304 in humanem WT-Ostm1) konserviert ist, welches möglicherweise die für die Interaktion verantwortliche Aminosäure mit CIC-7 darstellt (Abb. 4.1).

In weiteren Lokalisationsuntersuchungen konnte die Ostm1-TMD als Interaktionsdomäne mit vorläufigen Daten sogar auf die letzten acht Aminosäuren (Val-302 bis Leu-309) reduziert werden, was zudem Tyr-304 von Ostm1 als postulierte interagierende AS mit CIC-7 betätigt.

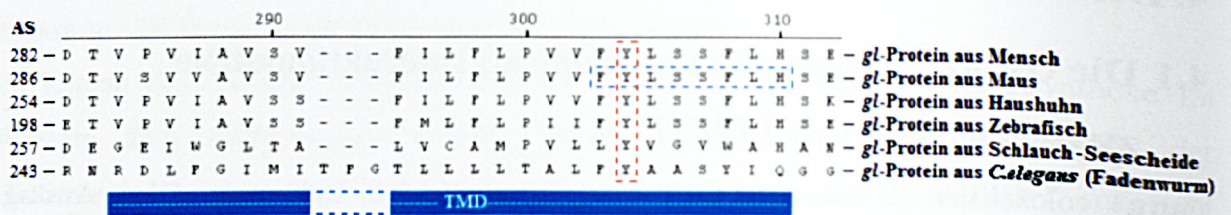


Abbildung 4.1: Ostm1-TMD-Alignment ausgewählter Spezies. Tyr-304 als potentielle interagierende AS von Ostm1-TMD mit CIC-7. Im Vergleich der verschiedenen Ostm1-TMD (blau unterlegt) mit dem humanen Ostm1 zeichnet sich v.a. eine hohe Sequenzhomologie der Säuger-Ostm1-TMD ab. In den folgenden Sequenzen, des Zebrafisches, Schlauch-Seescheide und *C.elegans*, verringert sich hingegen die Homologie zunehmend, bis nur noch wenige Aminosäuren konserviert vorliegen. Da in dieser Arbeit die TMD von Ostm1 als essentielle Interaktionsdomäne mit CIC-7 nachgewiesen werden konnte und zudem vorläufige Lokalisationsuntersuchungen die letzten acht AS der TMD als ausreichend für die Interaktion eingrenzen (blau gestrichelt unterlegt), könnte die in allen hier illustrierten differenten Ostm1-TMD konservierte Tyrosin (rot unterlegt, Tyr-304 in humanem Ostm1) als die mögliche interagierende AS mit CIC-7 vermutet werden. Die Sequenzanalyse wurde mit den Datenbanken des UniProt Konsortiums (URL: www.uniprot.org) erstellt.

Da Ostm1 die Interaktion mit CIC-7 durch ein Motiv innerhalb seiner Transmembrandomäne realisiert, liegt es nahe, dass auch CIC-7 mit seinen Transmembrandomänen zur Interaktion beiträgt. Aufgrund der Proteintopologie von CIC-7 ist es zudem wahrscheinlicher, dass die α -Helices, die am seitlichen Membraninterface des CIC-7-Dimers liegen, eine Ostm1-Interaktion ermöglichen.

Vergleicht man Ostm1 mit der ersten für CLC-Proteine (speziell für CIC-Ks) gefundene essentielle β -Untereinheit Barttin [Estévez *et al.*, 2001], so ergibt sich die Gemeinsamkeit der Reduktion seiner α -Untereinheit auf Proteinlevel, aber zugleich der Unterschied in ihrer Proteintopologie. Auch sind keine signifikanten Übereinstimmungen beider β -Untereinheiten in ihrer Sequenz ersichtlich. Da aber beide β -Untereinheiten die Bindung zu ihrer α -Untereinheit über ihre Transmembrandomäne eingehen, Für Barttin konnte die Interaktion mit den α -Helices B und J seiner CIC-K-Untereinheit gezeigt werden [Tajima *et al.*, 2007], so dass sich auch für Ostm1 eine Bindung mit der CIC-7-Transmembrandomäne vermuten lässt.

Da Ostm1 und Barttin über die Transmembrandomäne mit ihrer α -Untereinheit CIC-7 bzw. den CIC-Ks interagieren, könnte dies ein konserviertes Schema für CLC-Proteine und ihrer β -Untereinheiten darstellen, auch wenn beide β -Untereinheiten keine Homologie aufweisen. In zukünftigen Studien, auf der Suche nach neuen β -Untereinheiten der CLC-Proteine, könnte geklärt werden, ob β -Untereinheiten eine zwingend erforderliche Komponente im CLC-Transportkomplex sind, oder ob es sich bei CIC-7 bzw. CIC-K nur um Ausnahmen handelt.

In der Arbeit vorliegende Untersuchungen, (Co-)Immunpräzipitation (IP) und Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer(FRET)-Analysen, sollten die Ergebnisse der Lokalisationsuntersuchungen untermauern.

Die Ergebnisse der Co-IP-Untersuchungen deuten wiederum auf die Transmembrandomäne von Ostm1 als Interaktionsdomäne zwischen CIC-7 und Ostm1 hin. In den Untersuchungen konnte transfiziertes CIC-7-HA mit WT-Ostm1, mit dem Ostm1-Ostm1-CD4-Chimär und mit dem Ostm1-ANT-Konstrukt aus dem Zelllysats präzipitiert werden. Da jedoch entsprechende Kontrollen, wie die Expression von CIC-7-HA bzw. der Ostm1-CD4-Chimäre fehlte, und erwartete Präzipitation von CIC-7 durch Ostm1-CD4-Chimäre mit Ostm1-TMD ausblieb, sind die Ergebnisse der Co-IP unter Vorbehalt zu betrachten.

Die Co-IP ermöglicht die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen *in vivo*-ähnlichen Verhältnissen, d. h. zwar dass bei der Isolierung präzipitierter Proteine entsprechend verwendete Puffer dem Zellmilieu angepasst wurden, jedoch eine auftretende bzw. ausbleibende Interaktion zwischen Proteinen nicht zwangsläufig *in vivo* auftreten muss. In der untersuchten Co-IP zwischen Ostm1-CD4-Chimären und CIC-7 könnten sich demnach die Proteine durch das Aufbrechen der Zellen verändert haben oder auch abgebaut worden sein, so dass eine Interaktion zwischen Ostm1-CD4-Chimären und CIC-7 ausblieb oder aber die im gebildetem CIC-7/Ostm1-CD4-Chimär-Komplex vorhandenen Wechselwirkungen zu schwach für eine Analyse mittels Co-IP waren (Nachweisgrenze). Diese Überlegungen würden die ausbleibende Interaktion zwischen CIC-7 und den Ostm1-CD4-Chimären mit Ostm1-TMD, welche in den Lokalisationsuntersuchungen gezeigt wurden, erklären.

Auch hängt der Immunpräzipitationserfolg von der Bindung des verwendeten Antikörpers ab. Beispielsweise könnte sich die Proteinkonformationen der Ostm1-CD4-Chimäre bei Zelllyse verändert haben, so dass der verwendete Myc-Antikörper nicht an das Zielepitop (Myc-Epiop) binden konnte und dementsprechend eine Präzipitation ausblieb. Dies würde wiederum die fehlende Detektion erwarteter Interaktionen zwischen CIC-7 und Ostm1-CD4-Chimäre erklären.

Des weiteren ist zu beachten, dass die Co-IP-Experimente zwar Auskunft über die mögliche Interaktion von zwei Proteinen geben, jedoch keine Informationen darüber, wie diese Interaktion stattfindet. Dementsprechend müssen die ermittelten Interaktionen zwischen den Ostm1-Chimären und CIC-7 nicht zwangsläufig über Transmembrandomäne abgelaufen sein.

In FRET-Analysen konnten die Interaktionen zwischen CIC-7 und WT-Ostm1 bzw. dem Ostm1-Chimär mit Ostm1-TMD gezeigt werden. Diese Ergebnisse deuten erneut darauf hin, dass die Ostm1-TMD für die Interaktion im CIC-7/Ostm1-Komplex verantwortlich ist. Ebenfalls deuten die FRET-Analysen auf eine Homodimerisierung von CIC-7 und eine Heterodimerisierung von CIC-7 und CIC-6 hin.

Die Ergebnisse der FRET-Untersuchungen stellen erste Ergebnisse einer in diesem Labor neu etablierten Methode dar, welche aufgrund ihrer Komplexität systematische Fehler aufweisen und dementsprechend als vorläufig zu betrachten sind. Im nun folgenden Abschnitt soll auf einige Probleme der FRET-Messung eingegangen werden.

Ein Indiz für einem im System vorliegenden Fehler ist der detektierte FRET zwischen koexprimiertem CIC-6-ECFP und CIC-7-EYFP und der damit einhergehenden Interaktion zwischen beiden Proteinen, welche jedoch bei publizierten IP-Untersuchungen nicht detektiert werden konnte [Suzuki *et al.*, 2006]. Erklären könnte man diese Beobachtung durch das Problem der großen Variabilität der Expressionslevel verwendeter Konstrukte, welche im Falle hoher Expressionsraten möglicherweise eine Bildung von ECFP-/EYFP-Agregaten zur Folge hatte, welche ein ‚unechtes‘ FRET-Signal implizierten. Zudem beeinflusst die hohe Variabilität der Expressionslevel das Verhältnis von Donor-gebundenem zu Donor-ungebundenem Akzeptor, was letztendlich zu großen Differenzen der FRET-Effizienzen zwischen betrachteten Vesikeln führte.

Auch ein Problem stellt der CFP-Intensitätsverlust durch das „Durchbluten“ bei Akzeptorbleichung dar. Der Grund der Verringerung von CFP-Emissionen liegt also primär an der zu hohen Laserintensität, in Kombination mit der Zeit des Bleichvorganges (514 nm, 1 min, 100% Output-Power). Jüngste Ergebnisse (nicht gezeigt), mit 10% Output-Power des 514 nm-Lasers für eine Minute, erwiesen sich als ausreichend für den Bleichvorgang.

Auch der intrazelluläre Transport untersuchter HeLa-Zellen stellt eine Fehlerquelle da. Dabei ist nicht die x- bzw. y-Verschiebung der betrachteten Vesikel als problematisch anzusehen, da ein gesetztes ROI nachgezogen werden kann, sondern vielmehr die z-Bewegung, weil sich die zu analysierenden Kompartimente nach dem Bleichvorgang aus dem Fokus bewegen können.

Ein weiterer Fehler kann bei der Setzung der ROI, in Form und Größe, entstehen. Um den Vergleich zwischen verschiedenen Arealen mit gleicher oder differenter Kombination von Donor- bzw. Akzeptor-Fluorophor zu gewährleisten, sollten gleichgroße ROI, wie in vorliegender Arbeit, gesetzt werden. Da jedoch die betrachteten Kompartimente in Form und Größe eine breite Varianz aufweisen, stellt sich die Begrenzung definierter Areale als schwierig dar. Zudem ist die Form des definierten, zu bleichenden Areals aufgrund des

mechanisch vorgegebenen Scannvorganges des Lasers beim Bleichen von Bedeutung. Der Laser regt dabei zeilenweise entlang der x-Achse in Richtung der y-Achse gegebene Fluorophore an. Um das Raster der sequentiellen Bleichung mit optimaler Effizienz nutzen zu können, sollten die ROI quadratisch bzw. bei größeren Arealen rechteckig mit längerer Basis, gewählt werden, da somit die Berechnung des Areals für den Scannvorgang und folglich der Bleichvorgang zeitlich minimiert wird.

Zusammenfassend bedarf es also einer Optimierung der hier beschriebenen Methoden, um zum einen die über die Ostml-TMD vermittelte Interaktion zwischen CIC-7 und Ostml zu bestätigen und zum anderen die Ostml-TMD als Interaktionsstelle detaillierter betrachten zu können.

4.2 Retentionsverhalten der Ostml-CD4-Chimäre

Betrachtet man die subzelluläre Verteilung von Ostml in Abwesenheit von CIC-7 (in CIC-7-defizienten Mäusen und bei Einzeltransfektion von Ostml-cDNA), so liegt Ostml retikulär und perinukleär in den Zellen vor [Lange *et al.*, 2006]. Dieses Verhalten lässt sich durch das Vorhandensein eines Signalpeptides, welches den Transport zum endoplasmatischen Retikulum (ER) steuert und die Unabkömmlichkeit von CIC-7 für den Export von Ostml aus dem ER erklären [Lange *et al.* 2006].

Es ist allgemein bekannt, dass es Sequenzmotive gibt, welche die Retention von Proteinen im ER veranlassen [Teasdale und Jackson, 1996], [Michelsen *et al.*, 2005]. Zudem ist auch gezeigt worden, dass gegebene Retentionsmotive durch Interaktionspartner maskiert werden können und so einen ER-Export erlauben (am Beispiel des K_{ATP}-Komplexes nach [Zerangue *et al.*, 1999]. Ostml weist zwei Dilysin-Motive im C-Terminus (Motive: KKRK und KRLK, in Maus und Mensch konserviert) auf, welche möglicherweise als Retentionssignale fungieren. Durch Interaktion mit CIC-7 könnten diese Signale maskiert und damit inaktiviert werden, woraufhin Ostml im Komplex mit CIC-7 das ER verlassen kann.

Lokalisationsuntersuchungen exprimierter Ostml-Chimäre ohne CIC-7 konnten jedoch die Annahme der von Ostml C-terminal vermittelten Retention und damit den Maskierungsmechanismus durch CIC-7 nicht bestätigen. Das Retentionsverhalten von Ostml wurde dabei durch komplementären Austausch von CD4-Domänen begrenzt auf die Ostml-Domänen untersucht. Dadurch konnte gezeigt werden, dass neben dem Wildtyp-Ostml nur die Chimäre mit ausgetauschtem Ostml-CT eine retikuläre und perinukleäre Verteilung (Retention) in den Zellen aufwies. Alle anderen Ostml-Chimäre waren hingegen

signifikant auf andere Zellkompartimente (u.a. späte Endosomen/Lysosomen, Plasmamembran) verteilt. Letztendlich verursacht also nicht der C-Terminus von Ostml über charakteristische Peptidsignale die Retention im ER, sondern vielmehr ist die Missfaltung des Ostml-NT für das Zurückhalten im ER verantwortlich.

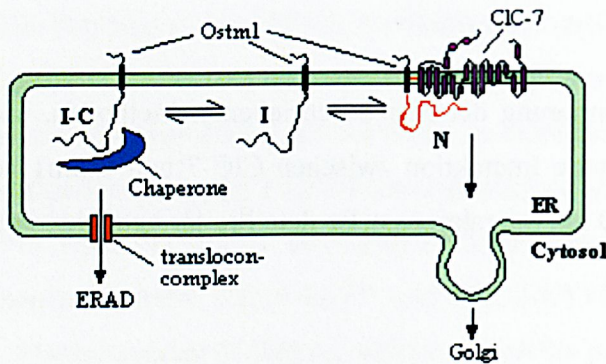


Abbildung 4.2: Retentionsverhalten von Ostml
Retikuläres Ostml befindet sich bezüglich seiner Konformation im Gleichgewicht: Unvollständig gefalteter freier Form (I), gefaltete Chaperon-gebundene Form (I-C), native CIC-7-gebundene Form (N). Die unvollständig gefaltete freie Form wird über ERAD-Mechanismus abgebaut. Im Komplex mit CIC-7 gebundenes Ostml hingegen verlässt das ER.

