

Aus dem Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Entwicklung von APEX2-
Fusionskonstrukten zur Analyse der sub-
zellulären Proteinprozessierung

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von Annika Marie Stock-Schröer

2021

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Zweitgutachter: PD Dr. med. Johannes Stegbauer

„Das Wichtigste ist, dass man nicht aufhört zu fragen.“

Albert Einstein, 1955

ZUSAMMENFASSUNG

Die elektrische Erregbarkeit einer Zelle wird durch die Anzahl und Art von Ionenkanälen in ihrer Zellmembran bestimmt. Das subzelluläre Transportverhalten von Ionenkanälen wird genau wie das biophysikalische Verhalten u.a. auch von akzessorischen Untereinheiten determiniert.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Etablierung von Untersuchungsmethoden zur Charakterisierung der subzellulären Prozessierung von Ionenkanälen. Zunächst wurde ein Verfahren etabliert, das eine Kompartiment-spezifische Biotinylierung mit anschließender Aufreinigung und Proteomanalyse von Ionenkanälen und Interaktionspartnern erlaubt. Dazu wurde eine konstruierte Peroxidase (APEX2) durch Fusion mit spezifischen Signalsequenzen in einzelne Kompartimente geschleust und lokal aktiviert. Anschließend wurden die biotinylierten Proteine mittels Streptavidin-beschichteten *beads* aufgereinigt. In einer zweiten Experimentalreihe wurde mittels quantitativer *real-time-PCR* (*qPCR*) die mRNA-Expression von HCN-Kanälen und ihrer akzessorischen Untereinheit Trip8b in peripheren kardialen Ganglienzellen der Maus untersucht. HCN-Kanäle werden in zentralen Neuronen durch Trip8b sowohl in der Expression an der Zelloberfläche als auch in der Modulierbarkeit durch zyklische Nukleotide beeinflusst. Diese Interaktion ist in peripheren Neuronen bislang nicht näher untersucht.

Die APEX2-Fusionsproteine mit Signalsequenzen für das endoplasmatische Retikulum, den Golgi-Komplex und die Zellmembran zeigten in der Immunocytochemie sowohl eine spezifische Sortierung als auch eine auf das Kompartiment begrenzte Biotinylierungs-Aktivität. Auch im Western Blot konnte die Aktivität der Konstrukte nachgewiesen werden. In den kardialen Ganglien der Maus konnte die Expression der HCN2 Isoform mittels *qPCR* nachgewiesen werden. Andere Isoformen der HCN-Kanalfamilie waren hingegen kaum exprimiert. Auch Trip8b konnte nur in so geringem Maße nachgewiesen werden, dass eine weitere Untersuchung nicht möglich war.

Die hier vorgelegten Ergebnisse schaffen die Basis für eine spezifische Weiterentwicklung von Methoden zur Untersuchung der subzellulären Proteinprozessierung.

SUMMARY

The electrical excitability of a cell is determined by the type and number of ion channels in its membrane. The subcellular transport of an ion channel, as well as its biophysical behavior, is often influenced by auxiliary subunits.

The aim of this present work was to develop and establish methods to characterize subcellular processing of proteins. Therefore, a technique was established, which allows a compartment-specific biotinylation, followed by purification and analysis of the proteome including its interaction partners. For this purpose, a designed peroxidase (APEX2) was introduced into different cell compartments by fusion with specific signal sequences and activated locally. Biotinylated proteins were purified by streptavidin-coated *beads*.

A second series of experiments used the quantitative real time PCR (qPCR) method to examine the mRNA expression of HCN-channels and their auxiliary subunit Trip8b in peripheral cardiac ganglion cells of the mouse. In central neurons, HCN-channels are influenced by their auxiliary subunit Trip8b. It regulates their expression on the cell surface and modulates their sensitivity to cyclic nucleotides. Those interactions with Trip8b have not yet been studied in peripheral neurons.

The present work could demonstrate by immunocytochemistry that the APEX fusion proteins with signal sequences for the endoplasmatic reticulum, golgi apparatus and cell surface showed a specific subcellular sorting as well as a compartment-limited biotinylation activity. Also, Western blot analysis demonstrated the activity of respective fusion proteins.

Mouse cardiac ganglia express the HCN 2 isoform, demonstrated by qPCR. Other isoforms of HCN-channels were very rarely expressed, as well as the neuronal auxiliary subunit Trip8b.

Those results establish a basis for further specific development of methods to examine subcellular protein processing.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

° C	Grad Celsius
µl	Microliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
AP2	Adapter Protein 2
APEX2	Ascorbat Peroxidase 2
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arf6	ADP-ribosylation factor 6
ARH	receptor adapter protein 1
AS	Aminosäure
ATP/ADP	Adenosintriphosphat/ diphosphat
BAR	Bin/amphiphysin/Rvs Domain
BP	Biotinphenol
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CA 1/3	Cornu ammonis
Ca ²⁺	Calcium
cAMP	Cyclisches Adenosin-Mono-Phosphat
CCP	clathrin-coated pits
CD4	Cluster of differentiation 4
Cdc42	cell division cycle 42
cDNA	Codierende Desoxyribonukleinsäure
CLIC	clathrin independent carriers
CNBD	Cyclic Nucleotide Binding Domain
COP	Coat protein complex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
Ehd	Eps15-homology-domain protein

ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERC	Endocytotic recycling compartiment
ERGIC	ER-Golgi intermediate compartment
FBS	Fetal bovine serum
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GEEC	GPI-anchored-protein-enriched endosomal compartment
GFP	Green fluorescent protein
Glu	Glutamat
GluR	Glutamat Rezeptor
GM130	Golgi matrix protein 130
GRAF1	Rho GTPase activating protein
Gt	<i>Goat</i>
GTP/ GDP	Guanosintriphosphat/ diphosphat
h	Stunde
HCN	<i>hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel</i>
HeLa	Henrietta Lacks-Zellen
HEPES	(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
HRP	Horseradish peroxidase
IL	Interleukin
K ⁺	Kaliumion
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
K _{ir}	einwärts gleichrichtende Kaliumkanäle
K _v	Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle
LB	<i>lysogeny broth</i>
LDL	Low density lipoprotein
M	Molar
MAP2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MAP2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter

mRNA	Messenger ribonucleic acid
ms	Millisekunde
Ms	<i>mouse</i>
mV	Millivolt
Na ⁺	Natriumion
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NeuN	neuronal nuclear protein
NeuN	Neuronal nuclear protein
ng	Nanogramm
NGS	Normal goat serum
nm	Nanometer
PAK	p21-aktivierte Kinasen
PAQ	PC2-assoziertes Q-reiches Protein
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction/ Polymerasekettenreaktion
PEX5	Peroxisomal Biogenesis Factor 5 Like
PFA	Paraformaldehyd
PGK	Phosphoglyceratkinase
pH	potentia Hydrogenii
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
Rab	Ras-related in brain
Rac	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
Rb	<i>rabbit</i>
RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay Puffer
Rme	receptor-mediated endocytosis
RNA	Ribonucleic acid
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumlaurylsulfat
Sec	general secretory system
SNX9	Sorting nexin-9

SRP	Signal recognition particle
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TGN	Trans Golgi Netzwerk
Trip8b	tetratricopeptide repeat-containing Rab8b interacting protein
vgl.	Vergleiche
V	Volt

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. Transportwege in der Zelle.....	1
1.1.1. Proteine und Zellkompartimente	1
1.1.2. ER-Transport.....	2
1.1.3. Golgi-Transport	3
1.1.4. Oberflächenexpression	4
1.2. Kompartimentspezifische Analyse von Proteinkomplexen.....	9
1.3. HCN-Kanal.....	11
1.3.1. Physiologie der Kanäle inklusive ihrer Prozessierung	11
1.3.2. Einfluss des tetratricopeptide-repeat containing Rab8b (Trip8b) auf die Prozessierung 14	
1.4. Ziele der Arbeit	15
2. MATERIAL UND METHODEN	16
2.1. Material	16
2.1.1. Verbrauchsmaterialien	16
2.1.2. Puffer und Lösungen.....	16
2.1.3. Chemikalien	16
2.1.4. Enzyme, Reagenzien und Marker.....	17
2.1.5. Kits	18
2.1.6. Oligonucleotide und <i>Primer</i>	18
2.1.7. Bakterien, Zelllinien und Gewebe	18
2.1.8. Antikörper und Seren	19
2.1.9. Geräte und Software	20
2.2. Molekularbiologische Methoden	22
2.2.1. Planung der APEX2-Fusionskonstrukte	22
2.2.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)	25
2.2.3. Agarosegelelektrophorese	25
2.2.4. DNA-Präparation und -Aufreinigung	25
2.2.5. Restriktionsverdau	25
2.2.6. Ligation.....	26
2.2.7. Transformation	26
2.2.8. Mini und Midi Präparation	27
2.2.9. Sequenzierung und Kontrollverdau.....	27
2.3. Zellbiologische Methoden	28

2.3.1.	Kultivierung der HeLa-Zellen	28
2.3.2.	Transfektion der HeLa-Zellen	29
2.4.	Immunzytochemische Färbung der HeLa-Zellen	29
2.4.1.	Lokalisationsfärbung	29
2.4.2.	Aktivitätsfärbung.....	30
2.5.	Biochemische Methoden	31
2.5.1.	Aufreinigung biotinylierter Proteine	31
2.5.2.	SDS-Page und Western- Blot	32
2.6.	RNA Isolation und cDNA Synthese	34
2.6.1.	Präparation der Ganglienzellen	34
2.6.2.	RNA Präparation	34
2.6.3.	cDNA Synthese	34
2.6.4.	Quantitative <i>real time</i> PCR (<i>qPCR</i>)	35
3.	ERGEBNISSE.....	37
3.1.	Entwicklung der APEX2-Fusionskonstrukute zur intrakompartimentären Biotinylierung und Aufreinigung des dort lokalisierten Proteoms	37
3.1.1.	Klonierungen	37
3.1.2.	Lokalisation der APEX2-Fusionsproteine in der Immunzytochemie	38
3.1.3.	Charakterisierung der APEX2-Biotinylierung durch immunzytochemische Färbung	40
3.1.4.	Biochemischer Nachweis der Biotinylierungsreaktion	45
3.1.5.	Kompartimentspezifische Lokalisation im Western Blot	46
3.2.	Ergebnisse der <i>qPCR</i> in den kardialen Ganglienzellen der Maus.....	55
3.2.1.	Spezifität der <i>Primer</i>	55
3.2.2.	mRNA Expression der HCN-Isoformen	56
4.	DISKUSSION.....	58
4.1.	Reproduktion einer Methode zur Aufreinigung von kompartimentspezifischen Proteomen.....	58
4.1.1.	Auswahl der Kompartimente	58
4.1.2.	Problemanalyse	61
4.2.	Quantitative realtime PCR als Möglichkeit zum Nachweis der HCN- Untereinheit Trip8b 64	
4.3.	Schlussfolgerungen.....	65

5. LITERATURVERZEICHNIS	67
6. ABBILDUNGSSVERZEICHNIS	77
7. TABELLENVERZEICHNIS	78
8. ANHANG	78

1. EINLEITUNG

1.1. Transportwege in der Zelle

1.1.1. Proteine und Zellkompartimente

Neuronen und Muskelzellen haben die Eigenschaft untereinander zu kommunizieren und Signale zu geben oder zu verarbeiten. Diese Eigenschaften werden neben Rezeptoren durch die Anzahl und die Art der Ionenkanäle in der Zelle bestimmt. Die Zelle reguliert die Art und die Anzahl ihrer Ionenkanäle zum einen über die Proteinbiosynthese, zum anderen über Prozessierung und Recycling. Es werden antero- und retrograde Prozesse unterschieden, wobei anterograd den Weg zur Zelloberfläche beschreibt und retrograd von der Oberfläche weg (Klinke et al. 2010).

Durch diese einander entgegen gerichteten Transportwege kann die Zelle sich auf die angeforderten Bedingungen sehr schnell einstellen. Ein Ionenkanal passiert auf seinem Weg zur Zelloberfläche mehrere intrazelluläre Stationen, die alle einen Einfluss auf die weitere Prozessierung und somit die Funktion der Zelle haben. Nach Verlassen der RNA aus dem Zellkern wird das Protein am endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und gefaltet. Die Proteine werden per Vesikel über das ER-Golgi intermediäre Kompartiment und den Golgi-Apparat zum Trans-Golgi Netzwerk transportiert (TGN) (Klinke et al. 2010). Während dieser Stationen kann das Protein bzw. der Ionenkanal mittels Glykosylierung, Lipidanker oder zum Beispiel Anhang eines Mannose-6-Phosphat-Restes modifiziert und damit seine weitere Verwendung bestimmt werden (Gleeson 1998; Le Borgne und Hoflack 1998). Nach erfolgreicher Modifikation kann das Protein mittels Vesikel zur Zelloberfläche verbracht werden. Die dynamische Regulation an der Oberfläche erfolgt dann über Recycling Endosomen oder Lysosomen, die durch Signalwege aktiviert werden können oder konstitutiv erfolgen (Klinke et al. 2010; Goldenring 2015).

Die subzelluläre Prozessierung ist eine komplexe Abfolge. Signalsequenzen, also Aminosäureabfolgen, dienen der Zelle als Marker für das Ziel des Proteins und den dafür vorgesehenen Weg. Diese können sowohl während der Proteinbiosynthese als auch posttranslational angefügt werden (Klinke et al. 2010).

Die Adressierung von Proteinen ist auch in wissenschaftlicher Hinsicht von Bedeutung. So können zum Beispiel Enzyme gezielt in Kompartimente eingeschleust werden. Die Darstellung von ausgewählten Signalsequenzen findet sich in den Kapiteln 1.1.2 bis 1.1.4.