Physiologisch betrachtet könnte man sich retikuläres Ostml in einem Gleichgewicht bezüglich seiner Konformation in unvollständig gefalteter freier Form (I), unvollständig gefalteter Chaperon-gebundener Form (I-C) und nativer CIC-7-gebundener Form (N) vorstellen (Abb. 4.2). Möglicherweise fungiert CIC-7 als Ligand zur Stabilisierung der Ostml-Konformation im ER, so dass Ostml letztendlich im CIC-7/Ostml-Komplex das ER verlässt. Die unvollständig gefaltete freie Ostml-Form wird hingegen von Chaperonen gebunden und über den ERAD-Mechanismus (ER-assoziierte Degradation) abgebaut. Dementsprechend könnte das Retentionsverhalten von Ostml dem des RBP (retinol binding protein) ähnlich sein, da auch RBP erst nach Bindung von Retinol mit einhergehender Konformationsänderung das ER verlassen kann [Melhus *et al.*, 1992], [Zanotti *et al.*, 1993]. Diese Vermutung wird durch reduziert retikulär vorliegendes Ostml in CIC-7-defizienten Mäusen gestützt [Lange *et al.*, 2006], wobei sich die Reduktion des Ostml durch seine Lokalisation außerhalb seines eigentlichen Funktionsortes (späte Endosomen/Lysosomen mit postulierter Schutzfunktion des CIC-7) erklären könnte.

Studien über das Retentionsverhalten von Ostml könnten unter Umständen bei der Therapie der Osteoporose eine wichtige Rolle spielen. So könnte man Ostml durch modulatorische Effektoren im ER zurückhalten (Bindung möglicherweise am Ostml-NT) und dadurch eine Interaktion mit CIC-7 unterbinden. In Folge würde sich das CIC-7-Proteinlever und damit auch die knochenabbauende Funktion der Osteoklasten verringern.

4.3 Stabilität von CIC-7 und Schutzfunktion von Ostml

Die Stabilität von lysosomal vorliegendem CIC-7 steht in Abhängigkeit zu Ostml, da in Ostml-defizienten *grey-lethal* Mäusen eine reduzierte CIC-7-Proteinmenge mit weniger als 10% des Wildtypniveaus gezeigt werden konnte [Lange *et al.*, 2006]. Dabei lag CIC-7 trotzdem in spät-endosomalen/lysosomalen Kompartimenten vor. Außerdem ist bekannt, dass CIC-7 der einzige Vertreter seiner CIC-Familie ist, der keine N-Glykosylierungsstellen aufweist. Da die β -Untereinheit von CIC-7, Ostml, ein hochgradig glykosyliertes Typ-1-Transmembranprotein darstellt, liegt seine Funktion als Schutz des CIC-7 vor lysosomalen Proteasen nahe.

In dem hier etablierten Stabilitätsassay, in dem die Stabilität von CIC-7 in Abhängigkeit von Wildtyp-Ostml und Ostml- Δ NT untersucht werden sollte, konnten aufgrund nicht reproduzierbarer Daten keine präzisen Aussagen zur Stabilität von CIC-7 gemacht werden. Es konnte jedoch die zeitliche Abnahme von CIC-7 nach Blockierung der Proteinsynthese nachgewiesen werden, was den prinzipiellen Versuchsaufbau in seiner Funktionalität bestätigt. Da die Methode der Stabilitätsuntersuchung von CIC-7 erst in wenigen Versuchsdurchläufen mit begrenzten Versuchsergebnissen erprobt wurde, sollte sie in zukünftigen Untersuchungen optimiert werden. Zum Beispiel besteht die Möglichkeit, die Stabilitätsuntersuchungen einem Pulse-Chase-Verfahren durch radioaktiv-markierte Proteine unter entsprechenden Versuchsbedingungen (mit Wildtyp-Ostml bzw. Ostml- Δ NT) anzupassen.

Da sich die postulierte Schutzfunktion von Ostml molekular betrachtet bis auf seine Glykosylierungsstellen reduzieren lässt, sind im Folgenden näher beschriebenen Strategien zur *in vivo* Deglykosylierung von Ostml aufgeführt, welche letztendlich in die Stabilitätsuntersuchungen involviert werden sollen.

Nahe liegend wäre natürlich die Mutation von Wildtyp-Ostml in denen alle (oder nur ausgewählte) putativen Glykosylierungsstellen ausgeschaltet wären [Ellgaard und Helenius, 2003]. Problematisch wäre jedoch, dass das im N-termini mutierte Ostml-Konstrukt *in vivo* durch eine mögliche Proteinmissfaltung im endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten wird und dementsprechend seinen eigentlichen Bestimmungsort mit CIC-7 in der Zelle nicht erreicht.

Eine andere Möglichkeit der Deglykosylierung von Ostml wäre der Einsatz des Antibiotikum Tunicamycin, welches sich als UDP-GlcNAc Analogon im Zytosol an Dolicholphosphat bindet und somit die Bildung des Core-Oligosaccharids hemmt [Elbein, 1987]. Wiederum ist

jedoch fraglich, ob die entsprechend ausgebildete Tertiärstruktur des deglykosylierten Ostml die Qualitätskontrolle im endoplasmatischen Retikulum passiert, um letztendlich mit CIC-7 das Lysosomen zu erreichen.

Da die Ausbildung der Tertiärstruktur zum Verlassen des endoplasmatischen Retikulums das limitierende Kriterium der beiden besprochenen Deglykosylierungsmöglichkeiten darstellt, soll nun eine andere Methode, welche erst bei der Kohlenhydratprozessierung im Golgi-Komplex eingreift, besprochen werden [Kundra und Kornfeld, 1999]. In dieser Methode wird in einem ersten Schritt die terminale Glykosylierung durch das Antibiotikum 1-Deoxymannojirimycin (DMJ, inhibiert Golgi α -Mannosidase) inhibiert, so dass eine Prozessierung der Kohlenhydratkette vom hoch-Manosen-Typ zum komplexen-Typ (EndoH-insensitiven Form) [Kornfeld und Kornfeld, 1985] unterbunden wird. Das ausbleiben komplexer Oligosaccharideinheiten wird in einem zweiten Schritt durch Zugabe von Endoglycosidase (EndoH) zur letztendlichen Deglykosylierung ausgenutzt, so dass letztendlich deglykosyliertes Ostml mit CIC-7 im Lysosomen zur Stabilitätsuntersuchung vorliegen könnte.

Die hier aufgeführten Strategien zur *in vivo* Deglykosylierung von Ostml sind vorerst nur theoretisch formuliert und bedürfen experimentaler Vorversuche, bevor sie für die letztendliche Stabilitätsuntersuchung von CIC-7 angewandt werden können.

Da die CIC-7-Stabilität in Abhängigkeit zu seiner β -Untereinheit Ostml bis jetzt nur aufgrund seines reduzierten Proteinlevels in Ostml-defizienten *grey-lethal* Mäusen betrachtet wurde, besteht zur molekularen Betrachtung die Notwendigkeit der Anwendung des beschriebenen Stabilitätsassays.

Eine andere Möglichkeit, die postulierte Schutzfunktion von Ostml zu analysieren, wäre, die Stabilität von CIC-7 in kultivierten Ostml-defizienten Zelllinien vor und nach transienter Transfektion von Ostml zu untersuchen.

Mit erwiesener spezifischer Schutzfunktion von Ostml für lysosomal vorliegendem CIC-7 stellt sich zwangsläufig eine neue Frage. Warum hat CIC-7 seinen autonomen Schutz durch Glykosylierung, im Gegensatz zu seinen anderen CLC-Familienmitgliedern, gegen den spezifischen Schutz mittels Ostml-Interaktion eingetauscht? Aufgrund der engen Zusammenarbeit von CIC-7 und Ostml, und der möglichen Sekretion des Ostml-NT, wäre eine Rückkopplung der CIC-7- bzw. Ostml-Expression durch Eingriff in die Transkriptionskontrolle, oder aber auch eine regulatorische Funktion der CIC-7-Stabilität und der Lysosomen (z.B. Exozytose) denkbar. Diese Annahme eröffnet folglich neue zu

analysierende Forschungsfelder, welche eine wichtige Rolle bei der therapeutischen Diagnostik und Therapie entsprechender Erkrankungen spielen könnten.

4.5 Ausblick

Nachdem Ostml als essentielle β -Untereinheit von ClC-7 identifiziert wurde [Lange *et al.*, 2006], ermöglicht die vorliegende Arbeit erste Einblicke in die submolekulare Interaktion zwischen ClC-7 und Ostml. Da der ClC-7/Ostml-Komplex bei Erkrankungen, v.a. der Osteopetrose und NCL, eine bedeutende Rolle zugesprochen wird, könnte die submolekulare Untersuchung innovative Therapieoptionen ermöglichen.

In der vorliegenden Arbeit konnte der Transmembranbereich von Ostml als essentielle Interaktionsdomäne mit ClC-7 identifiziert werden. Aufgrund der Topologie von Ostml bzw. ClC-7, liegt die Vermutung nahe, dass auch ClC-7 mit einer oder mehreren Transmembrandomänen die Interaktion mit Ostml bildet, sowie es für die Interaktion seiner ClC-Familienmitglieder den ClC-Ks mit ihrer β -Untereinheit, Barttin, gezeigt wurde. Interessant wird daher die zukünftige Fokussierung auf die einzelnen Aminosäuren, welche die Interaktion im ClC-7/Ostml-Komplex realisieren.

Da eine Mutation von ClC-7 bzw. Ostml gravierende pathologische Auswirkungen auf den menschlichen Organismus hat, ist es weiterhin wichtig, die Funktionalität beider Proteine aufzuklären. So wird es für ClC-7 von Interesse sein, den Cl^-/H^+ -Antipotermechanismus zweifelsfrei zu beweisen und seinen Einfluss auf die Ansäuerungskinetik bezüglich des pHs und der Chloridkonzentration zu klären. Für Ostml hingegen scheint primär die molekulare und physiologische Betrachtung seiner postulierten Schutzfunktion für ClC-7 im Komplex von Bedeutung zu sein. Zudem könnten auch noch andere Funktionen (z.B. als Botenstoff) des relativ unerforschten Proteins Ostml zu neuen Erkenntnissen führen. Diese Arbeit bietet v.a. für die Analyse von Ostml neue Lösungsansätze.

Medizinisch betrachtet spielt, mit der physiologischen Aufklärung, die Suche nach regulatorischen und modulatorischen Effektoren des ClC-7/Ostml-Komplex eine zentrale Rolle. Gerade in der Osteoporose, dem phänotypisch betrachteten Osteopetrose-Antagonisten, könnten solche Effektoren an Bedeutung gewinnen. So könnte eine Inhibition der ClC-7-Funktion in Osteoklasten, mit einhergehender Akkumulation von Kochensubstanz, zur Reduzierung der osteoporose-bedingten Knochenresorption führen, was letztendlich die Wiederherstellung einer normalen Knochendichte ermöglicht. Dabei wäre sowohl eine direkte, durch spezifische ClC-Inhibitoren, als auch eine indirekte, durch Substanzen, welche die Interaktion zwischen Ostml und ClC-7 unterbinden, zur Einleitung des ClC-7-

Funktionsverlustes denkbar. Jedoch verlangt die ubiquitäre Expression von CLC-7/Ostm1 den Einsatz von gewebspezifischen Wirkstoffen, um Nebenwirkungen, wie die Neurodegeneration, auszuschließen. Da derzeit die allogene Knochenmark- und Blutstammzelltransplantation die einzige kurative Therapieoption der infantilen Osteopetrose darstellt, wären auch hier innovative Therapieansätze von Bedeutung. Denkbar wäre die Entwicklung von Agenzien auf Grundlage der Ostm1-CLC-7-Interaktion, welche als Ostm1-Analogon die Stabilisierung² von CLC-7 gewährleisten. Demzufolge könnte die Wiederherstellung der CLC-7-Funktion in Osteoklasten den Abbau der im Osteopetrose-Phänotyp akkumulierten Kochensubstanz realisieren.

Letztendlich wird auch die Suche von anderen Interaktionspartnern der CLC-Proteine und speziell des CLC-7-Ostm1-Komplexes, wie zum Beispiel von Adapterproteinen für den zellulären Transport, von Interesse bleiben.

5. Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Geräte

5.1.1.1 Allgemeine Laborgeräte

temperierbarer Schüttler	Thermocycler
Tischzentrifuge, Vortexer	PCR-Tubes, 50 ml Falcon
Bakterieninkubator (37°C, 5% CO ₂) mit / ohne Schüttelfunktion	Operations-/Präparationsbesteck, Fixierunterlage
Eppendorfreaktionsgefäße (V= 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	96well Platten, 8well PCR-Streifen
Pipettensatz (V _{max} = 2 µl, 10 µl, 200 µl, 1 ml) + entsprechende Pipettenspitzen	Glaspotter / elektrischen Potters mit Teflonstab Ultrazentrifuge
Eisbad, Schwenker, Luminator	Zellkulturschalen (Ø 10 cm), Zellschaber
UV-Tisch (Konrad Bands, Wiesloch)	Absaugvorrichtung
Drehtisch, Metallhaken, Ethanol-Desinfektionsbad, Bunsenbrenner	feuchte Kammer, mit Parafinfilm und feuchten Tüchern ausgekleidete Zellkulturschale
Erlenmeyerkolben mit Verschluss	Elektroporationsküvette
Reagenzgläser mit Verschluss, als Reaktionsgefäß für Kultivierung	Überkopffrotator Eppendorf-Zentrifugationsgefäße
Isopropanolbehälter, Styroporboxen	Zubehör für SDS-PAGE, u.a. Minigelkammern, Probenkämme, Fixiervorrichtung und Glasplatten zum Gel gießen
Eppendorfzentrifuge 541	
Objektträger, Spannungsquelle	in Zellkulturlabor: Sterilbank, Inkubator (37°C, 5% (v/v) CO ₂), Wasserbad, 12-Wellplatte, Deck- gläschen, 10 cm Zellkulturschalen, 'live-cell dishes', Glaspipetten, Pipettierhilfe, Kryoröchen, Falcons, Eppendorfreaktionsgefäße, Absaugvorrichtung, Bunsenbrenner
Zubehör Western Blot: Tankblot Kammern, Schwämme, Sandwichvorrichtung, Whatmen- Papier, Nitrocellulose (Porengröße)	
Flachbettegelapparaturen, UV-Transilluminator	
16°C Inkubator	
flüssiger Stickstoff, Stickstofftanks zur Lagerung	

Tabelle 5.1: Allgemeine Laborgeräte

5.1.1.2 Apparaturen

Apparatur	Hersteller
Elektroporator	BioRad (Pulse Controller, Capacitance Extender, GenePulser™)
Spektrophotometer, Nano Drop (DNA Konz. Bestimmung)	Thermo SCIENTIFIC (Karlsruhe, Germany)
Photometer GeneQuant II	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
Photometer, Ultrospec 2100 pro	GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)
LSM 510 META	Carl Zeiss (Oberkochen, Germany)
Westernentwickler	peq Lab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Germany)
ABI Prism 310 Genetic Analyzers	Perkin Elmer (Massachusetts, USA)

Tabelle 5.2.: Apparaturen

5.1.2 Kits und Enzyme

Bezeichnung	Anwendungen	Hersteller
NucleoSpin PlasmidQuickPur Kit	Isolierung von Plasmid-DNA	Macherey –Nagel GmbH&Co.KG (Düren, Germany)
PureLink™, HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit		Invitrogen (Carlsbad, California)
Restriktionsenzyme <i>EcoR I, Sal I, Not I</i>	Restriktionsverdau	Fermentas (St. Leon-Rot, Germany)
illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)
T4-Ligase 5xT4-DNA-Ligase-Puffer	Ligation von Restriktions-fragmenten	Pharmacia Biotech (Freiburg, Germany)
Phusion Phusion-Ploymersepuffer dNTPs	PCR	New England BioLabs Inc. (UK)
Taq 10x Puffer MgCl ₂	Genotypisierung von Mäusen	Pharmacia Biotech (Freiburg, Germany)
BCA Protein Assay Kit	Proteinkonzentrationsbestimmung	Pierce Biotechnology, Inc (Rockford, IL, USA)
Chemolumineszenz-basiertes System: SuperSignal®West Femto/Pico	Western Blot Detektion	Pierce Biotechnology, Inc (Rockford, IL, USA)
Invisorb® Spin Tissue Kit	DNA- Aufreinigung aus Schwanzspitzenbiopsien	Invitek (Berlin, Germany)
ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	DNA-Sequenzierung	Applied Biosystems (Darmstadt, Germany)

Tabelle 5.3.: Kits und Enzyme

5.1.3 Chemikalien, Lösungen und Medien

Für alle Lösungen und Medien wurde deionisiertes Wasser verwendet. Bei angegebenem pH-Wert wurde jener mittels NaOH oder HCl eingestellt. Neben der Zusammensetzung sind den Chemikalien, Lösungen und Medien z.T. auch die Bezugsquellen zugeordnet worden.

Bezeichnung	Zusammensetzung / Bezugsquelle
LB-Medium + Ampicillin + Kanamycin	0,5% NaCl; 0,5% Hefeextrakt; 0,1% Glukose; pH 7 + Antibiotikum (Sigma-Aldrich)
Agarplatten	1 l LB-Amp- bzw. Kana-Medium, 10 g Agar
deionisiertes Wasser	dd H ₂ O, membraPure
HPLC-Wasser	900µl Diethylpyrocarbonat auf 450ml H ₂ O; schütteln, über Nacht bei 37°C inkubieren, autoklavieren
Agarosegele, 1 %ig	1g Agarose auf 100 ml TAE-Pufer
TAE-Puffer (50x)	0,2 M Tris-Acetat; 10 mM EDTA, pH 7,4
Ethidiumbromid	1% ig Carl Roth (Karlsruhe, Germany)
10 fach DNA-Ladepuffer	0,25% (w/v) Bromphenolblau; 0,25% (w/v) Xylencyanol; 30% (w/v) Glycerol

Fortsetzung auf folgender Seite...

Bezeichnung	Zusammensetzung / Bezugsquelle
Waschpuffer-I bis III (für CO-IP)	I: 0,1 % Triton-X-100 in PBS, 100 mM NaCl, 2,5 mM CaCl ₂ , 2,5 mM MgCl ₂ II: Waschpuffer-I + Protease-Inhibitoren: 1x Complete, EDTA-free (1 Tablette á 50 ml, Roche) und 1mM Pefabloc (Roche) III: 0,1 % Triton-X-100 in PBS, 250 mM NaCl, 2,5 mM CaCl ₂ , 2,5 mM MgCl ₂ , Protease-Inhibitoren: 1x Complete, EDTA-free (1 Tablette á 50 ml, Roche) und 1mM Pefabloc (Roche)
Lysispuffer (für die Isolation genomischer DNA)	25mM NaOH ; 0,2mM EDTA ; pH 12
Neutralisationspuffer (Isolation genomischer DNA)	40mM Tris-Cl ; pH 5
HBS-Puffer	150 mM NaCl, 50 mM HEPES, pH 7,5
Protein-G-Sepharose	Sepharose™ Fast Flow, GE Helthcare (Buckinghamshire, UK)
DNA-Marker, 1kB Leiter	Invitrogen (Karlsruhe)
5x SDS-PAGE-Probenpuffer	250mM Tris; 10% SDS; 0,5% Bromphenolblau; 50% Glycerol; bei 50°C lösen
Waschpuffer (GST-pulldown)	0,1 % Triton-X-100 in PBS, Protease-Inhibitoren: 1x Complete, EDTA-free (1 Tablette á 50 ml, Roche) und 1mM Pefabloc (Roche)
Lösungen für die Coomassie-Färbung	Fixierlösung: 50% Methanol, 10% Essigsäure, 40% H ₂ O Färbelösung: Fixierlösung + Spatelspitze Coomassie Blue R-250 Entfärbelösung: 5% Methanol, 7,5% Essigsäure, 87,5% H ₂ O
separating gel 4x buffer	1,5 M Tris, 0,4 % SDS, pH 8,8 HCl
stacking gel buffer	0,5 M Tris, 0,4 % SDS, pH 6,8 HCl
Acrylamid	30 % ig, Carl Roth (Karlsruhe, Germany)
APS	10 % ig
TEMED	MERCK (Darmstadt, Deutschland)
SDS-Laufpuffer (10x)	250 mM Tris, 2 M Glycin, 1 % SDS
Transferpuffer	250 mM Tris, 2 M Glycin, pH 8,2 HCl
Ponceau S -Lösung	2 gPonceau S (MERCK), 30 gTrichloressigsäure, 30 g Sulfosalicylsäure + 100 ml H ₂ O
TBS-T	10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween 20
WB-Blockpuffer	5% Magermilchpulver in TBS-T
Cycloheximid	SIGMA (Deisenhofen, Deutschland)
DEMEM-Medium + Antibiotika	10% (v/v) fötalem Kälberserum (FCA), 25 µg/ml Pyruvat und 2mM Glutamin: + Antibiotika: 50 IU/ml Penicillin und 50 µg /ml Streptomycin (Zellkulturmedium) Gibco-BRL Life Technologies, Karlsruhe
+ DMSO (Einfriermedium)	+ 10% DMSO im jeweiligen Zellkulturmedium (Einfriermedium)
Opti-MEM	Gibco-BRL, Life Technologies, Karlsruhe
Trypsin/EDTA	0,25% Trypsin; 0,02% EDTA in PBS, Gibco-BRL Life Technologies, Karlsruhe
PEI (Polyethylenimin)	1mg/ml in Wasser, Erhitzen auf 80°C, pH 7,2 einstellen (mit 5 M HCl), steril filtrieren (0,22µm)
FuGENE6	Transfektionsreagenz, Roche
PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 7,4 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,5 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
Fixierlösung	4% (w/v) PFA in PBS
PFA-Blocker	30mM Glycin in PBS
Methanol	99,8%, Merck KGaA
saponinhaltiger Blockpuffer	3% BSA; 0,01% Saponin in PBS
Fluoromount G	Southern Biotechnology Associates (Birmingham, Alabama, USA)
Stripp-Puffer	0,5 M NaCl, 0,5 M NaAct
Proteinmarker	Prestained Protein Ladder (Fermentas), Broad Range (Bio-Rad)

Tabelle 5.4.: Chemikalien, Lösungen und Medien

5.1.4 Antikörper

In den folgenden Tabellen 5.2. und 5.3. sind die verwendeten Antikörper wiedergegeben. Dabei sind den in Tabelle 5.2 aufgelisteten Primärantikörpern Verdünnungen für die entsprechend angewandten molekularbiologischen Methoden zugeordnet. Hingegen sind in Tabelle 5.3. die Sekundärantikörper für die Detektion im Western Blot - bzw. in Immunfluoreszenz-Analysen zu finden.

Name	Zielepitop	Spezi es	Verdünnung			Referenz
			WB	IP	IF	
HA.11	HA	Maus	1:500	-	1:1000	[Kornak <i>et al.</i> , 2001]
hLamp-1	humanes Lamp-1	Kan.	-	-	1:5000	[Carlsson <i>et al.</i> , 1993]
hLamp-1	humanes Lamp-1	Maus	-	-	1:5000	Transduction Lab.s (San Jose, California USA)
PDI	h, Maus, Ratte - PDI	Kan.	-	-	1:2000	SIGMA, (Deisenhofen, Ger.)
A-14	cMyc	Kan.	1:200	-	1:500	Santa Cruz (Heidelberg)
9B11	Myc	Maus	-	-	1:500	Cell signalling (Danvers, MA, USA)
9E10-Hyb	Myc	Maus	-	-	-	DSHB
3F10-Hyb	HA	Ratte	-	-	-	Roche AG (Basel, Schweiz)
gl N3	PFTSSRHPGFADLLSEQQLLEVQDC[C]	Kan.	-	-	1:100	[Lange <i>et al.</i> , 2006]
Lamp-1	Maus Lamp-1	Ratte	-	-	1:1000	BD Pharmington (San Jose)
7N4B	GRDRDDEEGAPLL[C]	Kan.	-	-	1:500	[Kornak <i>et al.</i> 2001]
3F10	HA	Ratte	1:1000	-	-	Roche AG (Basel, Schweiz)
Rab4	h, Maus, Ratte - Rab4 (CT)	Maus	1:1000	-	-	Transduction Lab.s (San Jose, California USA)
AP-50	AP-50/ μ 2a von AP-2	Maus	1:250	-	-	Transduction Lab.s (San Jose, California USA)
13.1.7.1	GFP	Maus	1:1000	-	-	Roche AG (Basel, Schweiz)

Tabelle 5.5: Primärantikörper Verwendete Primärantikörper mit entsprechend verwendeter Verdünnung, Spezies und Referenz. Western Blot (WB), Immunpräzipitation (IP), Immunfluoreszenzfärbung (IF), Pulldown (PD). Kaninchen (Kan.), Meerschweinchen (Mrs), Human (h). Überstand Hybridomazellen (Hyb)

Name	Zielepitop	Spezies	Verdünnung	Referenz
α -mouse-HRP	Maus-IgG	Schaf	1:5000	Jackson ImmunoResearch (USA)
α -rat-HRP	Ratten-IgG	Ziege	1:5000	Jackson ImmunoResearch (USA)
α -rab-HRP	Kaninchen-IgG	Ziege	1:5000	Jackson ImmunoResearch (USA)
α -rab Alexa-488	Kaninchen-IgG	Ziege	1:1000	Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA)
α -mouse Alexa-488	Maus-IgG	Ziege	1:1000	Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA)
α -mouse Alexa-555	Maus-IgG	Ziege	1:1000	Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA)
α -rab Alexa-555	Kaninchen-IgG	Ziege	1:1000	Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA)
α -rat Alexa-633	Ratten-IgG	Ziege	1:1000	Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA)
α -rab Alexa-633	Kaninchen-IgG	Ziege	1:1000	Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA)
α -mouse Alexa-633	Maus-IgG	Ziege	1:1000	Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA)

Tabelle 5.6: Sekundärantikörper Verwendete Sekundärantikörper mit entsprechend verwendeter Verdünnung, Spezies und Referenz. Alexa Fluor-gekoppelte Sekundärantikörper für Immundetektionen in Immunzytochemischen Experimenten und HRP (Meerrettichperoxidase) gekoppelte Sekundärantikörper für Western Blot Experimente.

5.1.5 Zelllinien

HeLa - Humane Cervixcarzinom-Zelllinie

HEK293 - Humane embryonale Nierenzellen, ATCC CRL-1537

Mausfibroblasten - Adulte, primäre und immortalisierte Fibroblasten aus Wildtypmäusen, C1C-7 Knockout Mäusen und Ostml Knockout Mäusen, sowie C1C-7/Ostml Doppel-Knockout Mäusen (AG Jentsch)

5.1.6 Bakterienstämme

XL1-Blue - *endA1*, *hsdR12*(*r_K*⁻, *m_K*⁺), *supE44*, *gyrA46*, *thi-1*, *relA1*, *lac*⁻, *F*⁻, *proAB*, *lac1*^q, *lacZ*Δ*M15*, *tet*^r, *recA1*
- elektropotente Zellen, 50μl Aliquots (Lagerung bei -80°C)

5.1.7 Mäuse

- Tiere der Linie *C7A* [Kornak *et al.*, 2001]

5.1.8 Elektronische Datenverarbeitung und Datenanalyse

Software	Anwendung
Software-Paket DNASTAR 4.0 - 5.0 (DNASTAR Inc., Madison, US) oder Vector NTI Advance 9.0 (Infomax, Oxford, UK)	- Auswertung der DNA-Sequenzdaten - PCR Primer Design - Planung rekombinanter PCR (Chimäre) - Sequenzalignment
Nano Drop / ND-1000 V352. (Thermo SCIENTIFIC)	Konzentrationsbestimmung von DNA
Chemi-Capt 5001/ Viber Lournat	Wester Blot Analysator
ZEN LSM 510-Meta Software (Zeiss)	Prozessierung und Analyse der Bilddateien des konfokalen Lasermikroskopes

Tabelle 5.7: Software für Elektronische Datenverarbeitung und Datenanalyse

5.2 Molekularbiologische Techniken

Die Bezugsquelle bzw. die Herstellung verwendeter Plasmidkonstrukte und Primer sind im Anhang zusammengefasst bzw. beschrieben. Alle neu generierten Konstrukte wurden sequenziert, um zu verifizieren.

5.2.1 Transformation von *E.coli*

Die Transformation erfolgte durch Elektroporation. Dabei wurden 0,8 µl des Ligationsansatzes (siehe Ligation) auf Eis in 50 µl elektropotenten XL1-Blue Zellen aufgenommen und in eine Elektroporationsküvette überführt. Mittels eines Stromstoßes (25 µF, 2,0 kV, 400 Ω) wurde sodann die DNA in die Zelle geschleust. Anschließend wurden 800 µl LB-Medium zugegeben und 20-60 Minuten bei 37°C geschüttelt. Nach Anzentrifugation wurden etwa 100 µl des mit Zellen angereicherten Suspensionsunterstandes auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

5.2.2 Kultivierung von transformierten Bakterien

Zur Kultivierung wurde eine von den auf Agarplatten gewachsenen Bakterienkolonien gepickt und in ein Erlenmeyerkolben mit 100 ml vorgelegtem LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum überführt. Nach erfolgtem Animpfen wurde die Zellsuspension über Nacht bei 37°C, 5 % (v/v) CO₂, 230 rpm geschüttelt.