Wird der sekretorische Weg der Proteinprozessierung in einen anterograden und in einen retrograden Weg geteilt, zählt die ER-Sekretion und Golgi-Modifikation zum anterograden Mechanismus (s. Kap. 1.1.2, Kap. 1.1.3) und die retrograde Regulation (s. Kap. 1.1.4) erfolgt über die Endozytose und Recyclingprozesse.

1.1.2. ER-Transport

Das endoplasmatische Retikulum ist in einen glatten und in einen rauen Anteil aufgeteilt. Der glatte Anteil ist für die Synthese von Phospholipiden, langkettigen Fettsäuren und Steroiden verantwortlich, sowie für die Speicherung und Freisetzung von Kohlenhydraten und Calcium in den Muskelzellen (Klinke et al. 2010). Da das glatte ER keine Rolle in der Proteinsynthese spielt, wird im Folgenden nur das raue ER näher beschrieben.

Das raue ER ist assoziiert mit der äußeren Zellmembran und von Ribosomen besetzt, die ihm elektronenmikroskopisch ein raues Aussehen geben. Bei der Synthese der Proteine werden diese in das Lumen des ER sezerniert. Hauptverantwortlich für diesen Export ist das sogenannte *signal recognition particle* (SRP) (Klinke et al. 2010). Dieses C-terminale Signalpeptid bindet den SRP-Rezeptor und führt zu einer Bindung an das Translocon. Danach wird das Peptid entweder in die Lipiddoppelmembran des ER eingefügt oder verbleibt im Lumen des ER (Akopian et al. 2013). Auch posttranslational kann eine Translokation in das ER stattfinden. Hierfür verantwortlich sind sogenannte *tail-anchored* Proteine, also Proteine, die C-terminal lokalisiert sind und nach der Proteinbiosynthese an das SRP binden und so dem ER wieder zugeführt werden (Johnson et al. 2013).

Vom ER aus werden die Proteine in sogenannte *coated protein*-Vesikel (COP-Vesikel) verpackt und in Richtung cis-Golgi über das *ER-Golgi intermediate compartment* (ERGIC) geschickt. Das ERGIC dient als Verteiler für den antero- und retrograden Vesikeltransport zwischen ER und Golgi (Appenzeller-Herzog und Hauri 2006). Die COP-Vesikel können anhand ihrer Oberfläche in COP I und COP II eingeteilt werden (Bonifacino und Glick 2004). COP I Vesikel regulieren

sowohl den Transport innerhalb des Golgi-Apparates, als auch den retrograden Golgi-ER-Transport (Malhotra et al. 1989). COP II Vesikel hingegen nutzen den anterograden Weg von ER über ERGIC zum Golgi (Gorur et al. 2017).

Das ER ist somit die erste Kontrollstelle für Proteine auf dem Weg zur Zelloberfläche. Sind Proteine mutiert, werden diese sofort glykosyliert und verbleiben im ER. Dies zeigten Mah et al. am Beispiel eines Glutamatrezeptors. Drei verschiedene GluR2 Mutanten wurden mittels Immunfärbung lediglich im ER, allerdings nicht an der Zelloberfläche nachgewiesen (Mah et al. 2005).

Neben der Zurückhaltung von defekten Proteinen gibt es auch Proteine, die direkt an das ER adressiert sind. Diese beinhalten eine spezifische C-terminale Sequenz, die zum Verbleib des Proteins im ER führt. Ein Sequenzmotiv ist hierbei die Aminosäuresequenz KDEL am C-Terminus eines Proteins. KDEL ist dabei die Abkürzung für die Abfolge der Aminosäuren Lysin-Asparaginsäure-Glutaminsäure-Leucin. Die Aminosäuresequenz ist verantwortlich dafür, dass ein Protein im ER retiniert wird (Alanen et al. 2011). Auch die C-terminalen Sequenzen -KKXX, -KXKXX, -RKXX und -RXKXX führen in Anwesenheit einer Transmembrandomäne zu einer ER-Retention, vermutlich über eine COP I Wechselwirkung (Shikano und Li 2003). Die besondere Rolle des C-Terminus für die ER-Retention zeigt sich auch bei der Modifikation des *cluster of differentiation 4* (CD 4). CD 4 ist ein Oberflächenmarker der T-Helferzellen und bei einer Deletion des C-terminalen Endes (CD 4.Q421.stop) verbleibt das Protein im ER (Shin et al. 1991).

Charakteristische Proteine, die aufgrund ihrer Signalsequenzen im ER verbleiben sind zum Beispiel Careticulin und Calnexin. Die Proteine sind verantwortlich für die Faltung von Glykoproteinen. Dafür nutzen sie zum Beispiel die Protein Disulfid-Isomerase und die Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase (Kozlov et al. 2017; Michalak et al. 2009). Innerhalb des ER findet sich unter anderem auch das P450-System, das als ER-spezifische Adressierung gelten kann (Brignac-Huber et al. 2016)

1.1.3. Golgi-Transport

Der Golgi-Apparat gilt als zellinterner Verteiler von gefüllten Vesikeln. Er besteht aus drei Anteilen, dem cis-, median- und trans-Golgi. Neben seiner Aufgabe als

Verteiler dient er auch der Glykosylierung von Proteinen und Membranproteinen (Rassow et al. 2012).

Die Proteine, die per COP II Vesikel in Richtung Zellmembran gebracht werden sollen, werden auf dem Weg im Golgi modifiziert. Die Modifikation kann in einer Glykolysierung und gegebenenfalls Phosphorylierung bestehen. Die Galactosyltransferase katalysiert im Golgiapparat den Transfer eines Galactosylrestes und ist daher ein spezifisches Golgiprotein (Gleeson 1998). Der Unterschied zur zellmembranständigen Galactosyltransferase liegt dabei hauptsächlich in einem 13 Aminosäuren langen Peptid. Dieses führt dazu, dass das Protein an die Zelloberfläche verbracht wird (Lopez et al. 1991). Neben der Galactosyltransferase gibt es weitere Proteine die als golgi-spezifisch gelten. Golgi Matrix Protein 130 (GM130) findet sich im Lumen des Golgi und konnte daher auch als golgispezifischer Marker in Rattenlebern gezeigt werden (Nakamura et al. 1995). Häufig sind nur kurze spezifische Signalsequenzen für einen Verbleib von Proteinen im Golgi verantwortlich. Dies zeigt sich in den Experimenten von Stockklausner und Klöcker et al am Beispiel des Kaliumkanals $K_{ir}2.1$. Hierbei wurde der Kationenkanal $K_{ir} 2.1$ auf zwei verschiedene Weisen mutiert. Eine C-terminale Punktmutation E377/379A führt zu einer ER-Retention in dem sie eine Interaktion mit COPII verhindert. Ist allerdings das n-terminale Ende deletiert ($K_{ir} 2.1 \Delta 1-76$), verbleibt der K_{ir} -Kanal im Golgi Komplex (Stockklausner et al. 2001; Stockklausner und Klocker 2003).

Der Anhang eines Mannose-6-Phosphatrestes führt zu einer lysosomalen Adressierung des Proteins (Rassow et al. 2012).

Gibt es für ein sekretorisches Protein kein spezifisches Signal wird es G-Protein Arf bzw. Clathrin-vermittelt vom trans-Golgi abgeschnürt und mittels Vesikel in Richtung Zellmembran transportiert. Dort fusionieren die beladenen Vesikel entweder sofort mit der Zellmembran und setzen die Proteine frei oder die Vesikel verbleiben membrannah und geben ihren Inhalt signalgesteuert ab (Rassow et al. 2012).

1.1.4. Oberflächenexpression

Die Zellmembran von Eukaryonten besteht aus einer Lipiddoppelschicht, die als semipermeable Membran fungiert. Für einen Austausch zwischen Zytosol und Umgebung ist es notwendig, dass sich Proteine in diese Doppelschicht einlagern

und als integrale Bestandteile als Kanäle, Transporter oder Signaltransduktoren fungieren (Klinke et al. 2010).

Die Art und die Anzahl der Oberflächenproteine sind mit für die Funktion der Zelle verantwortlich. Die Regulation erfolgt unter anderem anterograd durch die Proteinbiosynthese und retrograd durch Endozytose und Recycling Prozesse.

Die retrograden Prozesse involvieren die gesamte Zellmembran, sodass sie als eigenständige Komponente in den endozytotischen Vorgängen gesehen werden sollte (Doherty und McMahon 2009).

Spezifische Signalsequenzen bzw. Markerproteine für die Zellmembran zu identifizieren gestaltet sich als Herausforderung, da diese einem ständigen Wandel unterlegen ist. Die Proteine der Zellmembran finden sich sowohl in den anderen Zellorganellen als auch vesikelgebunden im Zytosol. Ein modifizierter spannungsgesteuerter Kaliumkanal Kv4.2 zeigte in anderen Experimenten eine überwiegende Lokalisation in der Zellmembran und wurde daher in der vorliegenden Arbeit verwendet (Moise et al. 2010).

1.1.4.1. Endozytose

Die Endozytose ist neben der Pinozytose und die Phagozytose ein Mechanismus der Zelle, um extrazelluläre Bestandteile zu internalisieren. Die Phagozytose bezeichnet die Aufnahme fester Substanzen (Partikel > 0,5 µm, Bakterien und Zelltrümmer) in ein Phagosom. Da die Phagozytose vor allem für Makrophagen und dendritische Zellen von Bedeutung ist und nicht zur Oberflächenregulation der Proteine beiträgt, wird sie im Folgenden nicht näher beschrieben (Klinke et al. 2010).

Die Pinozytose bezeichnet die Aufnahme löslicher und flüssiger Stoffe (Makromoleküle, Proteine, Lipoproteine). Die Endozytose bezeichnet die Internalisierung von Membranbestandteilen, die durch Endosomen, Clathrin/Rezeptor-vermittelte Endozytose oder Caveolae-vermittelte Endozytose geschieht. Als Clathrin-unabhängige Endozytose wird der Arf6-Weg (ADP-ribosylation factor 6), der CLIC/GEEC-Weg (CLIC= *ER-Golgi intermediate compartment clathrin independent carriers*, GEEC= *GPI-anchored-protein-enriched endosomal compartment*), sowie die Flotillin-assoziierte Endozytose zusammengefasst (Doherty und McMahon 2009).

Alle endozytotischen Mechanismen erfordern die koordinierte Zusammenarbeit von Proteinen. Diese Proteine müssen in der Lage sein, die Zellmembran nach innen zu stülpen, so dass Proteine, die in der Lage sind ein Vesikel abzuschnüren, induziert werden (Doherty und McMahon 2009).

Für den oben beschriebenen Prozess sind die in der Zellmembran angereicherten Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) wichtig. Sie dienen als Adapterproteine für Proteine wie der BAR-Protein-Familie (Bin/amphiphysin/Rvs Domain), den arf-Proteinen, den G-Proteinen, den Dynamin- und Actin-Polymerisationsproteinen sowie den Proteinen der Clathrin-vermittelten Endozytose (Falkenburger et al. 2010). Sie bilden damit die Grundlage für die Invagination der Zellmembran der Clathrin-vermittelten aber auch der Clathrin-unabhängigen Endozytose (Doherty und McMahon 2009).

Die Clathrin-vermittelte Endozytose gehört zu dem bisher am besten untersuchten Mechanismus der Endozytose. Sie beschreibt einen rezeptorassoziierten gerichteten Vorgang, bei dem nach Ligandenbindung an einen extrazellulären Rezeptor ein *clathrin coated pit* gebildet wird. Dies geschieht auch in Dendriten an der Präsynapse nach Vesikelexozytose (Chanaday et al. 2019). Die Clathrin-Moleküle lagern sich mithilfe von Adapterproteinen, vor allem dem AP2, an die intrazelluläre Seite der Membran an und führen zu einem Einstülpen der Membran. Je weiter sich die Membran einstülpt, desto mehr Clathrinmoleküle binden an PIP₂ der Membran und führen zu einer kompletten Invagination des Vesikels. Die Abschnürung erfolgt mittels Dynamin und die Clathrin-Moleküle werden nach Umwandlung in ein frühes Endosom recycelt. Das Dynamin fungiert als Schere und ist eine große GTPase, die ein helikales Polymer um den Hals des Vesikels bildet. Durch Hydrolyse kommt es zu einer Abschnürung des Vesikels (Praefcke und McMahon 2004; Sorkin 2004). Innerhalb des Vesikels erfolgt die Aufteilung in ein leeres Vesikel mit den randständigen Rezeptoren und ein Endosom mit den darin enthaltenen Liganden der Rezeptoren. Das leere Vesikel kann wieder mit der Zellmembran verschmelzen und die Rezeptoren werden dadurch recycelt. Das Endosom wird im weiteren Prozess zum Lysosom oder Golgi-Apparat verbracht (Klinke et al. 2010).

Die akzessorischen Proteine, die die Clathrin-Rekrutierung und Konzentration beeinflussen, sind unter anderem Epsin, Amphiphysin, SNX9 (Doherty und

McMahon 2009). Diese auch als BAR-Komplex (Bin/amphiphysin/Rvs Domain) zusammengefassten Proteine können die Membraninvagination generieren und stabilisieren. Des Weiteren können sie Clathrin und AP2 binden, sowie Dynamin zum Hals des Vesikels rekrutieren. Neben den oben genannten akzessorischen Proteinen gibt es ein ganzes Netzwerk an Proteinen, die die Clathrin-vermittelte Endozytose steuern (Schmid et al. 2006).

Haben die endozytierten Moleküle (Cargo-Moleküle), Dileucin- und Tyrosin-reiche Sequenzen führt dies zu einer direkten Bindung vom AP2-Complex und der konsekutiven Verknüpfung mit nukleär-gerichteten Clathrinmolekülen (Sorkin 2004; Marks et al. 1996). Dies ist der Fall bei der Aminosäuresequenz YTRF des Transferrin-Rezeptors (Collawn et al. 1990).

Als bestuntersuchte Form der Clathrin-unabhängigen Endozytose gilt die Caveolae-induzierte Endozytose. Bei der Caveolae-assoziierten Endozytose werden Einbuchtungen der Zellmembran mit einem Durchmesser von ca. 60-80 nm als Invaginationsmöglichkeit genommen. Sie können bis zu einem Drittel der Zelloberfläche ausmachen. Sie finden sich vor allem in glatten Muskelzellen, Pneumozyten Typ I, Fibroblasten, Adipozyten und Endothelien. Bei der Caveolae-assoziierten Endozytose kann unter bestimmten Bedingungen ein filamentöser Mantel um die Caveolae beobachtet werden. Anschließend kommt es zu einer Caveolin 1 Überexpression und einer Internalisierung. Trotzdem wird häufig noch eine Verbindung zur Zelloberfläche beobachtet und es fehlt eine komplette Abschnürung (Parton et al. 2002). Es gibt Hinweise darauf, dass Caveolin 1 die Aktivität von cdc42 beeinflusst, das ein Schlüsselenzym in der CLIC/GEEC Endozytose ist (Chaudhary et al. 2014).

Die CLIC/GEEC Endozytose ist unabhängig von Clathrin, Caveolin und Dynamin. Adeno-assoziierte Viren nutzen diese Form der Endozytose als Infektionsweg (Nonnenmacher und Weber 2011). Neben Aktin spielen das zytoskelettale Remodeling und membranöses Cholesterol eine Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass die Infektion sensibel gegenüber der Inhibierung von Cdc42, Arf1 und GRAF1 ist. Diese gelten als Marker für die Clathrin-unabhängige Endozytose. Während der Infektion wird die Membran durch lokales Aktin geformt und die Rho-GTPase ist für die Tubusbildung und die Abschnürung der CLIC-Vesikel zuständig (Nonnenmacher und Weber 2011). Ein wichtiges Regulatorprotein ist das GRAF1

(*Rho GTPase activating protein*). Die Viren werden durch das GEEC internalisiert und transloziert in den Golgi-Apparat, ähnlich wie der GEEC-Marker Cholera Toxin B (Nonnenmacher und Weber 2011).

Ein weiterer Clathrin-unabhängiger Weg ist die Makropinozytose. Dabei schnürt sich ein Endosom mithilfe von Aktinremodeling unspezifisch ab. Die Kinase PAK 1 spielt eine wichtige Rolle für die Abschnürung sowie für die Induktion des Prozesses (Dharmawardhane et al. 2000). Das Dynamin kann direkt Cortactin binden, welches sich mit Aktinfilamenten verknüpft und Aktinvesikel bildet (Cowieson et al. 2008).

Ein weiteres Beispiel für einen unabhängigen Prozess ist die Internalisierung des IL2 β Rezeptors. Dieser wird abhängig von der Aktivität der kleinen G-Proteine RhoA und Rac1, sowie der Kinasen Pak1 und Pak2 nach Ligation internalisiert (Grassart et al. 2008). Einige der so endozytierten Membranen kommunizieren mit den Clathrin-abhängigen endozytotischen Kompartimenten, sodass hieran die enge Verknüpfung der einzelnen Wege sichtbar ist.

Die Endstrecke der Endosomen ist allen drei Endozytosewegen gleich. Es entstehen zunächst die frühen Endosomen, die auch sortierende Endosomen genannt werden. Der Name rührt daher, dass die verschiedenen assoziierten G-Proteine zu einer unterschiedlichen Verteilung des Inhalts führen. Die Proteine, die einem Recyclingprozess (siehe 1.1.4.2) zugeführt werden sollen, reichern sich vor allem in den tubulären Membranen des frühen Endosoms ab (Jovic et al. 2010). Die frühen Endosomen sind durch die G-Proteine Rab 4, Rab 5 und Rab 11 gekennzeichnet. Der pH-Wert ändert sich in den frühen Endosomen von 6.2 auf etwa 5.5. Dahingegen steigt der pH von 6.2 auf 6.5 in den Multivesikel Körperchen. Die Proteine, die hier akkumulieren, sollen abgebaut werden (Mellman 1996). Die zur Degradation bestimmten Proteine werden nun dem Lysosom zugeführt, das mithilfe von sauren Proteasen zur Aufspaltung des Proteins führt (Klinke et al. 2010).

Die Verbindung zwischen frühem und spätem Endosom ist bislang nicht sicher geklärt. Die Hinweise deuten aber auf eine Rab-Konversion und damit einen Austausch von frühem zu spätem Endosom hin (Poteryaev et al. 2010; Rink et al. 2005). Die späten Endosomen sind durch Rab 7 und Rab 9 gekennzeichnet.

1.1.4.2. Recycling

Nachdem sich Vesikel von der Zellmembran durch die oben beschriebenen Prozesse gebildet haben, wird der Inhalt einem Recycling-Prozess unterzogen. Dazu fusionieren die Vesikel mit den frühen Endosomen, die Rab-assoziiert sind. Rab Proteine sind GTPasen, die den Transport endo- oder exozytotisch steuern. Die Aktivierung erfolgt über einen GDP/GTP-Austausch (Wandinger-Ness und Zerial 2014).

Die entstandene Fusion wird als endozytotisches Recycling Kompartiment (ERC) bezeichnet. Dieses ist eine häufig Mikrotubuli assoziierte Struktur und wird durch Rab 11 und EHD/Rme1 (*Eps15-homology-domain protein*) reguliert (Chen et al. 1998; Lin et al. 2001).

Diese Recycling Endosomen stellen ein schnell verfügbares Kompartiment für die Oberflächenregulation von Proteinen dar. Hardel et al. zeigten eine Anreicherung von HCN 4 in Recycling Endosomen, die eine rasche Adaptation der Zelle an äußere Stimuli implizieren. (Hardel et al. 2008).

1.2. Kompartimentspezifische Analyse von Proteinkomplexen

Die oben beschriebenen Transportwege differenziert experimentell darzustellen, stellt eine Herausforderung dar. Bei den derzeit etablierten Verfahren gibt es viele Fehlerquellen. Die Dichtezentrifugation ist häufig mit nicht spezifischen Proteinen kontaminiert. Die Immunopräzipitations-basierten Verfahren können nur stabile Interaktionen zeigen (Brunner et al. 2009). Des Weiteren gibt es noch keine Methode um Räume, wie zum Beispiel den synaptischen Spalt isoliert zu untersuchen. Um die Einflüsse auf einzelne Teilschritte zwischen ER und Oberfläche zu untersuchen, wird eine quantitative Analyse der Proteinkomplexe in den einzelnen intrazellulären Kompartimenten benötigt. Hung et al. publizierten dazu eine Methode, die eine kompartimentspezifische Analyse mittels Massenspektrometrie von Proteinkomplexen erlaubt (Hung et al. 2016).

Die Methode basiert auf einer intrakompartimentären Biotinylierung von Proteinen und der anschließenden Aufreinigung ähnlich einer Immunopräzipitation. Die Präzipitate werden die Massenspektrometrie analysiert (s. Abb. 1).

a

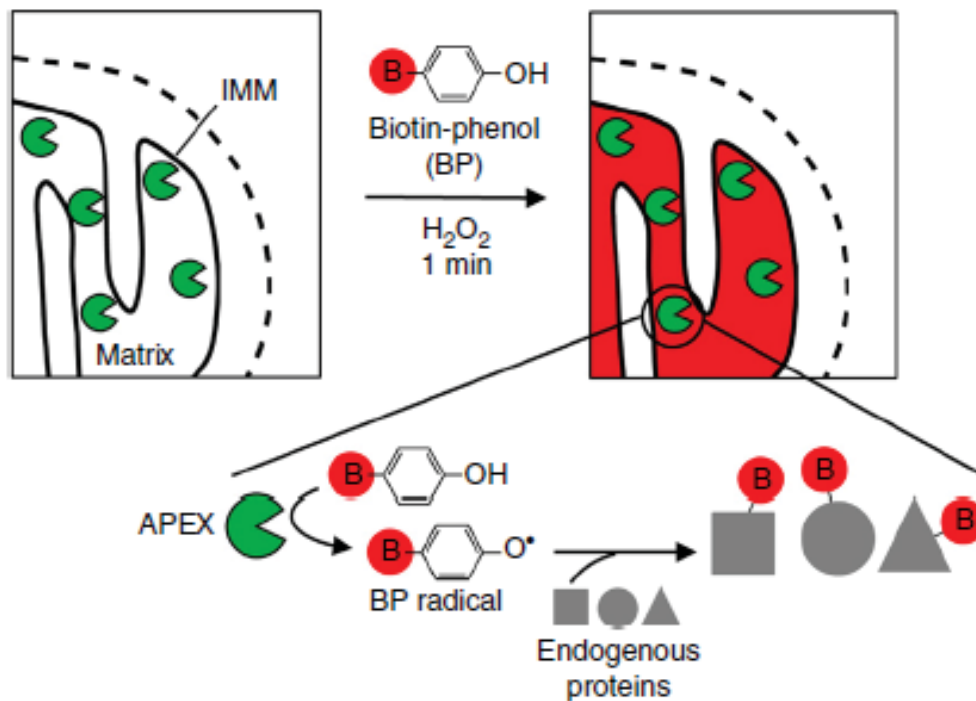


Abb. 1: Schematische Darstellung der intrakompartimentären Biotinylierung durch die APEX2 (Modifiziert, verwendet und gedruckt Hung et al. 2016 *Spatially resolved proteomic mapping in living cells with the engineered peroxidase APEX2* mit Erlaubnis von Springer Nature (4640151034333), 2016)

In grün als Pacman dargestellt ist die Peroxidase APEX2, die an ein Signalprotein gekoppelt wird und so in das gewünschte Kompartiment sezerniert wird. Nach Zugabe von Biotinphenol (BP) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) wird die Peroxidase aktiviert und bildet BP-Radikale, die als rote Fläche, sowie als rote Markierung dargestellt werden. Diese haben eine sehr kurze Halbwertszeit und biotinylieren daher nur die Proteine, die in der unmittelbaren Umgebung also nur im gewünschten Kompartiment sind. Mittels Streptavidin-gecoateten *beads* können die biotinylierten Proteine gesammelt werden.

Voraussetzung ist eine spezifische Peroxidase (APEX2), die sich in ein Kompartiment schleusen und gezielt aktivieren lässt. Dies geschieht durch die Klonierung von APEX2 an Markerproteine, die bereits als kompartimentspezifisch bekannt sind. APEX2 wird nicht nur durch die Hinzugabe von Wasserstoffperoxid aktiviert, sondern kann auch in Anwesenheit von Biotin Proteine biotinylieren. Wird die Peroxidase nun mittels Wasserstoffperoxids aktiviert und wird den Zellen Biotinphenol hinzugegeben, biotinyliert sie alle lokal umliegenden Proteine. Da die Biotinphenolradikale nur eine Halbwertszeit von 1-2 ms haben und intrazelluläre Membranen nur schwer überwinden können, werden dadurch vorwiegend Proteine im Kompartiment biotinyliert, siehe Abb. 1. Um diese aufzureinigen, werden die Zellen lysiert und Streptavidin-gekoppelte *beads* hinzugegeben. Streptavidin bindet Biotin

kovalent und die beads können mittels eines Magneten gesammelt werden (Hung et al. 2016).

Die biotinylierten Proteine, die an den *beads* gebunden sind, sollten demnach zu dem gewünschten Kompartiment gehören.

1.3. HCN-Kanal

1.3.1. Physiologie der Kanäle inklusive ihrer Prozessierung

HCN-Kanäle gelten als Schrittmacher in Herz und Hirn. Dieser auch *funny channel* genannte Kationenkanal hat die Besonderheit, dass er bei Hyperpolarisation der Zellmembran permeabel für Kationen wie Na^+ und K^+ wird. Der daraus resultierende Strom wird im kardialen System I_f genannt und im neuronalen System als I_h bezeichnet (Klinke et al. 2010).

Abb. 2 zeigt den schematisch-molekularen Aufbau des HCN-Kanals. Der Spannungssensor im S4-Segment führt bei Aktivierung zu einer Konformationsänderung und zu einer Durchlässigkeit der Pore zwischen den Segmenten S5 und S6. Der *C-Linker* ist an das Segment S6 angegliedert mit der *cyclic nucleotide binding domain*. (CNBD). Diese erlaubt eine Modulierbarkeit der Spannungsabhängigkeit der Kanäle durch cAMP, in dem sie in Anwesenheit von cAMP eine Konformationsänderung bewirkt und die Hemmung des *C-Linkers* aufhebt (Biel et al. 2002).