Im Falle von neu generierter Plasmid-DNA wurden Vorkulturen angelegt. Dazu wurden 3 ml LB-Medium inklusive Antibiotikum mit einer Bakterienkolonie angeimpft und in weiteren Schritten für die DNA- Sequenzierung aufgearbeitet (siehe 5.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA).

5.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA (Mini- und Midi-Präparation)

Für die Isolierung der Plasmid-DNA aus den Bakterien wurden kommerzielle Präparations-Kits entsprechend des zu isolierenden Maßstabes (Mini- bzw. Midi-Maßstab) verwendet. Dabei wurde für die Übernachtskultur (Erwartungswert von 100-200 µg Plasmid-DNA) der HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit (PureLink™) verwendet. Die Präparation der Plasmid-DNA aus den Vorkulturen hingegen wurde mit dem NucleoSpin PlasmidQuickPur Kit vorgenommen. Beide Kits beruhen auf dem Aufschluss der Zellsuspension durch alkalische Lyse und selektiv reversibler Bindung von DNA an Silikamembranen.

Beiden Isolationspräparation geht eine Pelletierung der gewonnen Bakterienkultur durch Zentrifugation voraus. Anschließende Arbeitsschritte erfolgten gemäß den Angaben des Herstellers.

5.2.4 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration der isolierten Plasmid-DNA wurde photometrisch bestimmt. Nach Messung der optischen Dichte bei 260 nm mit dem Photometer GeneQuant II (Pharmacia, Uppsala) und anschließender Berechnung konnte die Plasmid-DNA-Konzentration ermittelt werden. Ausgang für die Berechnung war dabei die Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bei einer optischen Dichte von 1. Die Reinheit der Probe wird durch den Quotienten aus den gemessenen optischen Dichten bei 260 nm durch 280 nm wieder gegeben, welcher bei einer proteinfreien DNA Präparation bei 1,8 liegt.

5.2.5 Restriktionsverdau und Dephosphorylierung von DNA

Der Restriktionsverdau von DNA wurde nach Angaben des Enzymherstellers mit entsprechenden Mengen an Restriktionsenzymen unter vorgeschriebenen Reaktionsbedingungen durchgeführt.

Um eine mögliche Selbstligation komplementärer Enden eines geschnittenen Vektors zu unterbinden, wurden die 3'-Enden durch Zugabe von 1 U Alkalischer Phosphatase (Roche) dephosphoryliert (nach Restriktionsverdau; 30 min, 37°C).

5.2.6 DNA-Gelelektrophorese

Um die DNA-Fragmente präparativ aufzutrennen wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Entsprechend der erwarteten DNA-Fragmentgrößen wurden Gele mit 1-2% Agarose in TAE-Puffer inklusive 5mg/l Ethidiumbromid hergestellt und anschließend in Flachbettegelapparaturen in TAE-Puffer eingelegt. Die in Lösung vorliegenden DNA-Fragmente wurden mit 10 fachem DNA-Ladepuffer im Verhältnis 3:1 versetzt und zur Trennung in die eingelassenen Geltaschen aufgetragen. Neben den Proben wurde außerdem ein DNA-Marker (1kB-Leiter von Invitrogen) für die Größenbestimmung aufgetragen. Die Proben wurden bei 100-160 V bis zum gewünschten Auftrennungsgrad laufen gelassen und mittels eines UV-Transilluminators photographiert. Im Falle der Weiterverarbeitung wurden die jeweiligen Banden auf einem UV-Tisch mittels Skalpell herausgeschnitten und für die anschließende Prozedur in Eppendorfgefäßen auf Eis gelagert.

5.2.7 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde nach Herstellerangaben mit dem illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit durchgeführt.

5.2.8 Ligation

Die Ligation erfolgte mit T4 Ligase (1 µl, 5 U/µl) in spezifischem 5xT4-DNA-Ligase-Puffer (2µl). Dabei wurden die zu legierenden Restriktionsfragmente bezüglich ihrer molaren Mengen im ungefähren Verhältnis von 1:3, Vektorfragment zu Insertfragment, eingesetzt und inklusive von Ligase und Puffer mit HPLC-Wasser auf ein Reaktionsvolumen von 10 µl aufgefüllt. Der Ligationsansatz wurde anschließend bei 16°C über Nacht (12-16 h) inkubiert.

5.2.9 Amplifizierung von PCR Fragmenten

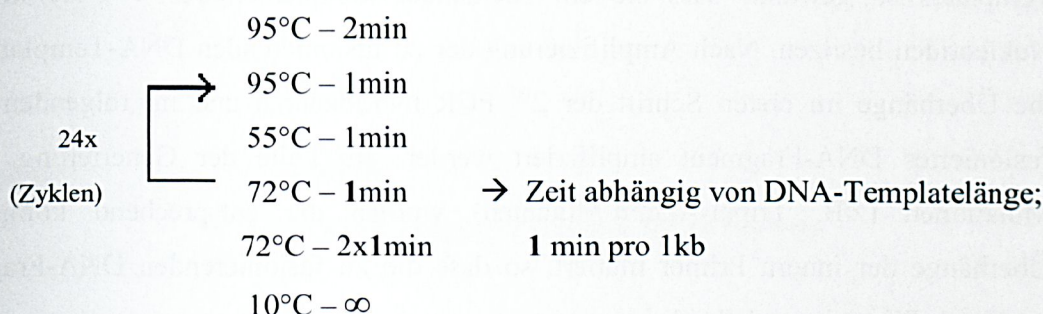
Die Amplifizierung spezifischer DNA-Segmente aus Plasmid-DNA (aus der Plasmid-DNA-Datenbank der AG Jentsch) erfolgte mittels einer Polymerasekettenreaktion. Zur Initiation der Polymeraseaktivität wurden Primer verwendet, welche 5'-Überhänge bezüglich der zu amplifizierenden DNA-Sequenz aufwiesen. In den entsprechenden 5'-Überhängen befanden sich dabei, die für den nachfolgenden Restriktionsverdau spezifischen Enzymschnittstellen.

Die Amplifizierung wurde nach folgendem präparativen Ansatz in PCR-Tubes mittels Thermocycler (PerkinElmer) durchgeführt:

Präparativer Standard-PCR-Ansatz:

- 1 µl DNA-Template
- 1,25 µl dNTPs (10mM)
- 1 µl DMSO (2% bzgl. Endvolumen)
- je 1 µl Vorwärts und Rückwärtsprimer (Endkonzentration: 10 µM)
- 10 µl Phusion-Polymerasepuffer
- 1 µl Phusion
- 33,75 µl HPLC-Wasser (50 µl Endreaktionsvolumen)

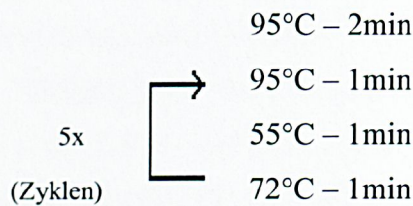
Das zugehörige Standard-PCR-Programm ist nachstehend dargestellt, wobei die Annealingtemperatur den eingesetzten Primern angepasst wurde (G, C- bzw. A, T-Gehalt):

Standard-PCR-Programm:

Nach beendeter Reaktion wurden die in Lösung vorliegenden DNA-Fragmente mit DNA-Ladepuffer versetzt und entsprechend aufgearbeitet.

5.2.10 Rekombinante PCR

Die Generierung von DNA-Mutanten und Chimären erfolgte mittels rekombinanter PCR und den Einsatz spezifischer Primer. Dabei wurden die zu legierenden Fragmente der DNAs nach PCR-Standardprotokoll amplifiziert und aufgereinigt (siehe Absatz 5.2.7., 5.2.8. sowie 5.2.10.) und anschließend als DNA-Templates in einer zweiten PCR aneinandergelagert. Die PCR besteht dabei aus zwei Teilschritten. Im ersten Schritt lagern sich die zu kombinierenden DNA-Fragmente (je 1 µl) nach präparativen Standard-PCR-Ansatz (5.2.9.) aber ohne Primer mit folgendem PCR-Programm zusammen:



Nach Beendigung der Zyklen wurden die Primer zugesetzt und das neu generierte DNA-Fragment nach Standard-PCR-Programm (5.2.9.) amplifiziert. Nach Aufreinigung der DNA und anschließendem Restriktionsverdau, konnte die neu generierten Inserts in die entsprechenden Vektoren eingefügt werden.

Entscheidende Rolle für die Generierung mutierter DNA spielt der Einsatz spezifischer Primer. Bei der Herstellung der Chimäre wurden die inneren Primer der verwendeten Primerpaare, d.h. der Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer der zu fusionierenden Stelle der Templates so gewählt, dass sie ein zueinander komplementäres 5'-Ende mit etwa 15 Nukleotiden besitzen. Nach Amplifizierung der zu fusionierenden DNA-Templates, konnten die Überhänge im ersten Schritt der 2nd PCR hybridisieren und im folgenden Schritt als fusioniertes DNA-Fragment amplifiziert werden. Im Falle der Generierung von DNA-Mutationen (z.B. Tripel-Alanin-Mutanten) wurden die entsprechend komplementären Überhänge der innern Primer mutiert, so dass die zu fusionierenden DNA-Fragmente mit mutierten Primerinsert hybridisieren.

5.2.11 Isolierung genomischer DNA aus Schwanzbiopsien

Um eine Genotypisierung von Mäusen vorzunehmen, wurde genomische DNA aus Schwanzbiopsien mit dem Invisorb® Spin Tissue Kit nach Herstellerangaben (über Säulen) oder nach der 'Hot Shot'-Methode isoliert.

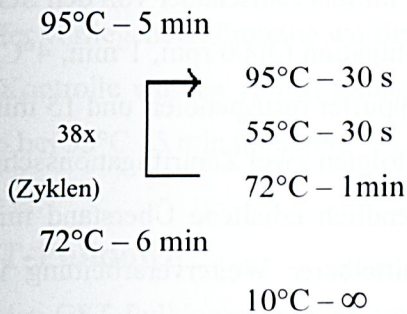
Bei der 'Hot Shot'-Methode wurden 75-100 µl Lysispuffer zum Gewebe pipettiert und nach vollendeter alkalischer Lyse bei 95°C (ca. 60min) äquivalentes Volumen an Neutralisationpuffer zugegeben und bei 4°C gelagert.

5.2.12 Genotypisierung von ClC-7 Mäusen mittels PCR

Präparativer PCR-Ansatz:

- 10 µl, der 1:20 verdünnten Hot Shot-DNA oder 1 µl Säulen-DNA
- 0,1 µl Taq
- 0,5 µl dNTPs (10 mM)
- 0,75 µl MgCl₂
- 0,5 µl Primer (10 µM), Primerpaare wt: 6773 + 4272 und ko: 6775 + 6776
- 2,5 µl 10x Puffer
- 10 µl HPLC-Wasser

PCR-Programm:



PCR-Produkte: wt: 400 bp
ko: 250 bp (unspezifische Bande bei 500 bp)

5.3 Biochemische Methoden

Folgende Arbeitsschritte wurden bei Verwendung von Proteinlysaten auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt und, wenn angegeben, mit Protease-Inhibitoren versetzt, um den Abbau von Proteinen zu minimalisieren.

5.3.1 Herstellung von Proteinlysaten aus Gewebe - Membranpräparation

Für die Analyse relevanter Proteine wurden Gewebelysate aus Mausgehirnen hergesellt. Nach Tötung der Maus durch Genickbruch wurde das Gehirn freigelegt und in PBS auf Eis kurz gewaschen und zwischengelagert. Anschließend wurde je ein Gehirn in 2 ml HBS-Puffer überführt und mittels Glaspotter von Hand oder durch Verwendung eines elektrischen Potters mit Teflonstab bei 1000 rpm homogenisiert. Nun wurden die Zellkerne und nicht-lysierten Zellen durch Zentrifugation bei 1000g 10 Minuten, 4°C abgetrennt und dem Überstand, bestehend aus zytosolischer und membranöser Zellfraktion, Tritonx100 mit einer

Endkonzentration von 1% zugefügt. Es wurde wiederholt zentrifugiert (10000 g, 15 min, 4°C) und der Überstand weiter verarbeitet. Letztendlich wurde erneut zentrifugiert (50000 g, 20 min, 4°C) und der Überstand unmittelbar weiter verwendet oder in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

5.3.2 Herstellung von Proteinlysaten aus transfizierten HEK293- bzw.

MAF-Zellen

In 10 cm Zellkulturschalen kultivierte und transfizierte HEK293- bzw. MAF-Zellen wurden 24 bis 48 Stunden nach erfolgter Transfektion bei einer nahezu 100%igen Konfluenz geerntet. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen kurz in 1ml PBS gewaschen und mit 1ml HBS 1% Triton-X-100 versetzt. Nun wurden die Zellen mittels Zellschaber von den Schalen gelöst und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach Zentrifugation (3000 rpm, 1 min, 4°C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in kaltem Lysepuffer resuspendiert und 15 min auf einem Überkopfröhrator bei 4°C inkubiert. Anschließend folgten zwei Zentrifugationsschritte (14000 rpm, 5 min und 40000 rpm, 20 min). Der letztendlich erhaltene Überstand mit zellulären Membranen und Zytosol wurde bei nicht unmittelbarer Weiterverarbeitung in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

5.3.3 Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA)

Die quantitative Bestimmung des Proteingehaltes wurde mit dem BCA Protein Assay Kit durchgeführt. Dabei wurde die zu untersuchende Proteinprobe mit den Komponenten A und B nach Herstellerangaben in einer Küvette vereinigt und die Absorption bei 595 nm mittels eines Photometers gemessen. Zusätzlich wurde eine BSA-Eichgerade mit diversen Konzentrationen mit entsprechenden Absorptionswerten bei 595 nm erstellt, welche zur Konzentrationsbestimmung der Proteinproben diente. Alle photometrisch ermittelten Werte wurden von Fehlern jeweils dreimal aufgenommen und gemittelt.

5.3.4 (Co-) Immunpräzipitation

Für die Präzipitation von überexprimierten *getagten* Proteinen aus transfizierten HEK293-Zellen wurden Antikörper aus Überständen von Hybridomazellen verwendet. Dabei wurden die im Überschuss vorliegenden Antikörper (1,5 ml des Überstandes; gegen HA- bzw. Myc-Epitope) mittels Zugabe von 50 µl Protein-G-Sepharose (mit Waschpuffer-I vorgewaschen) immobilisiert (90 min auf Überkopfröhrator bei 4°C). Der Inkubation folgten drei Waschröhrte des Pellets mit Waschpuffer-II (3x1 min bei 5000 rpm). Im letzten Waschröhrschritt wurde das

Pellet in 50 µl Ausgangsvolumen aufgenommen und zu 500 µl gewonnen Proteinextrakt zugegeben und invertiert. Nach 90 Minuten Inkubation auf einem Überkoprotator bei 4°C wurden nicht gebundene Proteine mit Waschpuffer-III von der Matrix gewaschen (3x 1min 5000rpm, vortexen). Anschließend wurden die Protein-Antikörper-Protein-G-Sepharose – Komplexe erneut mit einem Niedrigsalzpuffer (Waschpuffer-II) gewaschen, um in folgenden Aufarbeitungen (v.a. in der SDS-PAGE) mögliche Komplikationen durch zu hohe Salzkonzentrationen zu vermeiden. Der letzte Schritt stellt die Denaturierung/Mobilisierung der Proteine dar, welcher durch Zugabe von 100 µl 2x Proben-Puffer zum Pellet, vortexen und 15 min Inkubation bei 55°C realisiert wurde. Um die präzipitierten sowie copräzipitierten Proteine zu analysieren, wurden nicht mobilisierte Proteine sowie überschüssige Protein-G-Sepharose durch Zentrifugation (5000 rpm, 3 min) vom Überstand abgetrennt. Die in Probenpuffer vorliegenden Proteine wurden bei -20°C gelagert.

Als Input-Kontrolle wurden 150 µl (Ausgangs-) Lysat mit 50 µl 4x Proben-Puffer vereinigt und ebenso bei 55°C 15 min inkubiert.

5.3.5 GST-Pulldown

Mit Hilfe des GST-Pulldowns wurden im Lysat vorliegende spezifische Proteine mittels an Glutathion-Sepharose gekoppelter GST-Fusionsproteine (Ostm1-C-Terminus) präzipitiert. Experimentell wurden dazu 30 µg Fusionsprotein mit 5 mg Proteinlysate vereinigt und bei 4°C 2 Stunden auf einem Überkoprotator inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde das Präzipitat mit Waschpuffer aufgereinigt (3x 5 min, 500 g, 4°C und 1x 2500 g, 5 min, 4°C) und in 100 µl 1x Proben-Puffer resuspendiert. Nach Denaturierung (15 min, 55°C) und erneuter Zentrifugation (2500 g, 10 min, 4°C) konnte der Überstand weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert werden. Als Input-Kontrolle wurden ebenfalls 5 mg/ml in Probenpuffer aufgenommenes Proteinlysate verwendet, welches auch denaturiert wurde (15 min 55°C).

Um gleiche Mengen an GST-gekoppelten Fusionsproteinen einsetzen zu können, wurden in einem Vorversuch verwendete Fusionsprotein und 2 µg BSA mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch anschließende Coomassie-Färbung visualisiert. Durch die mitgelaufene BSA-Bande mit bekannter Proteinkonzentration, konnten so die Konzentrationen der Fusionsproteine abgeschätzt und entsprechend mit Glutathion-Sepharose für den Einsatz im GST-Pulldown verdünnt werden. Auch eine angefertigte Ponceau S-Färbung, nach erfolgter SDS-PAGE und Western Blot präzipitierter Proteine, diente als Kontrolle des Einsatzes gleicher Mengen an GST-gekoppelten Fusionsproteinen.

5.3.6 SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülgröße, in dem die reduzierten Proteine mit Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulphate – SDS) beladen wurden und entsprechend ihres Masse/Ladungsverhältnisses in einem Polyacrylamidgel (Trenngel) elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Durch ein vorgeschaltetes Sammelgel mit niedrigem pH-Wert in Kombination mit glycinhaltigem Laufpuffer konnte in der diskontinuierlichen SDS-PAGE die Trennschärfe erhöht werden.

Praktisch wurde zuerst das SDS-Gel, Trenn- und Sammelgel (8-12,5%ig), gegossen und Geltaschen mit Hilfe eines Gelkammes (10 bzw. 15 Taschen) gesetzt. Die hergestellten Gele wurden dann in SDS-Laufpuffer gefüllten Minigelkammern gesetzt und die aufzutrennen Proteinlösungen in Probenpuffer in die Geltaschen überführt. Zudem wurde das Gel mit einem Molekulargewichtsmarker für die spätere Identifizierung von detektierten Proteinen (bzgl. ihrer Laufgröße im Gel) beladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 120 V bis unmittelbar vor dem Austritt der blauen Probenpufferfront aus dem Gel.

5.3.7 Western Blot und Ponceau S-Färbung

Nach erfolgter gelelektrophoretischer Auftrennung wurden die Proteine auf eine Trägermembran (Nitrocellulose-Membran) transferiert, um eine anschließende Detektion der Proteine zu ermöglichen. Für die elektrophoretische Übertragung wurde das Tank-Blot-System angewandt, welche in Transferpuffer bei 75 V für 2 h auf Eis im Kühlraum (4°C) realisiert wurde.

Nach dem Western Blot wurde die Membran in Ponceau S - Lösung inkubiert, um Qualität des Proteintransfers zu überprüfen. Dafür wurde die Membran etwa 2 Minuten in Ponceau S-Lösung inkubiert und anschließend durch Waschen Wasser entfärbt. Zudem wurden die Membranen zur Dokumentation eingescannt.

5.3.8 Immundetektion

Für die Detektion der Proteine wurden Primärantikörper entweder gegen das Protein gerichtet oder gegen an Protein fusionierte *Tags* (HA-, Myc-Epitope) verwendet. Durch Bindung von HRP-konjugierten Sekundärantikörpern an den Primärantikörper konnten die Proteine durch ein Chemolumineszenz-basiertes System indirekt detektiert werden.

Experimentell wurde die Nitrocellulose-Membran mit immobilisierten Proteinen zuerst 45 Minuten in Blockpuffer schwenkend bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische

bindung zu verhindern. Anschließend wurde die Membran mit Primärantikörperlösung (Primärantikörper in Blockpuffer mit entsprechender Verdünnung) eingetütet/ingeschweißt und über Nacht bei 4°C schwenken gelassen. Nach Inkubation des Primärantikörpers wurde die Membran viermal sieben Minuten in TBS-T, gewaschen bevor der Sekundärantikörper in Blockpuffer für eine Stunde zugegeben wurde. Abermals wurde viermal sieben Minuten mit TBS-T gewaschen. Für die anschließende Detektion wurde das Chemolumineszenz-basierte System von Pierce nach Herstellerangaben verwendet. Zur Dokumentation wurde ein CCD-Kamerabasiertes System genutzt, wobei die Entwicklungszeiten in Abhängigkeit zur Menge der zu detektierenden Proteine bzw. der Antikörper standen.

3.9 Strippen von Western Blot Membranen

Für eine erneute Immundetektion von Western Blot Membranen mussten gebundene Antikörper wieder mobilisiert werden. Dies wurde durch Inkubation der Membran in Strippuffer (30 min auf Schüttler) und anschließendem Waschen in T-BST realisiert.

3.10 Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung diente als Quantifizierung der im Pulldown verwendeten GST-skoppelten Fusionsproteine und wurde experimentell nach erfolgter Auftrennung mittels SDS-PAGE in drei Schritten durchgeführt. Im ersten Schritt wurde das Gel 3 Stunden schüttelnd in Fixierlösung inkubiert. Anschließend wurde das Gel gefärbt, indem es in Fixierlösung mit 0,25% Coomassie Blue R-250 überführt wurde. Nachdem sich das Gel homogen blau gefärbt hatte (nach 2 bis 4 h), wurde es in Entfärbelösung gelegt bis sich entsprechende Proteinbanden abzeichneten und der Hintergrund ausbleichte. Die Gele wurden ausreichend mit Wasser gespült und zur Lagerung eingeschweißt. Zur Dokumentation wurden die Gele eingescannt.

3.11 Stabilitätsassay

Für den Stabilitätsassay wurden in 10 cm Zellkulturschalen kultivierte, mit entsprechenden Proteinen transfizierte HEK293-Zellen eingesetzt (Einzeltransfektion von CIC-7-cDNA, Cotransfektion von Ostml-cDNA und CIC-7-cDNA bzw. Ostml-ΔNT-cDNA und CIC-7-cDNA). 12h nach Transfektion (Zeitpunkt T_0) wurden den subkonfluenten Zellen Cycloheximid (100 µg/ml) zupipettiert, um die weitere Expression zu unterbinden. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen dann geerntet und wie in vorherigen Kapiteln

5.3.6 SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülgröße, in dem die reduzierten Proteine mit Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulphate – SDS) beladen wurden und entsprechend ihres Masse/Ladungsverhältnisses in einem Polyacrylamidgel (Trenngel) elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Durch ein vorgeschaltetes Sammelgel mit niedrigem pH-Wert in Kombination mit glycinhaltigem Laufpuffer konnte in der diskontinuierlichen SDS-PAGE die Trennschärfe erhöht werden.

Praktisch wurde zuerst das SDS-Gel, Trenn- und Sammelgel (8-12,5%ig), gegossen und Geltaschen mit Hilfe eines Gelkammes (10 bzw. 15 Taschen) gesetzt. Die hergestellten Gele wurden dann in SDS-Laufpuffer gefüllten Minigelkammern gesetzt und die aufzutrennen Proteinlösungen in Probenpuffer in die Geltaschen überführt. Zudem wurde das Gel mit einem Molekulargewichtsmarker für die spätere Identifizierung von detektierten Proteinen (bzgl. ihrer Laufgröße im Gel) beladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 120 V bis unmittelbar vor dem Austritt der blauen Probenpufferfront aus dem Gel.

5.3.7 Western Blot und Ponceau S-Färbung

Nach erfolgter gelelektrophoretischer Auftrennung wurden die Proteine auf eine Trägersmembran (Nitrocellulose-Membran) transferiert, um eine anschließende Detektion der Proteine zu ermöglichen. Für die elektrophoretische Übertragung wurde das Tank-Blot-System angewandt, welche in Transferpuffer bei 75 V für 2 h auf Eis im Kühlraum (4°C) realisiert wurde.

Nach dem Western Blot wurde die Membran in Ponceau S - Lösung inkubiert, um Qualität des Proteintransfers zu überprüfen. Dafür wurde die Membran etwa 2 Minuten in Ponceau S-Lösung inkubiert und anschließend durch Waschen Wasser entfärbt. Zudem wurden die Membranen zur Dokumentation eingescannt.

5.3.8 Immundetektion

Für die Detektion der Proteine wurden Primärantikörper entweder gegen das Protein gerichtet oder gegen an Protein fusionierte Tags (HA-, Myc-Epitope) verwendet. Durch Bindung von HRP-konjugierten Sekundärantikörpern an den Primärantikörper konnten die Proteine durch ein Chemolumineszenz-basiertes System indirekt detektiert werden.

Experimentell wurde die Nitrocellulose-Membran mit immobilisierten Proteinen zuerst 45 Minuten in Blockpuffer schwenkend bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische

Bindung zu verhindern. Anschließend wurde die Membran mit Primärantikörperlösung (Primärantikörper in Blockpuffer mit entsprechender Verdünnung) eingetütet/eingeschweißt und über Nacht bei 4°C schwenken gelassen. Nach Inkubation des Primärantikörpers wurde die Membran viermal sieben Minuten in TBS-T, gewaschen bevor der Sekundärantikörper in Blockpuffer für eine Stunde zugegeben wurde. Abermals wurde viermal sieben Minuten mit TBS-T gewaschen. Für die anschließende Detektion wurde das Chemolumineszenz-basierte System von Pierce nach Herstellerangaben verwendet. Zur Dokumentation wurde ein CCD-Kamerabasiertes System genutzt, wobei die Entwicklungszeiten in Abhängigkeit zur Menge der zu detektierenden Proteine bzw. der Antikörper standen.

5.3.9 Strippen von Western Blot Membranen

Für eine erneute Immundetektion von Western Blot Membranen mussten gebundene Antikörper wieder mobilisiert werden. Dies wurde durch Inkubation der Membran in Stripp-Puffer (30 min auf Schüttler) und anschließendem Waschen in T-BST realisiert.

5.3.10 Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung diente als Quantifizierung der im Pulldown verwendeten GST-gekoppelten Fusionsproteine und wurde experimentell nach erfolgter Auftrennung mittels SDS-PAGE in drei Schritten durchgeführt. Im ersten Schritt wurde das Gel 3 Stunden schüttelnd in Fixierlösung inkubiert. Anschließend wurde das Gel gefärbt, indem es in Fixierlösung mit 0,25% Coomassie Blue R-250 überführt wurde. Nachdem sich das Gel homogen blau gefärbt hatte (nach 2 bis 4 h), wurde es in Entfärbelösung gelegt bis sich entsprechende Proteinbanden abzeichneten und der Hintergrund ausbleichte. Die Gele wurden ausreichend mit Wasser gespült und zur Lagerung eingeschweißt. Zur Dokumentation wurden die Gele eingescannt.

5.3.11 Stabilitätsassay

Für den Stabilitätsassay wurden in 10 cm Zellkulturschalen kultivierte, mit entsprechenden Proteinen transfizierte HEK293-Zellen eingesetzt (Einzeltransfektion von CIC-7-cDNA, Kotransfektion von Ostml-cDNA und CIC-7-cDNA bzw. Ostml-ΔNT-cDNA und CIC-7-cDNA). 12h nach Transfektion (Zeitpunkt T_0) wurden den subkonfluenten Zellen Cycloheximid (100 µg/ml) zupipettiert, um die weitere Expression zu unterbinden. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen dann geerntet und wie in vorherigen Kapiteln

(5.3.2./6./7./8.) erläutert bis zur Immundetektion aufgearbeitet. Letztendlich kann durch Quantifizierung der Western Blots die CIC-7 Halbwertszeit ermittelt werden.

5.4 Zellkulturarbeiten

Zellkulturarbeiten wurden ausschließlich unter einer Sterilbank unter Verwendung sterilisierter Reagenzien und Materialien durchgeführt. Zellkulturinkubatoren (37°C mit 5% (v/v) CO₂-Konzentration in Wasserdampf gesättigte Atmosphäre) dienten der Kultivierung aller verwendeten Zellen. Zellkulturschalen sowie Wellplatten wurden von der Firma Nunc (Nagle Nunc International, Wiesbaden) bezogen.

5.4.1 Kultur von HeLa-, HEK293- und MAF- Zellen

HeLa-, HEK293- und MAF-Zellen wurden in DEMEM-Medium mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum (FCS), 25 µg/ml Pyruvat und 2 mM Glutamin kultiviert und zur Vermeidung mikrobieller Kontamination mit Antibiotika (50 IU/ml Pencillin und 50 µg/ml Streptomycin) versetzt. Die Passagierung der Zellen erfolgte bei nahezu 100%iger Konfluenz im Verhältnis 1:5 bis 1:10. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und durch Zugabe von Trypsin-EDTA (1 ml pro 10 cm Schale) gelöst. Nach 5 Minuten Inkubation im Zellkultur-Inkubator lagen die Zellen vereinzelt vor, so dass nun durch Zugabe von frischem DEMEM-Medium (mit Antibiotika) die Proteaseaktivitäten unterbunden wurden und die Zellen in neue Kulturschalen, Wellplatten bzw. für FRET in 'live-cell dishes' ausgesät werden konnten.

5.4.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Auf 10 cm Zellkulturschalen wachsende Zellen wurden nach Erreichen 100%iger Konfluenz mit PBS gewaschen und trypsinisiert. Die vereinzelter Zellen wurden in frischem DEMEM-Medium (mit Antibiotika) aufgenommen und in Falcon überführt. Nun wurden die Zellen pelletiert (500g, 5min), in 5 ml frischem DEMEM-Medium mit 10% (v/v) DMSO ohne Antibiotika resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen etappenweise von -20°C auf -80°C in Isopropanolbehälter oder Styroporboxen eingefroren und in flüssigen Stickstoff eingelagert.