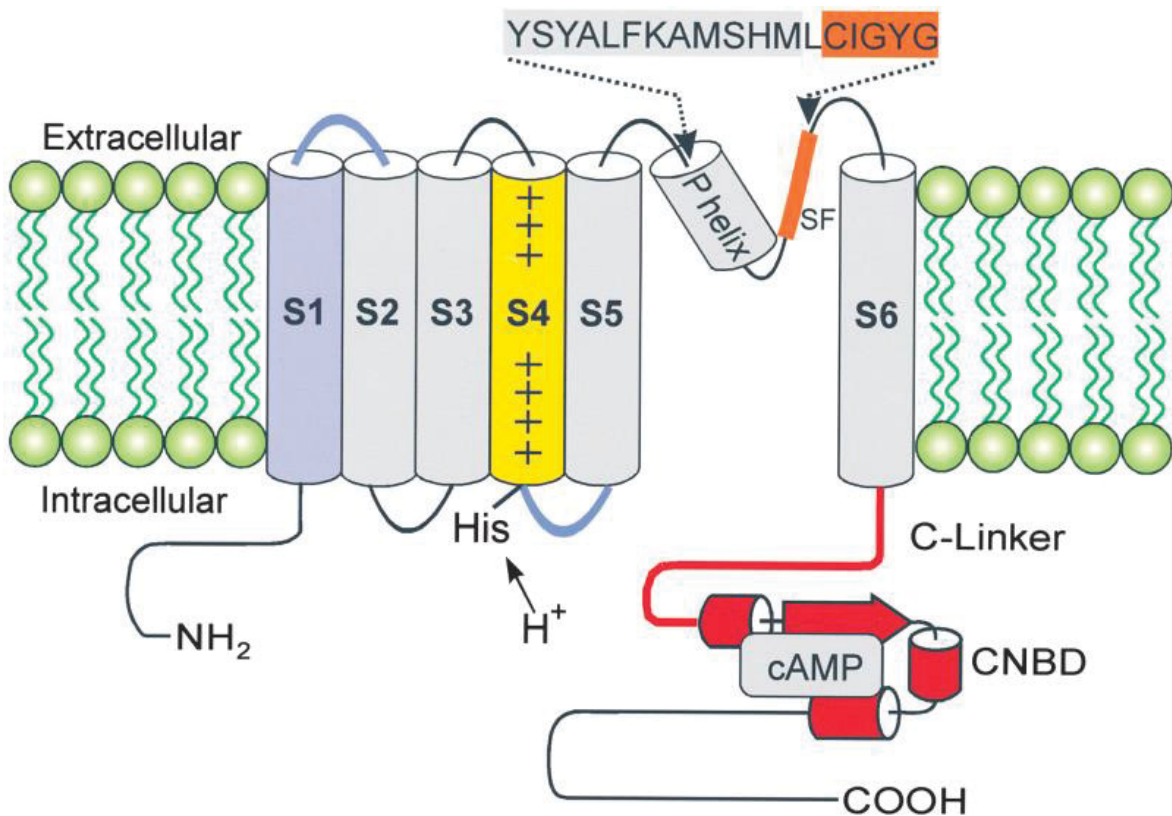


Abb. 2: Molekularer Aufbau des HCN-Kanals (Verwendet und gedruckt Biel et al. 2002 Cardiac HCN Channels: Structure, Function, and Modulation mit Erlaubnis von Elsevier (4640240943235), 2016)

HCN-Kanäle bestehen aus 6 transmembranären Segmenten wobei das S4-Segment als Spannungssensor fungiert. Die Pore befindet sich zwischen den Segmenten S5 und S6 und ist mit einer P-Helix ausgekleidet, sowie mit dem für Kaliumkanäle charakteristischen YGY-Selektivitätsfilter. Ein C-Linker verbindet das S6-Segment mit dem intrazellulär gelegenen CNBD-Element (cyclic nucleotide binding domain), das cAMP-sensibel ist. Die dargestellten Segmente sind in den Isoformen HCN1-4 nahezu identisch, jedoch unterscheiden sich die Isoformen in ihrem N- und C-Terminus. Bindet cAMP an die CNBD Region führt dies zu einer Linksverschiebung in der Aktivierungskurve und es kommt zu einem früheren Öffnen der Kanäle.

Die HCN-Kanalfamilie lässt sich in vier Subtypen HCN1-4 unterteilen, die je nach Subtyp regionenspezifisch zu finden sind. In den meisten neuronalen Geweben sind die Subtypen HCN1-3 vertreten, in kardialen und in thalamokortikalen Schrittmacherzellen finden sich vorwiegend HCN4-Kanäle. Die neuronale Verteilung zeigt, dass in kortikalen Pyramiden-, Korb- und Purkinjezellen vor allem HCN1 exprimiert wird. In der CA1 und CA3 Region des Hippokampus konnte eine Koexpression mit HCN2-Kanälen gezeigt werden (Ludwig et al. 1998).

In Neuronen moduliert der HCN-Kanal durch seinen depolarisierenden Kationenfluss vor allem rhythmogene Prozesse, dendritische Integration und die synaptische Transmission. Die Aktivierung des Kanals wird unter anderem von cAMP positiv beeinflusst. Auch Membranphospholipide wie PIP₂ dienen als allosterische

Liganden der HCN-Kanäle und können die Aktivierungsspannung um 20 mV senken, also in Richtung Depolarisation verschieben (Biel et al. 2002). Der pH-Wert nimmt ebenfalls Einfluss auf die Aktivierungsspannung. Bei einem pH <6 wird die Aktivierungsspannung herabgesetzt, so dass der Kanal schneller Aktionspotenziale generiert (Andreas Neef 2004). Die genauen Mechanismen sind bisher nicht bekannt.

Im Herzen führt der periodische Ionenfluss durch die Zellen des Sinusknotens zu einem regelmäßigen Herzschlag. Das Reizleitungssystem exprimiert HCN4 mit der höchsten Dichte im Sinusknoten. Die nachfolgenden Stationen Atrioventrikulärer Knoten, His-Bündel und die Tawara-Schenkel haben eine absteigende Dichte der Kanäle in ihrer Membran (Biel et al. 2002).

Der HCN-Kanal kann also als Taktgeber für das menschliche Herz und Hirn gesehen werden. Daher sind Fehlfunktionen, zum Beispiel durch Mutationen ausgelöst, mit schwerwiegenden Auswirkungen verbunden, wie zum Beispiel Fälle vom *sick sinus syndrome* beweisen (Semelka et al. 2013).

Neuere Untersuchungen geben Hinweise darauf, dass HCN-Kanäle in der Genese und damit auch in der Therapie von Epilepsien eine zentrale Rolle spielen. Als Schrittmacherkanäle spielen sie auch eine große Rolle für die kortikale Exzitabilität und sind daher maßgeblich in Genese der Epilepsien involviert. Huang et al. zeigten 2009, dass HCN1-deletierte Mäuse einen erhöhten dendritischen Informationsfluss hatten und dadurch eine vermehrte synaptische Integration aufwiesen (Huang et al. 2009). Bei der Temporallappenepilepsie konnte eine signifikante Runterregulierung von HCN-Kanälen gezeigt werden, bei der es daraufhin häufiger zu einem pharmakologisch resistenten Status epilepticus kam (DiFrancesco und DiFrancesco 2015). DiFrancesco et al. zeigten, dass eine homozygot rezessive Mutation in der *C-Linker* Region des HCN2-Kanals einen fast kompletten Aktivitätsverlust des Kanals impliziert und zu einer signifikanten Erhöhung der neuronalen Dysfunktion und Exzitabilität führt (DiFrancesco et al. 2011). Der *C-Linker* verbindet die CNBD mit dem membranständigen Anteil des HCN-Kanals. In Abwesenheit von cAMP wirkt der *C-Linker* inhibitorisch auf die HCN-Kanäle (Biel et al. 2002).

1.3.2. Einfluss des tetratricopeptide-repeat containing Rab8b (Trip8b) auf die Prozessierung

Wie in den ersten Abschnitten beschrieben, gibt es viele Determinanten, die die Verteilung und die Aktivität von Ionenkanälen beeinflussen. Für den HCN-Kanal wurden akzessorische Untereinheiten entdeckt, die seine Aktivität und Expression modulieren (Bankston et al. 2012; Bankston et al. 2017).

Eine der akzessorischen Untereinheiten, die auch als β -Untereinheit bezeichnet wird, ist das Trip8b, auch unter dem Namen PEX5R bekannt. Zolles et al. zeigten, dass der Proteinkomplex Trip8b als intrinsische β -Untereinheit zu einer Antagonisierung von cAMP führt, ohne dass Phosphorylierung und der basale Schwellenwert beeinflusst wurden (Zolles et al. 2009). Allerdings wird die Aktivierungsspannung in Richtung Hyperpolarisation verschoben. Das zytoplasmatische Protein Trip8b bindet an das C-terminale Ende des HCN-Kanals, und zwar sowohl an die drei endständigen Aminosäuren -SNL, als auch an die CNBD. Dadurch kommt es zu einer Änderung der Konformation des *C-Linkers*: Nach Bindung von cAMP an die CNBD verlangsamt sich dennoch die Öffnungsgeschwindigkeit und die Aktivierungsspannung verschiebt sich zu hyperpolarisierten Werten. Außerdem wird die Oberflächenexpression des Kanals negativ beeinflusst (Bankston et al. 2012; Zolles et al. 2009). Der Anteil von Trip8b, der an die CNBD bindet, wird Trip8b_{core} genannt. Dieser vermittelt die Interaktion von HCN und cAMP, kann diese negativ beeinflussen und ist damit ausschlaggebend für die reduzierte cAMP und HCN Interaktion (Zolles et al. 2009). Der dahinterstehende Mechanismus ist noch nicht abschließend geklärt, es könnte sich sowohl um einen kompetitiven als auch nicht-kompetitiven Mechanismus handeln. Bei einem möglichen nicht-kompetitiven Mechanismus kommt es zu einer Konformationsänderung der CNBD mit nachfolgender verminderter Affinität für cAMP. Bei einem kompetitiven Mechanismus kommt es zwischen cAMP und Trip8b zu einer Verdrängung an der cAMP-Bindungsstelle oder einer Interaktion mit der Bindungsstelle. Das *Core*-Fragment scheint dabei bei HCN2-Kanälen ausschlaggebend zu sein (Bankston et al. 2017; DeBerg et al. 2015).

Nach Lyman et al. scheint das Molekül Trip8b klinische Relevanz in der Ursache und Therapie der Depression zu haben (Lyman et al. 2017). Da diese Untereinheit bisher nicht im Herz nachgewiesen wurde, wird eine pharmakologische Selektivität

bei der HCN-Kanal-Beeinflussung vermutet. Han et al zeigten an Trip8b-Knockout Mäusen, dass die Trip8b vermittelte Kanalprozessierung vermindert wurde und dies zu antidepressivem Verhalten führte. Aus diesem Grund forscht man an molekularen Inhibitoren der HCN-Trip8b Interaktionen (Han et al. 2017).

Lewis et al zeigten, dass *Splice*-Varianten der Untereinheit Trip8b eine Hoch- oder eine Runterregulierung des HCN-Kanals bewirken können und so zu einem dynamischen Geschehen beitragen (Lewis et al. 2009).

1.4. Ziele der Arbeit

Für die vorliegende Arbeit wurden folgende Ziele formuliert:

- Reproduktion der kompartimentspezifischen Proteom-Aufreinigung nach einer Methode von Hung et al.

Es wurde ein Verfahren reproduziert, das eine Kompartiment-spezifische Biotinylierung mit anschließender Aufreinigung von Proteinen und Interaktionspartnern erlaubt. Dazu wurde eine konstruierte Peroxidase (APEX2) durch Fusion mit spezifischen Signalsequenzen in einzelne subzelluläre Kompartimente geschleust und lokal aktiviert.

- Entwicklung von kompartimentspezifischen APEX2-Fusionskonstrukten für die kompartimentspezifische Proteomaufreinigung

Als Kompartimente wurden das Endoplasmatische Retikulum, der Golgi-Apparat, das endozytotische Recycling-Kompartiment sowie die Zellmembran ausgewählt. Diese Kompartimente stellen wichtige Stationen in der Proteinprozessierung dar und sind daher für eine differenzierte Untersuchung besonders geeignet.

- Untersuchung von HCN-Kanal-, sowie Trip8b-Expression in den kardialen Ganglienzellen der Maus mittels qPCR

In einer zweiten Experimentalreihe wurde, mittels quantitativer *real-time-PCR* (*qPCR*), die mRNA-Expression von HCN-Kanälen und ihrer Untereinheit Trip8b in peripheren kardialen Ganglienzellen der Maus untersucht.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Verbrauchsmaterialien

Für die Experimente wurden folgende Verbrauchsmaterialien verwendet (s. Tabelle 1).

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien

6- und 24- well Platten	Cellstar
Deckgläschen	
Sonstiger Laborbedarf	
MicroAmp optical 96-well reaction plates	Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific
T175-Flaschen	Eppendorf

2.1.2. Puffer und Lösungen

Es wurden vorliegende Puffer und Lösungen verwendet (s. Tabelle 2).

Tabelle 2: Puffer und Lösungen

DMEM	Gibco
DMEM mit Glutamaxx	Gibco
DPBS	Gibco
HEPES 1M	Gibco
OptiMem	Gibco
Penicillin/Streptomycin 2,5 %	Gibco

2.1.3. Chemikalien

Die Chemikalien wurden von folgenden Firmen verwendet (s. Tabelle 3).

Tabelle 3: Chemikalien

Acrylamid	BioRad
Agar	Roth
Agarose	invitrogen
Ampicillin	Fluka
Biotin	Thermo Scientific

Tabelle 4: Chemikalien

Biotin-Phenol/ Biotin Tyramide	Iris Biotech
Bovine serum albumine	Sigma
DMSO 100 %	Thermo scientific
DTT (DL-Dithiothreitol)	Applichem
H ₂ O ₂	Fluca
Hefe-Extrakt	Fluka
Kanamycindisulfatsalz	Sigma
Milchpulver	
NaCl	Fluka
Natriumascorbat	Sigma
Natriumazid	Sigma
Paraformaldehyd (PFA)	Aldrich
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Roth
Triton x-100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol)	Sigma
Trolox ((±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid)	Aldrich
Tryptone	Fluka

2.1.4. Enzyme, Reagenzien und Marker

Es wurden folgende Enzyme, Reagenzien und Marker verwendet (s. Tabelle 5).