Um eingefrorene Zellen wieder zu kultivieren, wurde die Zellsuspension im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und das Einfriermedium durch frisches DEMEM-Medium mit Antibiotika nach Sedimentation der Zellen (500 g, 5 min) ersetzt. Nun konnten die Zellen ausgesät werden, jedoch wurden sie erst nach erneuter Passagierung zur Transfektion weiterverwendet.

5.4.3 Transiente Transfektion

5.4.3.1 mit FuGENE6

HeLa- und MAF-Zellen wurden für spätere Immunfluoreszenzfärbungen in 12-Wellplatten auf Deckgläschen kultiviert. Die Transfektion erfolgte mit FuGENE6 (Roche AG, Basel, Schweiz), wobei pro Well zu 0,5-1 µg DNA 1,2 µl FuGENE in 100 µl Opti-MEM zupipettiert und nach Vortexen 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. In der Zwischenzeit wurde das Zellkulturmedium der zu transfizierenden Zellen durch frisches ersetzt (1 ml pro Well). Im letzten Schritt wurde der DNA-FuGENE-Mix tropfenweise in die Wells gegeben. Nach 12 Stunden wurde das Zellkulturmedium erneuert.

Die Transfektion von in 'live-cell dishes' kultivierten Zellen wurde ebenso mit FuGENE, jedoch mit dem dopplten Ansatz an FuGENE, Opti-MEM und Plasmid- DNA durchgeführt.

5.4.3.2 mit PEI

Die Transfektion mit PEI von HEK293- und MAF-Zellen in 10 cm Zellkulturschalen wurde analog, wie in Kapitel 5.4.3.1. mit FuGENE beschrieben, durchgeführt, wobei natürlich die Mengen relevanter Komponenten (PEI, Plasmid-DNA, Opti-MEM) dem Zellzuwachs angeglichen wurde. Dementsprechend wurden 8 µg DNA mit 12 µl PEI in 500 µl Opti-MEM zu den subkonfluenten Zellen zugegeben. Die in 10 cm Schalen transfizierten Zellen wurden ausschließlich für die biochemische Methoden (Co-)Immunpräzipitation, GST-Pulldown und Stabilitätsassay verwendet.

5.5 Immunzytochemie von Zellkulturen

5.5.1 Fixierung mit Paraformaldehyd oder Methanol

In 12-Wellplatten auf Deckgläschen kultivierte und transfizierte HeLa- bzw. MAF-Zellen wurden für die anschließende Immunfluoreszenzfärbung mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Praktisch wurde zuerst das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen kurz mit PBS gewaschen. Nun erfolgte die Fixierung durch 15 Minuten Inkubation mit 4% (w/v) PFA/PBS. Danach wurde die Fixierlösung entfernt und die noch freien PFA-Bindungsstellen durch 5 Minuten Inkubation mit 30 mM Glycin in PBS abgesättigt. Nun wurden die fixierten Zellen mit PBS gewaschen und konnten für die weitere Präparation der Immunfluoreszenzfärbung verwendet werden.

Bei der Methanol-Fixierung wurden die auf den Deckgläschen mit PBS gewachsenen Zellen durch Inkubation mit vorgeföhlttem Methanol (etwa -20°C) 5 Minuten bei -20°C fixiert. Nach

erfolgreicher Fixierung wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und ohne Immunfluoreszenzfärbungen direkt auf Objektträger fixiert (Fixierung siehe 5.5.2.).

5.5.2 Immunfluoreszenzen

Nach der PFA-Fixierung der Zellen auf Deckgläschen konnte nun die Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt werden. Zuerst wurden die Zellen durch Inkubation mit 3% (w/v) BSA, 0,1% (w/v) Saponin in PBS (saponinhaltiger Blockpuffer) 30 Minuten permeabilisiert und geblockt. Bis hierhin wurden alle Experimente bzgl. der auf Deckgläschen kultivierten und transfizierten Zellen in den 12-Wellplatten durchgeführt. Die folgende Inkubation mit Antikörpern hingegen fand in so genannten feuchten Kammern statt, wobei die zwischenzeitlichen Waschschriffe wiederum in den 12-Wellplatten vorgenommen wurden. Eine feuchte Kammer stellte dabei eine mit Parafilm und feuchten Tüchern ausgekleidete Zellkulturschale dar. Pro Ansatz wurden 50 µl Primärantikörper entsprechend ihrer Verdünnung in 3% (w/v) BSA, 0,1% (w/v) Saponin in PBS auf den Parafilm pipettiert und das Deckgläschen mit den Zellen kopfüber auf die Tropfen gelegt. Anschließend wurde die Zellkulturschale abgedeckt und die Zellen in Primärantikörperlösung über Nacht inkubiert. Danach wurde viermal in PBS gewaschen (1x kurz, 3x 5 min) und der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper mit entsprechender Verdünnung in saponinhaltigem Blockpuffer nach gleicher Prozedur auf die Deckgläschen gebracht. Nach einer Stunde Inkubation der Sekundärantikörperlösung wurden die Zellen wiederum viermal in PBS gewaschen (1x kurz, 3x 5min) und anschließend die Deckgläschen mittels Fluoromount G auf Objektträger fixiert. Nach Trocknung des Fixiermediums konnten die Präparate im Kühlschrank gelagert werden.

Die Visualisierung und Auswertung wurde am konfokalen Mikroskop (LSM510) im seriellen Modus durchgeführt.

5.5.3 Lokalisationsassay

Experimentell wurden blind Einzel- und Kotransfektion an HeLa-Zellen nach 5.4.3.1 mit FuGENE durchgeführt und die Zellen entsprechend den Abschnitten 5.5.1 und 5.5.2 fixiert, gefärbt und detektiert. Die Zuordnung der überexprimierten Ostml-CD4-Chimäre zu zellulären Kompartimenten erfolgte in vier Kategorien; Endoplasmatisches Retikulum (ER), Lysosomen (Lys), Plasmamembran (PM) und undefiniert (undef.). Die lysosomale Lokalisation wurde durch die Detektion des schon erwähnten lysosomalen Markerproteins Lamp-1 realisiert, wobei neben der Koloalisation des Ostml-CD4-Chimärs und Lamp-1

auch CLC-7 detektierbar sein musste. Die Zuordnung zum endoplasmatischem Retikulum und zur Plasmamembran wurde ohne spezifische Markerproteine aufgrund der charakteristischen zellulären Struktur bzw. Lokalisation vorgenommen. Für die spätere Quantifizierung wurden pro Deckgläschen mehr als 100 Zellen gezählt, wobei jede Zelle individuell ausgewertet und einer der vier Kategorien zugeordnet wurde. Im Falle, dass sich die Zellen mit entsprechend exprimierten Chimären nicht eindeutig zu einem der drei beschriebenen Zellkompartimenten (ER, Lys, PM) zuordnen ließ, wurden die Zellen in der Kategorie undefiniert mitgeführt.

5.5.4 FRET - Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer, Akzeptorbleaching

Zunächst wurden die in 'live-cell dishes' kultivierten HeLa-Zellen mit cDNA FRET-kompetenter Proteine (Proteine gebunden an Donorfluorophor (ECFP) bzw. Akzeptorfluorophor (EYFP)) transfiziert. Nach einer Expressionszeit von etwa 24 Stunden und hinreichender Konfluenz wurden das Zellkulturmedium durch Standard-Puffer ersetzt und FRET-Messungen am konfokalen Mikroskop *in vivo* durchgeführt. Dabei wurden vor und nach dem Bleichen Aufnahmen im seriellen Modus (Anregung: 2-Photonen-Mikroskopie 810 nm 8% Output-Power, 514 nm 1% Output-Power; Detektion: 430-505 nm und 537-655 nm) und Lambda Stack Modus (Anregung: 2-Photonen-Mikroskopie 810 nm 8% Output-Power, Detektion: 414 nm, 425 nm, 436 nm, 447 nm, 457 nm, 468 nm, 479 nm, 489 nm, 500 nm, 511 nm, 521 nm, 532 nm, 543 nm, 554 nm, 564 nm, 575 nm, 586 nm, 596 nm, 607 nm, 618 nm, 628 nm, 639 nm) aufgenommen. Die Auswertung erfolgte über die LSM 510-META Software.

Das Bleichen erfolgte innerhalb eines definierten Areals (region of interest, ROI) für 1 Minute mit dem 514 nm-Laser bei 100% Output-Power. Für die Untersuchung der FRET-Effizienz wurden innerhalb des gebleichten Areals im Lambda Stack Modus (vor und nach Bleichen) erneut ROIs gesetzt, welche (kolokalisierte) fluoreszierende Proteine beinhalteten und deren Emissionsintensitäten aufgenommen wurden. Außerdem wurden parallel Intensitäten eines ROIs außerhalb der gebleichten Areale erfasst, um eine Hintergrundkorrektur zu ermöglichen. Die korrigierten Intensitäten wurden nun vergleichend in zwei Diagrammen dargestellt. In einem Diagramm wurden die gesamten Intensitäten eines Versuches auf die Intensität von 479 nm vor dem Bleichen normalisiert, um Aussagen zur CFP-Fluoreszenzänderung treffen zu können. In dem anderen Diagramm wurden die jeweiligen Intensitäten von vor und nach dem Bleichen auf den entsprechenden Intensitätswert von 479 nm (vor und nach dem Bleichen) normalisiert, welches zur Untersuchung der YFP-Fluoreszenzänderung dient. Hingegen wurden bei der Darstellung der Emmissionsdetektion der einzelexprimierten YFP-

Konstrukte nur die Emissionsintensitäten vor dem Bleichen aufgeführt, da sich die YFP-Konstrukte mit der entsprechenden Methodik nicht anregen ließen. Normalisiert wurden die Emissionsintensitäten der einzelexprimierten YFP-Konstrukte dabei auf die gemittelte Emissionsintensität bei 479 nm vor dem Bleichen des Versuchsansatzes mit selbigem YFP-Konstrukt und zu untersuchendem CFP-Konstrukt.

Alle Diagramme wurden dabei aus gemittelten Emissionsintensitäten mehrerer Versuchsansätze unter gleichen Bedingungen (Größe der ROI, Bleichvorgang) mit entsprechender Standardabweichung erstellt.

Die FRET-Effizienz wurde durch den Vergleich der CFP-Fluoreszenzänderung vor und nach dem Bleichen ermittelt, wobei die gemittelten Emissionsintensitäten im Bereich von 436 nm – 498 nm (normalisiert auf die Intensität von 479 nm vor dem Bleichen) in die Berechnung einbezogen wurden.

6. Literaturverzeichnis

- [Accardi und Miller, 2004] Accardi, A., und Miller, C.(2004) *Secondary active transport mediated by a prokaryotic homologue of CLC Cl- channels*. Nature, 26;427(6977):803-7.
- [Bateman, 1997] Batman, A. (1997). *The structure of a domain common to archaeobacteria and the homocystinuria disease protein*. Trends Biochem Sci, 22(1):12–13.
- [Bennetts et al., 2007] Bennetts, B., M.W. Parker, and B.A. Cromer (2007). *Inhibition of skeletal muscle CLC-1 chloride channels by low intracellular pH and ATP*. J. Biol. Chem. 282:32780–32791
- [Bennetts et al., 2005] Bennetts, B., Rychkow, G.Y., NG, H.-L., Morton, C.J., Stapleton, D., Parker, M.W. und Cromer, B.A. (2005). *Cytoplasmic ATP-sensing domains regulate gating of skeletal muscle CLC-1 chloride channels*. J Biol Chem, 280(37):32452–32458.
- [Birkenhäger et al., 2001] BIRKENHÄGER, R., E. OTTO, M. J. SCHÜRMANN, M. VOLLMER, E. M. RUF, I. MAIER-LUTZ, F. BEEKMANN, A. FEKETE, H. OMRAN, D. FELDMANN, D. V. MILFORD, N. JECK, M. KONRAD, D. LANDAU, N. V. KNOERS, C. ANTIGNAC, R. SUDBRAK, A. KISPERT und F. HILDEBRANDT (2001). *Mutation of BSND causes Bartter syndrome with sensorineural deafness and kidney failure*. Nat Genet, 29(3):310–314.
- [Brandt und Jentsch, 1995] Brandt, S., and Jentsch, T. J. (1995) *CLC-6 and CLC-7 are two novel broadly expressed members of the CLC chloride channel family*. FEBS Lett. 377, 15–20
- [Carlsson et al., 2003] Carlsson, S. R., Lycksell, P.-O. & Fukuda, M. (2003). *Assignment of O-glycan attachment sites to hinge-like regions of human lysosomal membrane glycoproteins lamp-1 and lamp-2*. Arch. Biochem. Biophys. 304, 65-73(1993).
- [Carr et al., 2003] Carr, G., N. Simmons und J. Sayer (2003). *A role for CBS domain 2 in trafficking of chloride channel CLC-5*. Biochem Biophys Res Commun, 310(2):600–5.

- [Chalhoub *et al.*, 2003] Chalhoub, N., Benachenhou, N., Rajapurohitam, V., Pata, M., Ferron, M., Frattini, A., Villa, A., and Vacher, J. (2003) *Grey-lethal mutation induces severe malignant autosomal recessive osteopetrosis in mouse and human*. Nat. Med. 9, 399 – 406
- [Chen und Chen, 2001] Mei-Fang Chen and Tsung-Yu Chen (2001). *Different Fast-Gate Regulation by External Cl^- and H^+ of the Muscle-Type Clc Chloride Channels*. J. Gen. Physiol, Vol. 118, Nb. 1,
- [Dutzler *et al.*, 2002] R. Dutzler, E.B. Campbell, M. Cadene, B.T. Chait, R. MacKinnon *X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity*. Nature, 415(6869):287–294.
- [Dutzler *et al.*, 2003] Dutzler R., Campbell E.B., MacKinnon R. (2003). *Gating the selectivity filter in ClC chloride channels*. Science. 2003 Apr 4;300(5616):108-12.
- [Elbein *et al.*, 1987] Elbein, A.D. (1987) Inhibitors of the biosynthesis and processing of N-linked oligosaccharide chains. *Annu Rev Biochem* **56**: 497-534.
- [Ellgaard und Helenius, 2003] Ellgaard, L. und Helenius, A. (2003). *Quality control in the endoplasmic reticulum*. Nat Rev Mol Cell Biol, 4(3):181–191.
- [Eskelinen *et al.*, 2003] Eskelinen, E. L., Tanaka, Y. & Saftig, P. (2003) *At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins*. Trends Cell Biol. 13, 137–145
- [Estévez *et al.*, 2001] Estévez, R., T. Boettger, V. Stein, R. Birkenhäger, E. Otto, F. Hildebrandt und Jentsch, T. J. (2001). *Barttin is a Cl⁻ channel beta-subunit crucial for renal Cl⁻ reabsorption and inner ear K⁺ secretion*. Nature, 414(6863):558–561.
- [Estévez *et al.*, 2004] Estévez R., Pusch M., Ferrer-Costa C., Orozco M., Jentsch T.J. (2004). *Functional and structural conservation of CBS domains from CLC channels*. J. Physiol. 557.2, 363-378.