Tabelle 5: Enzyme, Reagenzien und Marker

dual color und allblue	Biorad
FastAP 1U/μl	Thermofisher
Fast digest green buffer 10 ×	Fermentas
Fugene HD	Promega
Ligase buffer 10 ×	Thermo scientific
Luminol	GE Healthcare
O'gene Ruler 100bp plus	Thermo scientific
O'gene Ruler 1kbp plus	Thermo scientific
Phusion GC Buffer 5 ×	Thermo scientific
Phusion HF Buffer 5 ×	Thermo scientific

Tabelle 6: Enzyme, Reagenzien und Marker

Phusion High fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs
Prolong gold antifade	invitrogen
Protease Inhibitor Mix	
Restriktionsenzyme (1µl/ reaction)	Fermentas und thermofischer
Streptavidin magnetic <i>beads</i>	Pierce
SYBR Safe DNA gel stain	Molecular probes
T4 DNA Ligase 5U/µl	Thermo scientific
Trypsin	Gibco

2.1.5. Kits

Es wurden folgende Kits für die vorliegende Arbeit verwendet (s. Tabelle 7).

Tabelle 7: Kits

Elutionskit	Qiagen
Midi-Prep Kit	Qiagen
Mini-Prep Kit	Qiagen
Omniscript reverse transkriptase	Qiagen
Pierce 660 nm assay	Fischer
RNeasy Micro Kit	Qiagen
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen
SYBR green PCR Mastermix	Applied Biosystems / Thermo Fisher Scientific

2.1.6. Oligonucleotide und *Primer*

Die verwendeten Oligonucleotide und *Primer* wurden mittels Vector NTI entworfen und bei biomers bestellt. Die *Primer*konzentration betrug immer 100pmol/µl.

Sequenzierungen wurden von der Firma GATC (inzwischen Eurofins Scientific) durchgeführt.

Die AraB RNA stammte von Applied Microarray, (Tempe USA).

2.1.7. Bakterien, Zelllinien und Gewebe

Es wurden folgende Bakterien, Zelllinien und Gewebe verwendet (s. Tabelle 8). Gesondert aufgeführt sind die Daten der Präparation der Ganglienzellen (s. Tabelle 9).

Tabelle 8: Bakterien, Zelllinien und Gewebe

Kompetente E.coli Zellen	Stratagene XL1Blue
HeLa Zellen	
Ganglienzellen	Geliefert aus Hamburg,

Tabelle 9: Ganglienzellen und Trachea

Präparationsdatum	Anzahl Ganglienzellen (-80 °C)	Lysepuffer
13.10.2015	5 (pmDE Mäuse)	2x350 µl
29.03.2016	2	100µl
25.01.2017	2	100µl
25.01.2017	3	100µl
25.01.2017	5	100µl
<u>Trachea</u>		
25.01.2017	1	100µl

2.1.8. Antikörper und Seren

Es wurden die vorliegenden Antikörper und Seren verwendet (s. Tabelle 10, Tabelle 11 und Tabelle 12).

Tabelle 10: Antikörper

Primärantikörper	Wirt	Nummer	Firma
58K	mouse	Ab27043	abcam
aAnti-V5	mouse	R960-25	invitrogen
Anti GFP	mouse	11814460001	Roche
Anti-HA	Rat	11867423001	Roche
Calnexin	rabbit	Ab75801	abcam
CD4-AK	mouse	OMA-I-03300	
Ehd1	rabbit	Ab109311	abcam
GluR1	rabbit	Ab1504	abcam
GluR1	rabbit	PC246	Calbiochem
GM130	mouse	Ab52649	abcam
KDEL	mouse	Ab12223	abcam
NucBlue			Thermofisher
Rab11	rabbit	R5903	sigma
β-Actin		Ab8227	abcam

Tabelle 11: Antikörper

Sekundärantikörper

AF 488 gt-anti-Ms	goat	21424	Molecular probes
AF 488 gt-anti-rb	goat	A110088	Molecular probes
Cy 3 gt-anti-Ms IgG 2mg/ml	goat	Ab10521	abcam
Cy 3 gt-anti-rb	goat	Ab10520	abcam
Streptavidin AF546	goat	S11223	Molecular probes
Transferrin AF488		T13342	Molecular probes

Western Blot AK

gt-anti-Ms HRP	goat	Sc-2005	Santa Cruz
gt-anti-rb HRP	goat	Sc-2004	Santa Cruz
Streptavidin HRP			

Tabelle 12: Seren

FBS 10%	Superior Biochrome
Normal goat serum	

2.1.9. Geräte und Software

Es wurden folgende Geräte und Software verwendet (s. Tabelle 13, 14 und Tabelle 15).

Tabelle 13: Verwendete Geräte

StepOne real time PCR System	Applied Biosystems
Eppendorf Mastercycler	
Eppendorf Zentrifugen	
NanoDrop	
Fusion FX Vilber Lourmat	
gentleMACS Dissociator	(Miltenyi Biotec)

Tabelle 14: Verwendete Software

Adobe PDF reader
Citavi
ImageJ
Office

Tabelle 15: Verwendete Software

StepOne
ZenBlue

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. Planung der APEX2-Fusionskonstrukte

Der Vektor, APEX2-NES in pcDNA3, wurde mittels Anzucht auf einer Ampicillin-Platte und anschließend Restriktionsverdau verifiziert. Nach Sequenzierung des APEX2-codierenden spezifischen Vektoranteils konnte die APEX2 für die Klonierung verwendet werden.

Per Literaturrecherche wurden Sortierungssequenzen gesucht, die spezifisch für Golgi-Apparat, Endoplasmatisches Retikulum (ER), endozytotisches Recycling-Kompartiment (ERC) und die Zelloberfläche sind. Die Galactosyltransferase als Markerprotein für den Golgi-Apparat, wurde in Vorversuchen auf Kompartimentspezifität in der Immunzytochemie getestet (siehe Abbildung 18 im Anhang). Es wurden verschiedene Sequenzen der Markerproteine für die subzelluläre Sortierung der APEX2-Fusionsproteine verwendet (s. Tabelle 16)

Tabelle 16: Übersicht Markerproteine und APEX2-Fusionsproteine

APEX2-Fusionsprotein	Kompartiment	Sortierungssequenz
Galactosyltransferase-V5-APEX2	Golgi-Apparat	AS 1-59 der Galactosyltransferase (c-terminal) (Gleeson 1998)
Calreticulin-V5-APEX2-KDEL	Endoplasmatisches Retikulum	AS 1-16 des Calreticulins (c-terminal)(Michalak et al. 2009), KDEL (n-terminal) (Alanen et al. 2011)
P450-V5-APEX2-KDEL	Endoplasmatisches Retikulum	p450 (c-terminal) (Brignac-Huber et al. 2016) KDEL (n-terminal) (Alanen et al. 2011)
Rab11-V5-APEX2	ERC	CDS des Rab11 (n-terminal) (Ullrich et al. 1996)
Fyn-V5-APEX2	Zellmembran	AS 158-173 Fyn-Anker (c-terminal) (Kameda et al. 2008)

Für die Klonierung wurden aus der lokalen Genkarten-Datenbank Vektoren gesucht. Diese enthielten für das Golgi-Fusionskonstrukt und das ERC-Fusionskonstrukt schon die codierende Sequenz für das Markerprotein (z.B. *Galtase* in pEGFP oder Rab11 in pEGFP) und es wurde die cDNA-Sequenz (747 bp) für die APEX2 eingefügt. Die Fusionskonstrukte für ER und Zellmembran bauten auf dem *Galtase*-APEX2-Fusionskonstrukt auf und es wurde die codierende Sequenz für die *Galtase* durch die Sequenz für Fyn und Calreticulin-KDEL ersetzt. Passende *Primer*, um die Klonierung zu vollziehen, wurden entworfen. Alle *Primer*

enden mit der Base Guanin oder Thymin, und haben maximal 20 Basenpaare (bp).

Eine Übersicht über die Namen der Fusionsproteine, die Lokalisation, sowie die zur Herstellung benötigten *Primer*, Enzyme und Vektoren findet sich in Tabelle 17.

Tabelle 17: Übersicht der Fusionsproteine

Konstrukt	Lokalisation	Primer	Restriktionse- zyme	Template PCR	Vektor	Größe der Schnittstück e (bp)
GalTase APEX2	Golgi-Apparat	Forward: BamHI-V5-Apex2-F (#1026) Gagagatccagaaagcctatcccataatccactcttggacttgattactactg- gaaagtcttaccacaactgtg Reverse: NotI-Apex2-R (#1027) gagagcgccgcctcagggcafcagcaaaccccaagc	BamH1, Not1	Galtase pEGFP alt)	Galtase pEGFP	734 <u>4200</u>
Rab11 APEX2	ERC	Forward: NheI-V5-Apex2-F (#1028) Gagagctagcatgggaaagcctatcccataatccactcttggacttgattactactg- gaaagtcttaccacaactgtg Reverse: XhoI-Apex2-R (#1029) gagactcgagatggcatcagcaaaccccaagc	Nhe1, Xho1	Rab11 pEGFP (#30)	Rab11 pEGFP	750 <u>4626</u>
Calreticulin APEX2 KDEL	ER	Forward: BamH1-CalreticulinSignalSequence-V5-F (#1030) Gagagatccatgctctcttcttggctgcgctcctgctt- ggctctctggcctggccgcccaggaagaaagcctatcccataatcc Reverse: Not1-ER retention signal-Apex2-R (#1031) gagagcgccgctcacagctcatccttggcatcagcaaaccccaagc	BamH1, Not1	Galtase APEX2	pEGFP (#6)	734 <u>4000</u>
P450C1 APEX2 KDEL	ER	Forward: EcoR1-p450C1-V5-F (#1032) gagagaatcatggatcctctgtgtgtgctggggctctctctcctctgtt- gcttctcttactctggaacagagactatgggggggaaagcc- tatcccaaatcc Reverse: Not1-ER retention signal-Apex2-R (#1031) gagagcgccgcctcacagctcatccttggcatcagcaaaccccaagc	EcoR1, Not1	Galtase APEX2	Galtase APEX2	780 <u>4000</u>
Fyn APEX2	Zellmembran	Forward: Xho1-Fyn-F (#1049) Gagactcgagctcgccaccatgggctgtgcaatgtaag- gataaagaagcagcgaacacigacagagggaaagcctatcccataatccac Reverse: GFP-N-R (#1033) tattgttaaccattataagctgc	Xho1, Not 1	Galtase APEX2	Galtase APEX2	863 <u>1512</u>
V5 APEX2 Fyn	Zellmembran	Forward: Xho 1 Fyn FP(#1059) Gagactcgagagctgtgcaatgtaag Reverse: BamH1- Fyn RP (#1060) gagagatcctcactctgtcagtttcgctg	Xho1, BamH1	Rab11 APEX2	Rab11 APEX2	673 <u>4800</u>

2.2.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Der erste Schritt zur Klonierung der Konstrukte war die Polymerasekettenreaktion, die mit den oben genannten Reagenzien durchgeführt wurde.

Als Standard wurde folgender Ansatz gewählt:

1 µl	<i>Template DNA</i> (c= 10 ng/µl)
3 µl	<i>Forward-Primer</i> (100pmol/µl)
3 µl	<i>Reverse-Primer</i> (100pmol/µl)
10 µl	5x HF-Puffer
1 µl	dNTP Mix (10mM)
0,5 µl	Phusion Polymerase (2U/µl)
<u>31,5 µl</u>	<u>Sigma H₂O</u>

Die PCR wurde mit 30 Zyklen bei 60 °C *Annealing* Temperatur und 25 s Elongation gestartet.

Für die Konstrukte des endoplasmatischen Retikulums (ER) wurde die PCR mit 5 × GC-anstatt 5 × HF-Puffer hergestellt und mit 5 % DMSO versetzt. Ist die DNA sehr GC-reich bildet sie sekundäre Strukturen, die eine Denaturierung erschweren. DMSO macht die DNA instabiler und führt zu einer besseren *Primer*bindung.

2.2.3. Agarosegelelektrophorese

PCR-Produkte wurden anschließend mit 10 µl 5 × *Green Buffer* gemischt und auf ein 1-%iges Agarose Gel mit *SYBR Safe* (1:1000) aufgetragen und bei 130 V 30 min elektrophoretisch aufgetrennt. Die Banden der richtigen Größe wurden mittels *Bluescreen* detektiert und ausgeschnitten (siehe Tabelle 17). Es wurde eine Kontrollaufnahme mit der UV-Lampe aufgenommen.

2.2.4. DNA-Präparation und -Aufreinigung

Die DNA-Präparation und Aufreinigung der PCR Produkte wurde mit dem Elutionskit von QIAGEN durchgeführt. Die Elution erfolgte in 14 µl Sigma H₂O.

2.2.5. Restriktionsverdau

Die PCR Produkte mussten vor der Ligation mittels Restriktionsenzymen vorbereitet und geschnitten werden. Der Ansatz für den Restriktionsverdau ist der Tabelle 18 zu entnehmen:

Tabelle 18: Ansätze für Restriktionsverdau

Vektor	Insert
1 µl Vektor DNA (1 µg/µl)	16 µl PCR-Produkt
1 µl Restriktionsenzym 1 (1U/µl)	1 µl Restriktionsenzym 1 (1U/µl)
1 µl Restriktionsenzym 2 (1U/µl)	1 µl Restriktionsenzym 2 (1U/µl)
2 µl <i>green buffer</i>	<u>2 µl <i>green buffer</i></u>
<u>15 µl H₂O</u>	
20 µl	20 µl

Die Ansätze wurden für 30 min bei 37 °C inkubiert. Zu dem geschnittenen Vektor wurden im Anschluss 10 µl alkalische Phosphatase (FastAP 1U/µl) hinzugegeben und der Ansatz weitere 10 min bei 37 °C inkubiert, um den Vektor zu dephosphorylieren und eine Religation des geschnittenen Vektors zu verhindern.