- [Faundez und Hartzell, 2004] Faundez, V., and Hartzell, H. C. (2004). *Intracellular chloride channels: determinants of function in the endosomal pathway*. *Sci. STKE* 2004, re8
- [Fischer et al., 2003] Fischer, T., De Vries, L., Meerloo, T. & Farquhar, M. G. (2003). *Promotion of Gai3 subunit down-regulation by GIPN, a putative E3 ubiquitin ligase that interacts with RGS-GAIP*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100, 8270–8275 (2003).
- [Feigin et al., 2008] Feigin ME, Malbon CC. (2008) *OSTM1 regulates beta-catenin/Lef1 interaction and is required for Wnt/beta-catenin signaling*. *Cell Signal*. 2008 May;20(5):949-57. Epub 2008 Jan 24.
- [Förster, 1948] Förster, T.(1948). *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz*. *Ann. Physik* 6(2):55, 1948.
- [Fukuda, 1991] FUKUDA, M. (1991). *Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis and intracellular trafficking*. *J Biol Chem*, 266(32):21327–21330.
- [Gadella und Jovin, 1995] Gadella T. W. J. und Jovin, T. M.(1995) *J. Cell Biol.* **1995**, 129, 1543-1558.
- [Graves et al., 2008] A. R. Graves, P. K. Curran, C. L. Smith und J. A. Mindell (2008) *The Cl⁻/H⁺ antiporter CIC-7 is the primary chloride permeation pathway in lysosomes*. *Nature* 453, 788-792
- [Gründer et al., 1992] Gründer S., Thiemann A., Pusch M., Jentsch T.J. (1992). *Regions involved in the opening of CIC-2 chloride channel by voltage and cell volume*. *Nature* 360, 759-762.
- [Grünerberg, 1936] Grünerberg, H (1936). *Grey-lethal, a new mutation in the housemouse*. *J. Heredity*, 27:105–109.

- [Hebeisen *et al.*, 2004] Hebeisen, S., A. Biela, B. Giese, G. Muller-Newen, P. Hidalgo und C. Fahlke (2004). *The role of the carboxy-terminus in CLC chloride channel function*. J Biol Chem. *aheadofprint*.
- [Hryciw *et al.*, 2004] Hryciw Deanne H; Ekberg Jenny; Lee Aven; Lensink Ingrid L; Kumar Sharad; Guggino William B; Cook David I; Pollock Carol A; Poronnik Philip (2004). *Nedd4-2 functionally interacts with CLC-5: involvement in constitutive albumin endocytosis in proximal tubule cells*. J Biol Chem, 279(53):54996–55007.
- [Hryciw *et al.*, 2003] Hryciw Deanne H; Wang Yinghong; Devuyst Olivier; Pollock Carol A; Poronnik Philip; Guggino William B (2003). *Cofilin interacts with CLC-5 and regulates albumin uptake in proximal tubule cell lines*. J Biol Chem, 278(41):40169–76.
- [Jentsch, 2008] Jentsch, T.J. (2008) *CLC chloride channels and transporters: from genes to protein structure, pathology and physiology*. Crit Rev Biochem Mol Biol 43, 3-36.
- [Jentsch, 2007] Jentsch, T. J. (2007). *Chloride and the endosomal-lysosomal pathway: emerging roles of CLC chloride transporters*. J. Physiol. **578**, 633–640
- [Jentsch *et al.*, 2002] Jentsch, T.J., Stein, V., Weinreich, F. und Zdebik, A.A., (2002). *Molecular structure and physiological function of chloride channels*. Physiol Rev 82, 503-568.
- [Jentsch *et al.*, 1990] Jentsch, T.J., Steinmeyer, K., und Schwarz, G. (1990). *Primary structure of Torpedo marmorata chloride channel isolated by expression cloning in Xenopus oocytes*. Nature 348, 510-514.
- [Jordt und Jentsch, 1997] Jordt S.E., Jentsch T.J. (1997). *Molecular dissection of gating in the CLC-2 chloride channel*. EMBO J. 16, 1582-1592.
- [Kasper *et al.*, 2005] Kasper, D., Planells-Cases, R., Fuhrmann, J. C., Scheel, O., Zeitze, O., Ruether, K., Schmitt, A., Poët, M., Steinfeld, R., Schweizer, M., Kornak, U., and Jentsch, T. J. (2005) *Loss of the chloride channel CLC-7 leads to lysosomal storage disease and neurodegeneration*. EMBO J. 24, 1079–1091

- [Koch et al. 1992] Koch M.C., Steinmeyer K., Lorenz C., Ricker K., Wolf F., Otto M., Zoll B., Lehmann-Horn F., Grzeschik K.H., Jentsch T.J. (1992). *The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia*. Science 257, 797-800.
- [Kohlschütter und Goebel et al. 2005] Kohlschütter, A., Goebel, H.H., Schulz, A. und Lukacs, Z. (2005). Die neuronale Ceroid-Lipofuszinosen: Demenzerkrankungen bei Kinder und Jugendlichen. Deutsches Ärzteblatt 102, Ausgabe 5, S. A-284.
- [Kornak et al., 2001] Kornak, U., Kasper, D., Bösl, M. R., Kaiser, E., Schweizer, M., Schulz, A., Friedrich, W., Delling, G., and Jentsch, T. J. (2001) *Loss of the CLC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man*. Cell 104, 205–215
- [Kornfeld und Kornfeld, 1985] Kornfeld, R. und S. Kornfeld (1985). *Assembly of asparagine-linked oligosaccharides..* Annu Rev Biochem, 54:631–664.
- [Kundra und Kornfeld, 1999] Kundra, R. und S. Kornfeld (1999). Asparaginelinked oligosaccharides protect Lamp-1 and Lamp-2 from intracellular proteolysis.. J Biol Chem, 274(43):31039–31046.
- [Kyte und Doolittle, 1982] Kyte, J. und Doolittle, R. F. (1982). *A simple method for displaying the hydropathic character of a protein*. J Mol Biol, 157(1):105–132.
- [Lakowicz, 1999] Lakowicz, J.R. (1999). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Plenum Publishing Corporation, 2. Ausgabe.
- [Lange et al., 2006] Lange, P. F., Wartosch, L., Jentsch, T. J., and Fuhrmann, J. C. (2006). *CLC-7 requires Ostml as a beta-subunit to support bone*. Nature, 440: 220-3.
- [Lloyd et al., 1997] S.E. Lloyd, W. Gunther, S.H. Pearce, A. Thomson, M.L. Bianchi, M. Bosio, I.W. Craig, S.E. Fisher, S.J. Scheinman, O. Wrong, T.J. Jentsch und R.V. Thakke (1997). *Characterisation of renal chloride channel, CLCN5, mutations in hypercalciuric nephrolithiasis (kidney stones) disorders*. Hu Mol Gen, Vol 6, 1233-1239

- [Lodish, 1996] Lodish, H. (1996). Molekulare Zellbiologie. 2.Aufl. Walter de Gruyter, Berlin, New York.
- [Lorenz *et al.*, 1996] Lorenz, C., M. Pusch und T. J. Jentsch (1996). *Heteromultimeric CLC chloride channels with novel properties*. Proc Natl Acad Sci U S A, 93(23):13362–13366.
- [Ludewig *et al.*, 1996] Ludewig, U., M. Pusch und T. J. Jentsch (1996). *Two physically distinct pores in the dimeric CLC-0 chloride channel*. Nature, 383(6598):340–343.
- [Markovic und Dutzler, 2007] Markovic, S. und R. Dutzler (2007). *The Structure of the Cytoplasmic Domain of the Chloride Channel CLC-Ka Reveals a Conserved Interaction Interface*. Structure, 15(6):715–725.
- [Matsumura *et al.*, 1999] Y. Matsumura, S. Uchida, Y. Kondo, H. Miyazaki, S. B.H. Ko, A. Hayama, T. Morimoto, W. Liu, M. Arisawa, S. Sasaki und F. Marumo (1999). *Overt nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking the CLC-K1 chloride channel*. Nat Genet 21: 95–98
- [Meadows *et al.*, 2007] The Expression of *Clcn7* and *Ostm1* in Osteoclasts Is Coregulated by Microphthalmia Transcription Factor. Nicholas A. Meadows, Sudarshana M. Sharma, Geoffrey J. Faulkner, Michael C. Ostrowski, David A. Hume and Alan I. Cassady (2007).
- [Melhus *et al.*, 1992] H. Melhus, B. Laurent, L. Rask and P. A. Peterson. (1992) *Ligand-dependent secretion of rat retinol-binding protein expressed in HeLa cells*. J Biol Chem 267:12036-12041
- [Meyer *et al.*, 2007] Meyer, S., S. Savaresi, I. C. Forster und R. Dutzler (2007). *Nucleotide recognition by the cytoplasmic domain of the human chloride transporter CLC-5*. Nat Struct Mol Biol, 14(1):60–67.

- [Meyer und Dutzler, 2006] Meyer S., & Dutzler R. (2006). *Crystal structure of the cytoplasmic domain of the chloride channel ClC-0*. Structure 14 299-307, 2006
- [Michelsen *et al.*, 2005] Michelsen, K., H. Yuan und B. Schwappach (2005). Hide and run. Arginine-based endoplasmic-reticulum-sorting motifs in the assembly of heteromultimeric membrane proteins.. EMBO Rep, 6(8):717–722.
- [Miller, 1982] C. Miller (1982). *Open-state substructure of single chloride channels from Torpedo electroplax*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1982 Dec 1;299(1097):401-11.
- [Miller und White, 1984] Miller C. and White M.M. (1984). A voltage-gated anion channel from the electric organ of *Torpedo californica*. J Biol Chem. 1979 Oct 25;254(20):10161-6.
- [Mohammed-Panah *et al.*, 2003] Raha Mohammad-Panah, Rene Harrison, Sonja Dhani, Cameron Ackerley, Ling-Jun Huan, Yanchun Wang und Christine E. Bear (2003). *The chloride channel ClC-4 contributes to endosomal acidification and trafficking*. J Biol Chem, 278(31):29267–77.
- [Nguitrageol und Miller, 2007] Wang Nguitrageol and Christopher Miller (2007) *CLC Cl⁻/H⁺ transporters constrained by covalent cross-linking*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 December 26; 104(52): 20659–20665
- [Niemeyer *et al.*, 2003] M. I. Niemeyer , Y. R. Yusef , I. Cornejo , C. A. Flores , F. V. Sepúlveda und L. P. Cid (2003). *Functional evaluation of human ClC-2 chloride channel mutations associated with idiopathic generalized epilepsies*. Physiol. Genomics 19: 74-83, 2004.
- [Nozu *et al.*, 2008] K. Nozu, T. Inagaki, X. J. Fu, Y. Nozu, H. Kaito, K. Kanda, T. Sekine, T. Igarashi, K. Nakanishi, N. Yoshikawa, K. Iijima, M. Matsuo (2008). *Molecular analysis of digenic inheritance in Bartter syndrome with sensorineural deafness*. J Med Genet 2008;45:182-186

- [Offe, 2005] OFFE, J. K. (2005). Untersuchungen zu Lokalisationssignalen des Chloridkanals ClC-7 und Analyse eines ClC-3/ClC-7-Knockout-Mausmodells (*Mus musculus*).
- [Penzlin et al. 2005] Penzlin, H. (2005). Lehrbuch der Tierphysiologie. 7.Aufl. Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag, München.
- [Picollo und Pusch, 2005] Picollo, A., and Pusch, M. (2005). *Chloride/proton antiporter activity of mammalian CLC proteins ClC-4 and ClC-5*. Nature 436, 420–423
- [Pusch, 2004] M. Pusch (2004). *Structural insights into chloride and proton-mediated gating of CLC chloride channels*. Biochemistry. 2004 Feb 10;43(5):1135-44
- [Pusch et al., 1999] Pusch, Sven-Eric Jordt, Valentin Stein and Thomas J Jentsch (1999). *Chloride dependence of hyperpolarization-activated chloride channel gates*. Michael J Physiol (1999) 515: 341-53
- [Rychov et al., 1998] G.Y. Rychkov, M. Pusch, M.L. Roberts, T.J. Jentsch, und A.H. Bretag (1998). *Permeation and Block of the Skeletal Muscle Chloride Channel, ClC-1, by Foreign Anions*. Journal of General Physiology, Volume 111, Number 5
- [Rychov et al., 1996] G. Y. Rychkov, M. Pusch, D. S. Astill, M. L. Roberts, T. J. Jentsch, and A. H. Bretag (1996) *Concentration and pH dependence of skeletal muscle chloride channel ClC-1*. Physiol. December 1; 497(Pt 2): 423–435.
- [Scheel et al., 2005] Scheel, O., Zdebik, A. A., Lourdel, S., and Jentsch, T. J. (2005). *Voltage-dependent electrogenic chloride/proton exchange by endosomal CLC proteins*. Nature 436, 424–427
- [Schlingmann et al., 2004] Schlingmann, K.P., Konrad, M., Jeck, N., Waldegger, P., Reinalter, S.C., Holder, M., Seyberth, H.W., Waldegger, S. (2004). *Salt wasting and deafness resulting from mutations in two chloride channels*. N Engl J Med., Mar 25;350(13):1314-9.

- [Scholl *et al.*, 2006] Scholl, Ute; Hebeisen, Simon; Janssen, Audrey G. H.; Müller-Newen, Gerhard; Alekov, Alexi; Fahlke, Christoph (2006). *Barttin modulates trafficking and function of CLC-K channels*. Proc Natl Acad Sci U S A, 103(30):11411–11416.
- [Schriever *et al.*, 1999] A. M. Schriever, T. Friedrich, M. Pusch, und T. J. Jentsch (1999) *CLC chloride channels in Caenorhabditis elegans*. J Biol Chem, 274(48):34238–34244.
- [Schultz und Kornak *et al.* 2008] Schultz, A.S. und Kornak, U. (2008). *Osteopetrose-aktuelle Diagnostik und Therapie*. J Miner Stoffwechs 15(4)
- [Schwake *et al.*, 2001] Schwake, M., T. Friedrich und T. J. Jentsch (2001). An internalization signal in CLC-5, an endosomal Cl-channel mutated in dent's disease. J Biol Chem, 276(15):12049–12054.
- [Scott *et al.*, 2004] Scott, J.W., S.A. Hawley, K.A. Green, M. Anis, G. Stewart, G.A. Scullion, D.G. Norman, and D.G. Hardie (2004). *CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations*. J. Clin. Invest. 113:274–284.
- [Simon *et al.*, 1997] SIMON, D. B., R. S. BINDRA, T. A. MANSFIELD, C. NELSONWILLIAMS, E. MENDONCA, R. STONE, S. SCHURMAN, A. NAYIR, H. ALPAY, A. BAKKALOGLU, J. RODRIGUEZ-SORIANO, J. M. MORALES, S. A. SANJAD, C. M. TAYLOR, D. PILZ, A. BREM, H. TRACHTMAN, W. GRISWOLD, G. A. RICHARD, E. JOHN und R. P. LIFTON (1997). *Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause Bartter's syndrome type III*. Nat Genet, 17(2):171–178.
- [Steinmeyer *et al.*, 1991a] Steinmeyer, K., Ortland, C., und Jentsch, T.J. (1991a). *Primary structure and functional expression of a developmentally regulated skeletal muscle chloride channel*. Nature 354, 301-304
- [Steinmeyer *et al.*, 1991b] Steinmeyer, K., R. Klocke, Ortland, C., Gronemeier, M., Jockusch, H., Gründer, S. und Jentsch, T.J. (1991). *Inactivation of muscle chloride channel by transposon insertion in myotonic mice*. Nature, 354(6351):304–308

- [Suzuki *et al.*, 2006] Suzuki, T., Rai, T., Hayama, A., Sohara, E., Suda, S., Itoh, T., Sasaki, S., and Uchida, S. (2006) *Intracellular localization of CLC chloride channels and their ability to form hetero-oligomers*. J. Cell. Physiol. 206, 792–798
- [Tajima *et al.*, 2007] TAJIMA, M., A. Hayama, T. Rai, S. Sasaki und S. Uchida (2007). *Barttin binds to the outer lateral surface of the CLC-K2 chloride channel*. Biochem Biophys Res Commun, 362(4):858–864.
- [Teasdale und Jackson, 1996] Teasdale, R.D. und M. Jackson (1996). *Signalmediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus*. Annu Rev Cell Dev Biol, 12:27–54.
- [Traverso *et al.*, 2006] Traverso, S., G. Zifarelli, R. Aiello, and M. Pusch. (2006). *Proton sensing of CLC-0 mutant E166D*. J. Gen. Physiol. 127:51–66
- [Tseng *et al.*, 2007] Pang-Yen Tseng, Brett Bennetts, and Tsung-Yu Chen (2007). *Cytoplasmic ATP Inhibition of CLC-1 Is Enhanced by Low pH*. The Journal of General Physiology, Vol. 130, No. 2, 217-221
- [Waldegger *et al.*, 2002] Waldegger S., Jeck N., Barth P., Peters M., Vitzthum H., Wolf K., Kurtz A., Konrad M., Seyberth H.W. (2002). Barttin increases surface expression and changes current properties of CLC-K channels.. Pflugers Arch, 444(3):411–418.
- [Weinreich und Jentsch, 2001] Weinreich F., Jentsch T.J. (2001). *Pores formed by single subunits in mixed dimers of different CLC chloride channels*. J. Biol. Chem. 276, 2347-2353.
- [Wellhauser *et al.*, 2006] Wellhauser, L., H.H. Kuo, F.L. Stratford, M. Ramjeesingh, L.J. Huan, W. Luong, C. Li, C.M. Deber, and C.E. Bear (2006). *Nucleotides bind to the C-terminus of CLC-5*. Biochem. J. 398:289–294.

- [Zanotti *et al.*, 1993] Zanotti G, Malpeli G, Berni R. The interaction of N-ethyl retinamide with plasma retinol-binding protein (RBP) and the crystal structure of the retinoid-RBP complex at 1.9-Å resolution. *J Biol Chem.* 1993 Nov 25;268(33):24873-9.
- [Zdebik *et al.*, 2008] Zdebik A.A., Zifarelli G., Bergsdorf E.-Y., Soliani P., Scheel O., Jentsch T.J., Pusch M. (2008). *Determinants of anion-proton coupling in mammalian endosomal CLC proteins.* *J. Biol. Chem.* 283, 4219-4227.
- [Zerangue *et al.*, 1999] Zerangue, N., B. Schwappach, Y. N. Jan und L. Y. Jan (1999). *A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels.* *Neuron*, 22(3):537–548.
- [Zifarelli und Pusch, 2007] Zifarelli, G. und Pusch, M. (2007). *ClC chloride channels and transporters: a biophysical and physiological perspective.* *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 158, 23-76.
- [Zifarelli und Pusch, 2008] Zifarelli, G., and M. Pusch. (2008). *The muscle chloride channel ClC-1 is not directly regulated by intracellular ATP.* *J. Gen. Physiol.* 131: 109-116.

7. Danksagung

An diese Stelle möchte ich mich bei allen 7 Personen bedanken, die mir während meiner Zeit in der Arbeitsgruppe als Mentorin und Kollegin zur Seite standen und mich in vieler Hinsicht unterstützt haben. Ohne sie wäre meine Zeit in der Arbeitsgruppe nicht so bereichernd gewesen.

Zuerst einmal möchte ich mich bei Prof. Dr. Ingrid Isenhardt bedanken, die mich in die Arbeitsgruppe aufgenommen hat und mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Masterarbeit in der Arbeitsgruppe zu verfassen. Ich bedanke mich auch bei Prof. Dr. Ingrid Isenhardt für die Unterstützung und die Möglichkeit, meine Masterarbeit in der Arbeitsgruppe zu verfassen. Ich bedanke mich auch bei Prof. Dr. Ingrid Isenhardt für die Unterstützung und die Möglichkeit, meine Masterarbeit in der Arbeitsgruppe zu verfassen.

Auch hier möchte ich mich bei Prof. Dr. Ingrid Isenhardt bedanken, die mich in die Arbeitsgruppe aufgenommen hat und mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Masterarbeit in der Arbeitsgruppe zu verfassen. Ich bedanke mich auch bei Prof. Dr. Ingrid Isenhardt für die Unterstützung und die Möglichkeit, meine Masterarbeit in der Arbeitsgruppe zu verfassen. Ich bedanke mich auch bei Prof. Dr. Ingrid Isenhardt für die Unterstützung und die Möglichkeit, meine Masterarbeit in der Arbeitsgruppe zu verfassen. Ich bedanke mich auch bei Prof. Dr. Ingrid Isenhardt für die Unterstützung und die Möglichkeit, meine Masterarbeit in der Arbeitsgruppe zu verfassen.

Bei Herrn Prof. Dr. Ingrid Isenhardt möchte ich mich noch einmal bedanken, dass er mich in die Arbeitsgruppe aufgenommen hat und mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Masterarbeit in der Arbeitsgruppe zu verfassen.

Bei meinen Eltern und meiner Schwester möchte ich mich noch einmal bedanken, dass sie mir die Möglichkeit gegeben haben, meine Masterarbeit in der Arbeitsgruppe zu verfassen. Ich bedanke mich auch bei Prof. Dr. Ingrid Isenhardt für die Unterstützung und die Möglichkeit, meine Masterarbeit in der Arbeitsgruppe zu verfassen.

A Anhang

A.1 Plasmidvektoren und DNA-Konstrukte

Lfd. -Nr.	Name	Beschreibung
1	pCDNA3.1(+)	Expression in eukaryotischen Zellen, Invitrogen (Karlsruhe) Ampicillin- und Neomycinresistenz, T7- und CMV-Pormotor, SV40-Replikationsursprung
2	pEGFP-N-3 pEYFP-N-3 pECFP-N-3	Expression als EGFP-Fusionsprotein (enhanced green/yellow/cyan fluorescent protein) in eukaryotischen Zellen, Clontech (Heidelberg), Kanamycin- und Neomycinresistenz, SV40-Replikationsursprung, EGFP Cterminal, CMV-Pormotor,
3	pCI-neo	Expression in eukaryotischen Zellen, Invitrogen (Karlsruhe) Ampicillin- und Neomycinresistenz, T7- und CMV-Pormotor, SV40-Replikationsursprung
4	rCIC-7 HA CT	CIC-7 aus Ratte mit C-terminaler HA-Fusion in pCI-neo
5	Ostm1 Myc CT	Ostm1 aus Maus mit C-terminalen Myc-Epitop im Vektor pCDNA3.1(+)
6	Ostm1 - Ostm1 - CD4 - Myc CT	Ostm1-Chimäre mit C-Terminus von CD4, sowie C-terminalen Myc-Epitop im Vektor pCDNA3.1(+)
7	Ostm1 - CD4 - CD4 - Myc CT	Ostm1-Chimäre mit C-Terminus und Transmembran-domäne von CD4, sowie C-terminalen Myc-Epitop im Vektor pCDNA3.1(+)
8	Ostm1 - CD4 - Ostm1 - Myc CT	Ostm1-Chimäre mit Transmembrandomäne von CD4, sowie C-terminalen Myc-Epitop im Vektor pCDNA3.1(+)
9	CD4 - Myc CT	humanes CD4 mit C-terminalen Myc-Epitop im Vektor pCDNA3.1(+)
10	CD4 - CD4 - Ostm1 - Myc CT	Ostm1-Chimäre mit N-Terminus und Transmembran-domäne von CD4, sowie C-terminalen Myc-Epitop im Vektor pCDNA3.1(+)
11	CD4 - Ostm1 - Ostm1 - Myc CT	Ostm1-Chimäre mit N-Terminus von CD4, sowie C-terminalen Myc-Epitop im Vektor pCDNA3.1(+)
12	CD4 - Ostm1 - CD4 - Myc CT	Ostm1-Chimäre mit N-Terminus und C-Terminus von CD4, sowie C-terminalen Myc-Epitop im Vektor pCDNA3.1(+)
13	Ostm1 Δ NT(w/o aa 40-278) - Myc CT	Deletionskonstrukt von Ostm1, putatives Signalpeptid vorhanden, Deletion der putativen Glykosylierungsstellen, mit C-terminalen Myc-Epitop im Vektor pCDNA3.1(+)

Fortsetzung auf folgender Seite...

Lfd. -Nr.	Name	Beschreibung
14	Ostm1 - EGFP CT	Ostm1 aus Maus mit C-terminalen EGFP im Vektor pEGFP-N3
15	Ostm1 - Ostm1 - CD4 - EGFP CT	Ostm1-Chimäre mit C-Terminus von CD4, sowie C-terminalen EGFP im Vektor pEGFP-N3
16	Ostm1 - CD4 - CD4 - EGFP CT	Ostm1-Chimäre mit C-Terminus und Transmembran-domäne von CD4, sowie C-terminalen EGFP im Vektor pEGFP-N3
17	Ostm1 - CD4 - Ostm1 - EGFP CT	Ostm1-Chimäre mit Transmembrandomäne von CD4, sowie C-terminalen EGFP im Vektor pEGFP-N3
18	CD4 - EGFP CT	humanes CD4 mit C-terminalen EGFP im Vektor pEGFP-N3
19	CD4 - CD4 - Ostm1 - EGFP CT	Ostm1-Chimäre mit N-Terminus und Transmembran-domäne von CD4, sowie C-terminalen EGFP im Vektor pEGFP-N3
20	CD4 - Ostm1 - Ostm1 - EGFP CT	Ostm1-Chimäre mit N-Terminus von CD4, sowie C-terminalen EGFP im Vektor pEGFP-N3
21	CD4 - Ostm1 - CD4 - EGFP CT	Ostm1-Chimäre mit N-Terminus und C-Terminus von CD4, sowie C-terminalen EGFP im Vektor pEGFP-N3
22	Ostm1 Δ NT(w/o aa 40-278) - EGFP CT	Deletionskonstrukt von Ostm1, putatives Signalpeptid vorhanden, Deletion der putativen Glykosylierungsstellen, mit C-terminalen EGFP im Vektor pEGFP-N3
23	rCIC-7	CIC-7 aus Ratte im Vektor pCDNA3.1(+)
24	CIC-7 - EGFP CT	CIC-7 aus Ratte mit C-terminalen EGFP im Vektor pEGFP-N3
25	CIC-7 - ECFP CT	CIC-7 aus Ratte mit C-terminalen ECFP im Vektor pECFP-N3
26	Ostm1 - EYFP CT	Ostm1 aus Maus mit C-terminalen EYFP im Vektor pEYFP-N3
27	CD4-Ostm1-CD4 - EYFP CT	Ostm1-Chimäre mit N-Terminus und C-Terminus von CD4, sowie C-terminalen EYFP im Vektor pEYFP-N3
28	CIC-7 - EYFP CT	CIC-7 aus Ratte mit C-terminalen EYFP im Vektor pEYFP-N3
29	CIC-6 - CFP CT	CIC-6 mit C-terminalen ECFP im Vektor pECFP-N3
30	Ostm1 - EGFP CT (Ala 287-293, but Gly-291)	Ostm1 aus Maus mit C-terminalen EGFP, Transmembrandomänenmutante (Ala 287-293, aber Gly-291) im Vektor pEGFP-N3

Fortsetzung auf folgender Seite...

Lfd.-Nr.	Name	Beschreibung
31	Ostm1 - EGFP CT (Ala 294-301)	Ostm1 aus Maus mit C-terminalen EGFP, Transmembrandomänmutante (Ala 294-301) im Vektor pEGFP-N3
32	Ostm1 - EGFP CT (Ala 302-309)	Ostm1 aus Maus mit C-terminalen EGFP, Transmembrandomänmutante (Ala 302-309) im Vektor pEGFP-N3
33	CD4 - Ostm1 - CD4 - EGFP CT (Ala 398-404, but Gly-402)	Ostm1-Chimäre mit N-Terminus und C-Terminus von CD4, Transmembrandomänmutante (Ala 398-404, aber Gly-402) sowie C-terminalen EGFP im Vektor pEGFP-N3
34	CD4 - Ostm1 - CD4 - EGFP CT (Ala 405-412)	Ostm1-Chimäre mit N-Terminus und C-Terminus von CD4, Transmembrandomänmutante (Ala 405-412) sowie C-terminalen EGFP im Vektor pEGFP-N3
35	CD4 - Ostm1 - CD4 - EGFP CT (Ala 413-420)	Ostm1-Chimäre mit N-Terminus und C-Terminus von CD4, Transmembrandomänmutante (Ala 413-420) sowie C-terminalen EGFP im Vektor pEGFP-N3

Tabelle A.1: Plasmidvektoren und DNA-Konstrukte

A.2 Oligonukleotide

Die in der Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG Biotech AG, München, Deutschland oder Biomers, Ulm, Deutschland bezogen.

Verwendung	Bezeichnung	Sequenz
CIC-7-HA(CT) Sequenzanalyse	01144_jf_mC7gen13as	CACCAGCAGATACTGTGAGGC
	01968_rC7_lw_13as	GCGAAAGTCTTTCAGCCTC
	03103-t3seq	ATTAACCCTCACTAAAG
	04180-7A14	AGCCTGCTTCATTGACAT
	05227_C7-1800-f	GAGGGCCTCTATGACATGC
	05548_7E6	CAGCTGGAGCTGCAGCTG
	05562_7ER1	GGCCCGGCTCCGTTTCAGC
	06446_7HA-R1	TGCAGCGGAGACTGAGGCTG
	06694_c7-2009_as	caaaatttatgaggccagggc
	06695_c7-2254_s	gtcttgatttactcgtctc
	06696_c7-2864_as	caaccttctctctctcc
	06793_03941_2615TRAP_as	GACAGAATCACGCCAGACACCT

Fortsetzung auf folgender Seite ...