2.2.6. Ligation

Um die geschnittenen DNA-Stücke wieder zu verbinden wurde eine Ligation durchgeführt.

Die Formel für die Ligation lautet:

$$\text{Masse Insert [ng]} = \frac{\text{Länge Insert [bp]} \times \text{Masse Vektor [ng]}}{\text{Länge Vektor [bp]}} \times 3$$

Der Ligationsansatz wurde nachfolgendem Schema pipettiert:

1 µl	Vektor-DNA (siehe Tabelle 18)
16 µl	<i>Insert</i> -DNA (siehe Tabelle 18)
2 µl	Ligase Puffer (10 ×)
<u>1 µl</u>	<u>T4-DNA-Ligase (5 U/µl)</u>

Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 16 °C.

Parallel wurde eine Negativkontrolle angesetzt, bei der anstatt des *Inserts* Sigma H₂O hinzugegeben wurde. Die Negativkontrolle dient dazu die Religationsrate des geschnittenen Vektors zu ermitteln.

2.2.7. Transformation

Die DNA wurde in kompetente *E.coli* XL1 Blue Bakterien transformiert.

Dazu wurden 70 µl kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut. Im Anschluss wurden 3 µl Ligationsansatz bzw. Negativkontrolle hinzugegeben, die Suspension jeweils gut gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 90 s und die sofortige Rückführung der Bakterien auf Eis. Nach einer

Minute wurden 450 µl steriles, antibiotika-freies LB-Medium hinzugegeben. Wurde in die Zellen ein Vektor mit Resistenzgen für Ampicillin transformiert, konnte der Ansatz direkt auf ampicillinhaltige Agar-Platten ausplattiert werden. Bei vorhandener Kanamycinresistenz wurde der Ansatz zunächst eine 1 h bei 37 °C geschüttelt, bevor der Ansatz auf Kanamycin-haltigen Platten ausgestrichen wurde. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

LB-Medium:

10 g NaCl

10 g Tryptone

5 g Hefe-Extrakt

ad 1000 ml H₂O und autoklavieren, Hinzugabe von Ampicillin oder Kanamycin

LB Agar

10 g NaCl

10 g Tryptone

5 g Hefe-Extrakt

15 g Agar ad 1000 ml H₂O und autoklavieren, Hinzugabe von Ampicillin oder Kanamycin

2.2.8. Mini und Midi Präparation

Die gewachsenen Kolonien wurden am nächsten Tag mit sterilen Zahnstochern gepickt und in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum gegeben.

Je nach Menge an erforderlicher DNA wurde ein Mini- oder ein Midi-Ansatz gewählt. Der Mini-Ansatz umfasste 3 ml Volumen, der Midi-Ansatz 100 µl. Es erfolgte eine Kultivierung über Nacht bei 37 °C.

Am nächsten Tag wurde der Ansatz abzentrifugiert (Zentrifugation bei 4000 rpm, 4 °C und für 15 min). Die im *Pellet* enthaltende Vektor-DNA wurde mittels MiniPrep Kit von QIAGEN bzw. MidiPrep Kit von QIAGEN aufgereinigt.

2.2.9. Sequenzierung und Kontrollverdau

Um Mutationen auszuschließen, wurden alle Konstrukte per Kontroll-Restriktionsverdau und Sequenzierung geprüft.

Es wurden nach der Midi-Präparation die Ansätze wie im Abschnitt Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die Überprüfung der korrekten Transformation erfolgt

über einen Restriktionsverdau mit den zuvor verwendeten Restriktionsenzymen. Die DNA wurde, wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben, verdaut und mittels eines 1 %igen Agarose-Gels analysiert.

Es wurden die Banden, die die erwartete und korrekte Größe hatten aus dem Gel wie im Abschnitt 2.2.4 eluiert und zum Sequenzieren geschickt.

Die Sequenzen wurden mit dem Programm *Vector NTI* mit den Genkarten der Fusionsproteine verglichen. Mögliche Sequenzmutationen wurden auf Relevanz hinsichtlich Aminosäurenaustausch überprüft.

2.3. Zellbiologische Methoden

2.3.1. Kultivierung der HeLa-Zellen

Die HeLa-Zellen wurden in T175-Flaschen in HeLa-Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert und bei 80%iger Konfluenz *gesplittet*.

Es wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen mit 13 ml DPBS gespült. Danach wurden 4 ml 1 × Trypsin auf die Zellen gegeben und direkt abgesaugt. Die Zellkulturflasche wurde für 2 min erneut bei 37 °C inkubiert. Anschließend konnten die Zellen mit 10 ml Medium von dem Flaschenboden abgelöst und in einen 50 ml Falcon überführt werden. Diese Suspension wurde dann nach Bedarf *gesplittet*.

Für das Aussäen erfolgte die gleiche Präparation der Zellen wie beim *Splitten*. Aus dem 50 ml Falcon wurden 10 µl Suspension entnommen und 1:10 in 100 µl Medium verdünnt. 10 µl der Suspension wurden in eine Neubauer Zählkammer gegeben und die Konzentration der Zellen bestimmt. Es wurden pro 6-*well* Platte 400 000 Zellen in 2 ml Endvolumen ausgesät und pro 24-*well* Platte 80 000 Zellen in einem Volumen von 0,5 ml. Sollten die Zellen für Färbungen verwendet werden, wurden sie auf Deckgläschen ausgesät.

HeLa Medium:

88% DMEM+Glutamax

10% FBS

1%Penicillin/Streptomycin

1% HEPES 1M

2.3.2. Transfektion der HeLa-Zellen

Für das Einbringen von DNA in die Zellen wurde eine Transfektion durchgeführt.

24 h nach dem Aussäen wurden die Zellen mittels Fugene HD- Protokoll transfiziert.

Der Transfektionsansatz ist in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19: Transfektionsansatz

24-well Platten-Ansatz (pro well)	6-well Platten-Ansatz (pro well)
50 µl OptiMem	200 µl OptiMem
1 µl DNA (c=1 µg/µl) bzw. 2 × 0,5 µl DNA bei Kotransfektion	4 µl DNA (c=1 µg/µl) bzw. 2 × 2 µl bei Kotransfektion
Verdünnte DNA mit 3 µl Fugene HD mischen 15 min bei RT inkubieren und dann 45 µl pro well hinzugeben	Verdünnte DNA mit 12 µl Fugene HD mischen 15 min bei RT inkubieren und dann 150 µl pro well hinzugeben

4-6 h nach Hinzugabe des Transfektionsansatzes erfolgte ein Mediumwechsel und die Kultivierung wurde für weitere 24 h fortgesetzt.

2.4. Immunzytochemische Färbung der HeLa-Zellen

2.4.1. Lokalisationsfärbung

Für die Lokalisationsfärbung wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt, zum einen wurde das GFP-*getaggte* Markerprotein kotransfiziert und das APEX2-Fusionsprotein per Immunzytochemie gefärbt, zum anderen wurde eine Ko-Färbung von Markerproteinen und APEX2-Fusionsprotein vorgenommen.

Einen Tag nach der Transfektion wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 4% igem Paraformaldehyd (PFA) in PBS 15 min bei 4 °C fixiert.

Nachdem die Zellen 3 × 5 min mit jeweils 1 ml PBS gewaschen wurden, folgte für eine Stunde eine Inkubation bei Raumtemperatur mit 10 % *Normal Goat Serum* (NGS) in 0,04 % Triton zur Blockierung unspezifischer Bindestellen und zur Permeabilisierung der Membran. Es wurde 3 × 5 Minuten mit PBS gewaschen. Die Primärantikörper, wurden 1:100 in PBS mit 0,04 % Triton verdünnt und es wurden

pro well 350 µl verdünnte Lösung für 1 h hinzugegeben. Der Anti-V5 Antikörper wurde 1:2000 verdünnt. Nach der Antikörper-Inkubation wurde erneut 3 × 5 min mit PBS gewaschen. Die Sekundärantikörper wurden 1:500 in PBS mit 0,04 % Triton und 10 % NGS verdünnt und 350 µl zur Inkubation verwendet. Nach 1 h Inkubation wurde mit PBS 3 × 10 min gewaschen, dabei wurde beim zweiten Waschschrift jeweils ein Tropfen NucBlue zur Zellkernfärbung hinzugegeben.

Eine Besonderheit stellte die Färbung des ERC da.

Da keine Kotransfektion mit einem Markerprotein erfolgen konnte, musste unmittelbar vor der Färbung AlexaFluor 488 markiertes Transferrin in die Zelle gebracht werden. Dieses reichert sich nach Herstellerangaben spezifisch im ERC an.

Das markierte Transferrin wurde 30 min vor der Färbung in Sigma H₂O verdünnt auf c = 5 mg/ml. 5 µl verdünntes Transferrin wurden in 1 ml DMEM + Glutamax gegeben und 500 µl dieser Lösung je well transfizierter Zellen hinzugefügt. Nach 30-minütiger Inkubation wurde einmalig mit kaltem PBS gewaschen, danach konnte die Färbung erfolgen.

Die Deckgläschen wurden abschließend aus den wells entnommen und umgedreht mit Prolong Gold antifade auf Objektträgern eingedeckelt. Nach einer Trocknungszeit von etwa 1 h wurden die Deckgläschen mit Klarlack fixiert.

Die Bilder wurden mit dem konfokalen LSM 710 Mikroskop von Zeiss aufgenommen und bearbeitet (ZENblue und ImageJ).

10x PBS

8,1mM Na²HPO₄

1,6mM KH₂PO₄

150mM NaCl

2,7mM KCL pH 7,4

2.4.2. Aktivitätsfärbung

Um die APEX2 zu aktivieren, wurden zu den transfizierten Zellen 0,5 ml 500 µM BP in Hela-Medium gegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die APEX2 wurde mit 5 µl 100 mM H₂O₂ aktiviert. Die Reaktion wurde nach 1 min gestoppt durch

Mediumabnahme und 4-maligem Waschen mit *Quencher*lösung. Sie diente dazu, die durch die APEX2 generierten Radikale abzupuffern.

Die anschließende immunzytochemische Färbung erfolgte wie im Abschnitt 2.4.1 beschrieben, wobei anstelle des Sekundärantikörpers Streptavidin AF546 in einer Konzentration von 10 µg/ml verwendet wurde (Auswertung s.o.).

Quencher Lösung

5 mM Trolox in DMSO

10 mM Natriumazid in Millipore H₂O

10 mM Natriumascorbat in Millipore H₂O

DPBS

2.5. Biochemische Methoden

2.5.1. Aufreinigung biotinylierter Proteine

Die Aufreinigung biotinylierter Proteine wurde nach einem Protokoll von Hung et al durchgeführt (Hung et al. 2016). Dabei biotinyliert eine eingeschleuste Peroxidase die unmittelbar umliegenden Proteine, welche im Nachhinein durch Streptavidin-beschichtete *beads* aufgereinigt werden können. Die Peroxidase reichert sich durch Kopplung an Markerproteine in einem Kompartiment an und somit werden hauptsächlich Proteine des gewünschten Kompartiments biotinyliert und anschließend aufgereinigt.

Die HeLa-Zellen wurden mit den oben genannten Fusionskonstrukten transfiziert. Einen Tag nach Transfektion der Zellen wurde das Medium abgenommen und durch 2 ml/*well* Biotinphenol (500 µM) in HeLa-Medium ersetzt. Es wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend die APEX2 mit 20 µl 100 mM H₂O₂ aktiviert. Nach 1 min wurde die Reaktion durch Entfernen des Mediums und 4-maligem Waschen in *Quencher*lösung beendet. Die Zellen wurden im nächsten Schritt mit einem Zellschaber vom Boden gelöst und 10 min bei 4000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 350 µl RIPA Puffer mit 1 × Protease-Inhibitor und 1 mM PMSF resuspendiert und 2 min auf Eis inkubiert.

Um das Lysat von den restlichen Zellbestandteilen zu trennen, erfolgte eine weitere Zentrifugation für 10 min bei 5000 rpm und 4 °C. Die Proteinkonzentration der Lysat-Fraktion wurde anschließend mittels Pierce 660 nm assay von Fischer bestimmt. Es wurden nach der Konzentrationsbestimmung 400 µl Lysat auf eine

Konzentration von $c=0,75 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ mit RIPA verdünnt und mit $100 \mu\text{l}$ Streptavidin-beschichteten *beads* gemischt. Nach über Nacht Inkubation der *beads*-Protein-Ansätze bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ auf dem Rad wurden die *beads* mittels Magnetständer in der Lösung separiert und der so gewonnene Überstand abgenommen und als Ungebunden-Fraktion gelagert. Die *beads* wurden 4-mal mit jeweils 1 ml RIPA Puffer gewaschen. Die Elution erfolgte in $100 \mu\text{l}$ $3 \times$ Lämmli mit 2 mM Biotin und 20 mM DTT für 10 min bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ bzw. $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Es wurden jeweils $15 \mu\text{l}$ Lysat bzw. Ungebunden-Fraktion mit $4 \mu\text{l}$ Lämmli und $1 \mu\text{l}$ DTT für 10 min bei 60 bzw. $37 \text{ }^\circ\text{C}$ denaturiert und eluiert.

RIPA-Puffer

50mM Tris

150mM NaCl

0,1% SDS

0,5% sodium deoxycholate

1% Triton X-100

Mit HCl auf einen pH von 7,5 eingestellt

5x Laemmli-Puffer

312,5 mM Tris/HCL pH 6,8

1,9M Glycin

1%SDS

500mM DTT

0,05% Bromphenolblau

2.5.2. SDS-Page und Western- Blot

Für die SDS-Page und den Western Blot wurden zunächst Gele mit einem 10 %igen Acrylamid-Gehalt hergestellt, mit jeweils 1 mm Dicke und 15 Taschen.

Von jeder Probe wurden $10 \mu\text{l}$ auf das Gel aufgetragen und ein Proteingrößenmarker (Dual color/ All blue) verwendet. Die Laufzeit des SDS Gels betrug 10 min bei 80 V und $1:30 \text{ h}$ bei 100 V . Der Transfer auf die PVDF-Membran erfolgte in der BioRad-Kammer bei 100 V für 100 min in Transferpuffer. Danach wurden die Membranen zur Blockade freier Bindungsstellen entweder 1 h mit 5% Milch in TBS-T oder mit 3% BSA in TBS-T bei RT geschwenkt. Der Primärantikörper wurde $1:1000$ in der entsprechenden Blocklösung verdünnt und über Nacht bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert.

Bis zur abschließenden Entwicklung der Blots wurden diese 4 × 15 min mit TBS-T gewaschen und vor einer letzten Wiederholung der Waschschrirte mit Sekundärantikörper (1:10000) für 1 h inkubiert. Der Sekundärantikörper war mit der HRP gekoppelt und die durch das Substrat Luminol vermittelte Chemolumineszenz-Reaktion machte die entsprechenden Banden sichtbar.

Für die Entwicklung wurden die Luminol-Lösungen 1:1 gemischt und kurz vor der Belichtung auf die Membranen gegeben.

Die Entwicklung der Membranen erfolgte mittels Fusion FX Vilber Lourmat. Die nachfolgende Bearbeitung wurde mit ImageJ vorgenommen.

Trenngel:

30 % Acrylamid

4 × Trenngelpuffer (1,5mM TrisBase pH 8,8, 0,4% SDS)

TEMED

10 % APS

H₂O

Sammelgel:

30 % Acrylamid

4 × Sammelgelpuffer (0,5 M Tris/HCl pH 6,8, 0,4 % SDS)

TEMED

10 %APS

H₂O

10x SDS Laufpuffer

250 mM Trisbase

1,9 M Glycin

1 % SDS

10x Transferpuffer

25 mM TrisBase

192 mM Glycin

bei Verdünnung 20 % vergälltes Ethanol hinzugeben

10x TBS-T

Trizmabase 24,2 g/l

NaCl 80 g/l

pH 7,6 mit rauchender HCl einstellen

10 g Tween

2.6. RNA Isolation und cDNA Synthese

2.6.1. Präparation der Ganglienzellen

Die Ganglienzellen wurden bereits präpariert von Katharina Scherschel aus Hamburg und auf Trockeneis geliefert (siehe Tabelle 9).

2.6.2. RNA Präparation

Die gesamte RNA wurde mittels RNeasy Micro Kit von QIAgen isoliert. Dafür wurde der Lyse-Puffer aus 2 ml RLT-Puffer mit 20 μ l 2 M DTT und 0,5 % DX angesetzt. Das Gewebe wurde mit Lyse-Puffer versetzt (Volumen siehe Tabelle 9) und im gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec) mit dem Programm M RNA 01.01 homogenisiert. Nach kurzer Abzentrifugation der Probe wurde das Homogenisat in den QIAshredder überführt und 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Alle nachfolgenden Schritte zur Isolation erfolgten nach RNeasy Micro Kit Protokoll von QIAgen.

Die gesamt-RNA wurde in $2 \times 14 \mu$ l RNase-freiem H₂O eluiert. Danach erfolgte eine Konzentrationsbestimmung am NanoDrop. Die mRNA wurde entweder bei -80 °C gelagert oder sofort in cDNA umgeschrieben.

2.6.3. cDNA Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mittels QuantiTect Reverse Transcription Kit von QIAgen, wobei pro Reaktion 500 ng gesamt-RNA umgeschrieben worden sind.

Wurde für die *qPCR* ein externer Standard zur Normierung benötigt, wurde zu jeder Reaktion 150 pg *E. coli* AraB RNA hinzugefügt. Dafür wurde dementsprechend weniger RNase freies H₂O verwendet. Im ersten Schritt der cDNA Synthese wurde genomische DNA eliminiert. Dazu setzte sich der Reaktionsansatz wie folgt zusammen:

2 μ l gDNA Wipeout Buffer

500 ng RNA

RNase freies H₂O, um auf 11 μ l Gesamtvolumen zu kommen

Dieser wurde für 2 min bei 42 °C inkubiert und sofort wieder auf Eis überführt. Es folgte die eigentliche cDNA-Synthese mit folgendem Ansatz:

11 µl Gesamtvolumen aus Schritt I
1 µl RT *Primer Mix*
4 µl Quantiscript RT Buffer (5x)
1 µl Quantiscript Reverse Transcriptase
3 µl externe AraB RNA (50 pg/µl)

Dieser Ansatz wurde für 1 h bei 42 °C inkubiert und dann für 3 min bei 95 °C deaktiviert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels NanoDrop und die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.6.4. Quantitative *real time* PCR (*qPCR*)

Die *qPCR* wurde mittels dem StepOne real-time PCR System durchgeführt. Die Quantifizierung basierte auf der *SYBR green* Fluoreszenz nach jedem Zyklus. Es wurden je Zielgen *Triplets* mit einem Volumen von 10 µl angefertigt und pro Zielgen wurde ein *qPCR* Mastermix angesetzt, wobei hier der Ansatz mit n = 1 beschrieben ist.

3,8 µl H₂O
5,0 µl *SYBR Green PCR Mastermix* (2x)
0,1 µl *Primer 1* (1:10 verdünnt = 10 µM)
0,1 µl *Primer 2* (1:10 verdünnt = 10 µM)

9 µl Gesamtvolumen *qPCR Mastermix*

Es wurde 1 µl cDNA (c= 200 ng/µl) in jedes *well* einer *Micro Amp 96-well* Platte pipettiert und dann 9 µl Mastermix hinzugegeben und anschließend wurde die 96-*well*-Platte 3 min bei 1000 rpm abzentrifugiert. Die *qPCR* wurde mit folgenden Parametern durchgeführt: 10 min bei 95 °C, danach 40 Zyklen mit 15 s 95 °C, 30 s 55 °C und 60 s bei 60 °C. Im Anschluss daran wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Amplifikation eines einzelnen PCR Produktes zu überprüfen. Zur Bestimmung der *Primereffizienzen* wurden Standardkurven, mit einer Verdünnungsreihe der cDNA von 1:2 bis 1:128, erstellt.

Die Bestimmung der Ct-Werte und die Auswertung der Schmelzkurvenanalyse erfolgte mittels der StepOne Software, die weitere relative Quantifizierung erfolgte mittels Microsoft Excel.

Die relativen Expressionslevel der Gene wurden auf den Ct-Wert des externen AraB Standards (% von AraB) normiert, wobei die *Primereffizienzen* bei der Analyse mit einbezogen worden sind.

Die Daten wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung angegeben.

3. ERGEBNISSE

3.1. Entwicklung der APEX2-Fusionskonstrukute zur intrakompartimentären Biotinylierung und Aufreinigung des dort lokalisierten Proteoms

Es wurde ein Verfahren etabliert, das eine Kompartiment-spezifische Biotinylierung mit anschließender Aufreinigung und Proteomanalyse von Ionenkanälen und Interaktionspartnern erlaubt (Hung et al. 2016). Dazu wurde eine künstlich konstruierte Peroxidase (APEX2) durch Fusion mit spezifischen Signalsequenzen in einzelne Kompartimente geschleust und lokal aktiviert. Danach fand entweder eine immunzytochemische Färbung oder eine Aufreinigung mittels Streptavidinbeschichteten *beads* statt. Diese reinigen selektiv biotinylierte Proteine auf, ähnlich einer Immunpräzipitation.

3.1.1. Klonierungen

Die APEX-Fusionskonstrukte wurden kloniert, die mit hoher Spezifität in das ER, den Golgi-Komplex, das ERC oder die Zellmembran transportiert werden (siehe Tabelle 16). Die Verifizierung der erfolgreichen Klonierung auf DNA-Ebene erfolgte mittels Restriktionsverdau und Agarosegelelektrophorese. Des Weiteren wurde die aufgereinigte DNA per Sequenzierung überprüft. Mittels der Agarosegelelektrophorese konnte eine richtige Anzahl, sowie passende Größe der Stücke gezeigt werden, siehe Abb. 3.

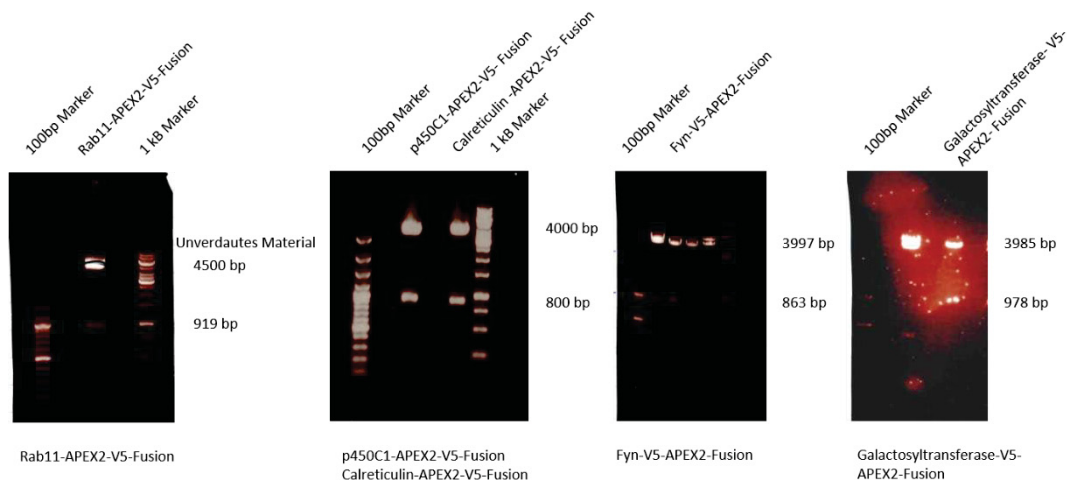


Abb. 3: Erfolgreiche Klonierung der APEX2-Fusionsproteine

Agarose-Gelelektrophorese in 1%igem Agarosegel der Klonierungsprodukte nach Restriktionsverdau. Zu sehen sind sowohl die jeweils erwartete Anzahl der Fragmente als auch die entsprechende Fragmentgröße, die rechts neben den Teilabbildungen dargestellt ist. (bp=Basenpaare)

3.1.2. Lokalisation der APEX2-Fusionsproteine in der Immunzytochemie

Im ersten Schritt sollte nun untersucht werden, ob die Fusionsproteine in das richtige subzelluläre Kompartiment sortiert werden. Durch die immunzytochemischen Färbung in HeLa-Zellen wurde dies analysiert. Dabei wurden die APEX2-Fusionsproteine mittels V5-Markierung und Anti-V5-Antikörper in Rot (Cy3) markiert und Markerproteine für die einzelnen subzellulären Kompartimente in Grün durch GFP-Markierung oder durch immunzytochemische Kofärbung mit AlexFluor 488. Eine Übersicht über die Markerproteine findet sich in Tabelle 20. Die Überlagerung der beiden Aufnahmen zeigt eine Kolokalisation der Färbungen (Abb. 4).

Tabelle 20: Auflistung der Markerproteine

APEX2-Fusionsprotein	Kompartiment	Markerprotein
Galtase-V5-APEX2	Golgi-Apparat	GM 130
Calreticulin-V5-APEX2	ER	Calnexin
Rab11-V5-APEX2	ERC	Ehd1 /Rme1
Fyn-V5-APEX2	Zellmembran	Kv4.2
V5-APEX2-Fyn	Zellmembran	Kv4.2

Fusionsproteine für den Golgi-Apparat (Galactosyl-Transferase-V5-APEX2), das ER (Calreticulin-V5-APEX2-KDEL bzw. p450-V5-APEX2-KDEL) und die Zellmembran (Fyn-V5-KDEL) zeigen eine Kolokalisation in der Färbung und somit kann von einer kompartimentspezifischen Lokalisation der erstellten Konstrukte

ausgegangen werden. Das Fusionsprotein V5-APEX2-Fyn ließ sich in der immunzytochemischen Färbung kaum darstellen und wird daher nicht abgebildet.

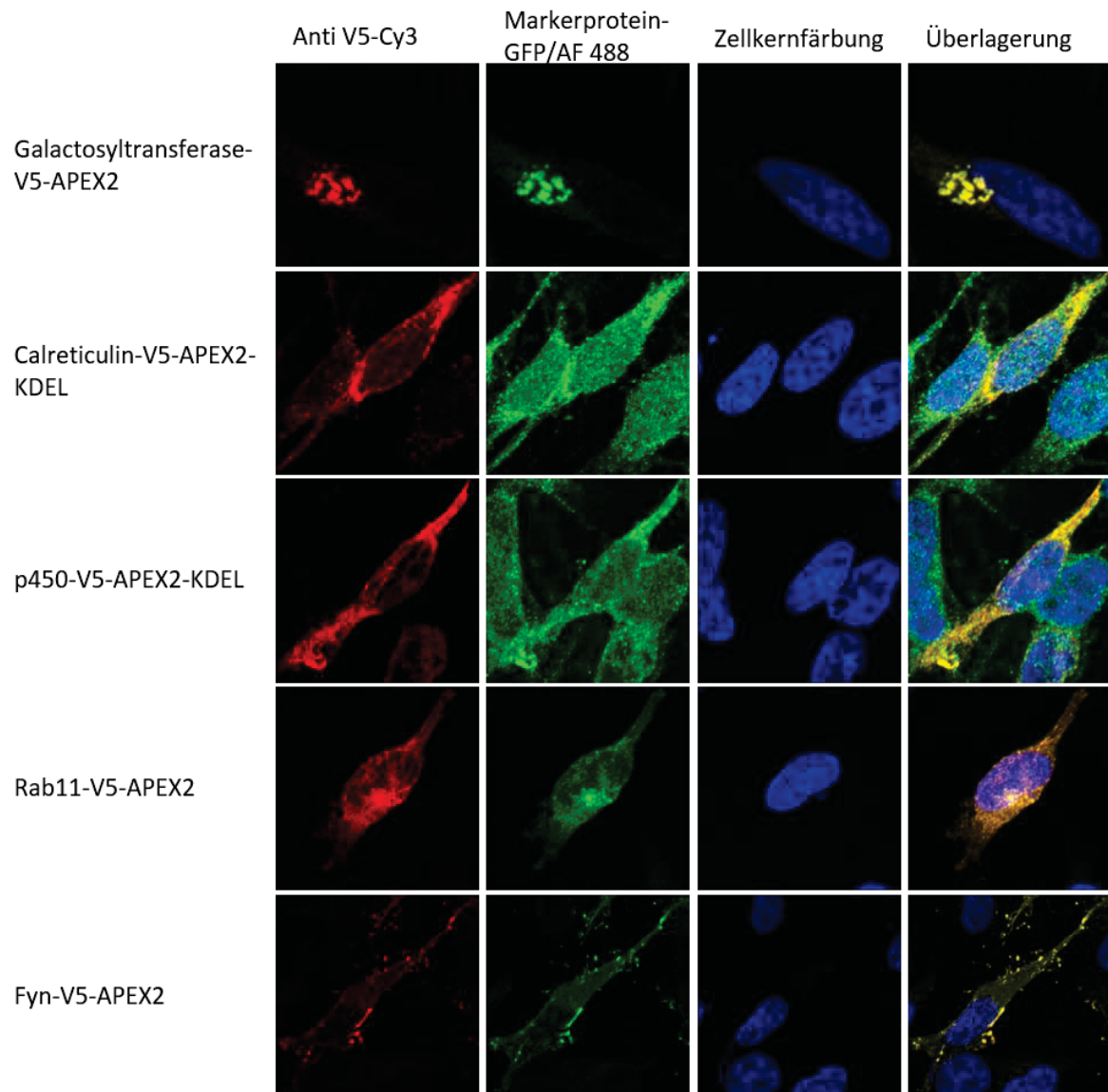
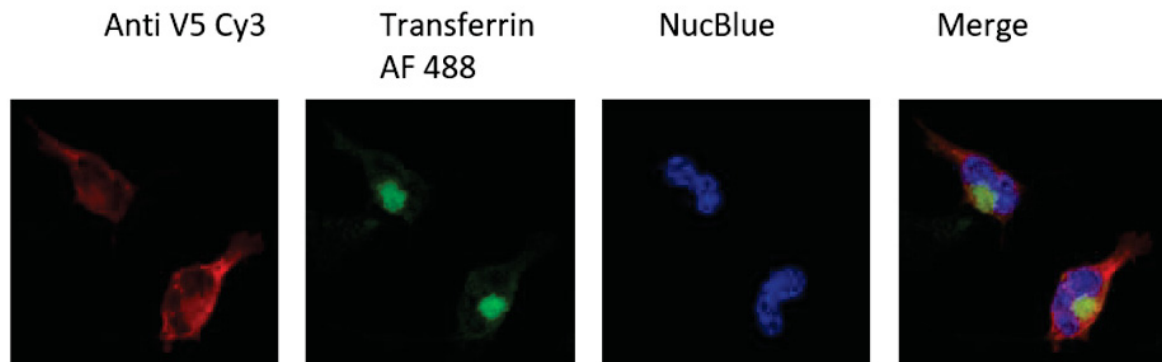


Abb. 4: Subzelluläre Verteilung der APEX2-Fusionsproteine in Relation zu Markerproteinen
 Repräsentative konfokale Z-Stacks der indizierten immunzytochemischen Färbungen der verschiedenen APEX2-Fusionsproteine in HeLa Zellen transduziert mit verschiedenen Markerproteinen. HeLa-Zellen wurden mit APEX2-Fusionskonstrukten und Markerproteinen transduziert und anschließend immunogefärbt. Die Proben transduziert mit Rab11-V5-APEX2 wurden mit Transferrin AF488 zur ERC-Darstellung behandelt. Die APEX2-Fusionsproteine werden jeweils mit V5-Antikörper und Cy3 in Rot dargestellt. Die entsprechenden Markerproteine in Grün, entweder durch GFP-Fusion oder durch AF488. In Blau ist der Zellkern dargestellt. Die typische Morphologie der Zellorganellen und die Überlagerung mit den Markerproteinen zeigt eine kompartimentspezifische Lokalisation.

Das Rab11-Konstrukt zeigt eine Übereinstimmung mit dem Transferrin AF488, allerdings ist diese nicht spezifisch für das ERC (Abb. 4). Um das ERC für die Fär-

bung besser darzustellen, wurde es in einem weiteren Versuch zuvor mit HCN-Kanälen befüllt. Dies erfolgte durch eine Kotransfektion von humanem HCN4-Kanal und cDNA der Fusionskonstrukte. Auch nach Befüllen der Vesikel des ERC mit HCN4 zeigt sich eine unspezifische Verteilung des Rab11-Fusionsproteins (Abb. 5).

Rab11-V5-APEX2 mit HCN4 befüllt



Rab11-V5-APEX2 ohne HCN4-Befüllung

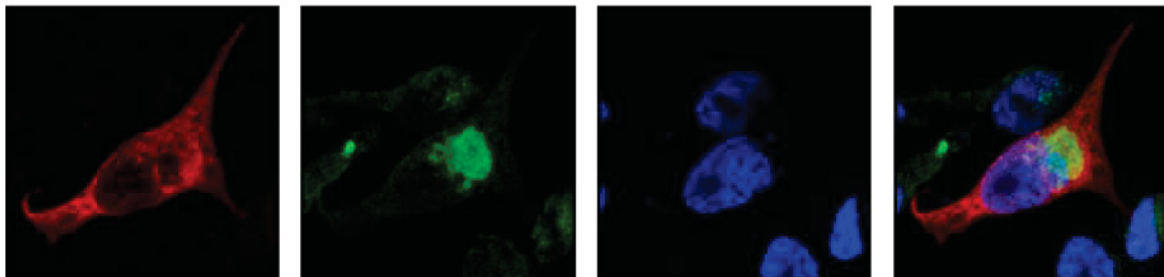


Abb. 5: Rab11-V5-APEX2-Fusionsprotein in Relation zu AF488-markiertem Transferrin

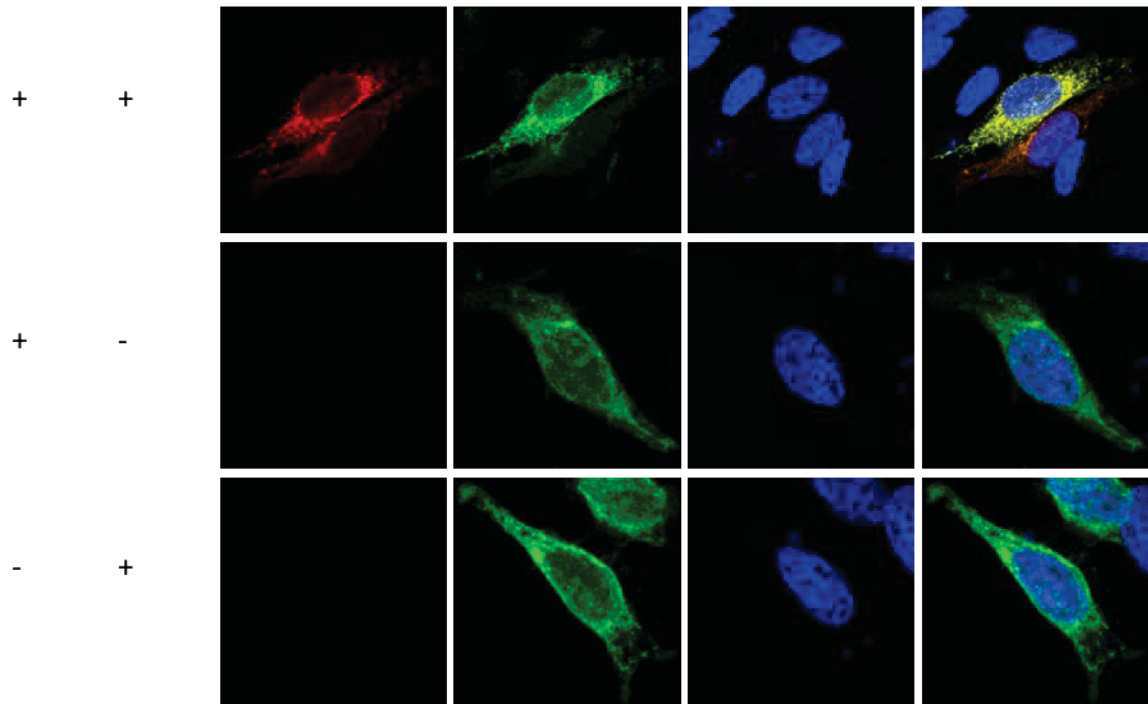
Konfokale Z-Stacks von HeLa Zellen mit und ohne Kotransfektion mit humanem HCN4-Kanal. Rab11-V5-APEX2-Protein wurde mit *V5-Tag* in Rot dargestellt und in Relation zu Transferrin AF488 in Grün gesetzt. In der oberen Zeile diente die Kotransfektion mit humanem HCN4-Kanal der Befüllung des ERC und dadurch sollte dieses deutlicher abgrenzbar sein. Die untere Zeile zeigt zum Vergleich eine HeLa-Zelle ohne HCN4-Kotransfektion. Trotz gut ausgebildetem ERC, wie das Transferrin zeigt, gibt es keine eindeutige Überlagerung mit dem Rab11-V5-APEX2.

3.1.3. Charakterisierung der APEX2-Biotinylierung durch immunzytochemische Färbung

Nach erfolgreicher Klonierung, sowie kompartimentspezifischer Darstellung der Fusionsproteine erfolgte die Darstellung der BP- und H₂O₂-abhängigen Biotinylierung der APEX2-Fusionsproteine in der Immunzytochemie. Dafür wurden die Zellen wie in Kapitel 2.4.1 beschrieben präpariert und jeweils zwei Negativkontrollen, mit Auslass von H₂O₂ bzw. BP angefertigt (

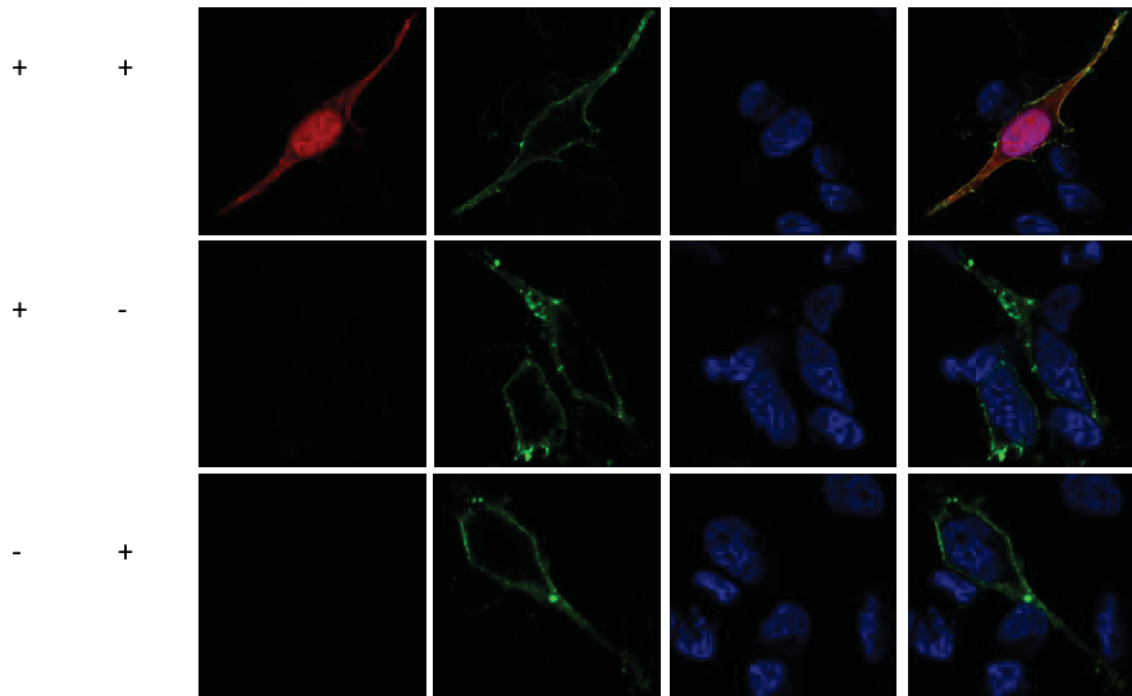
Abb. 6). In den Negativkontrollen gibt es aufgrund von fehlendem Substrat bzw. fehlender Peroxidase keine Bildung von biotinylierten Proteinen und daher auch keine Darstellung von Proteinen. In Grün ist das jeweilige APEX2-Fusionsprotein abgebildet, in Blau der Zellkern. Die Zellen transduziert mit Galactosyltransferase-V5-APEX2, Calreticulin-V5-APEX2-KDEL und p450-V5-APEX2-KDEL zeigen eine Überlagerung der APEX2-Fusionsproteine mit den biotinylierten Proteinen. Bei dem Fyn-V5-APEX2-Fusionsprotein finden sich biotinylierte Proteine im gesamten Intrazellularraum verteilt. Die Rab11-V5-APEX2- transduzierten Proteine sind inhomogen in den drei Versuchsreihen exprimiert und die Verteilung der biotinylierten Proteine erstreckt sich weitestgehend über den gesamten Intrazellularraum.

BP H₂O₂

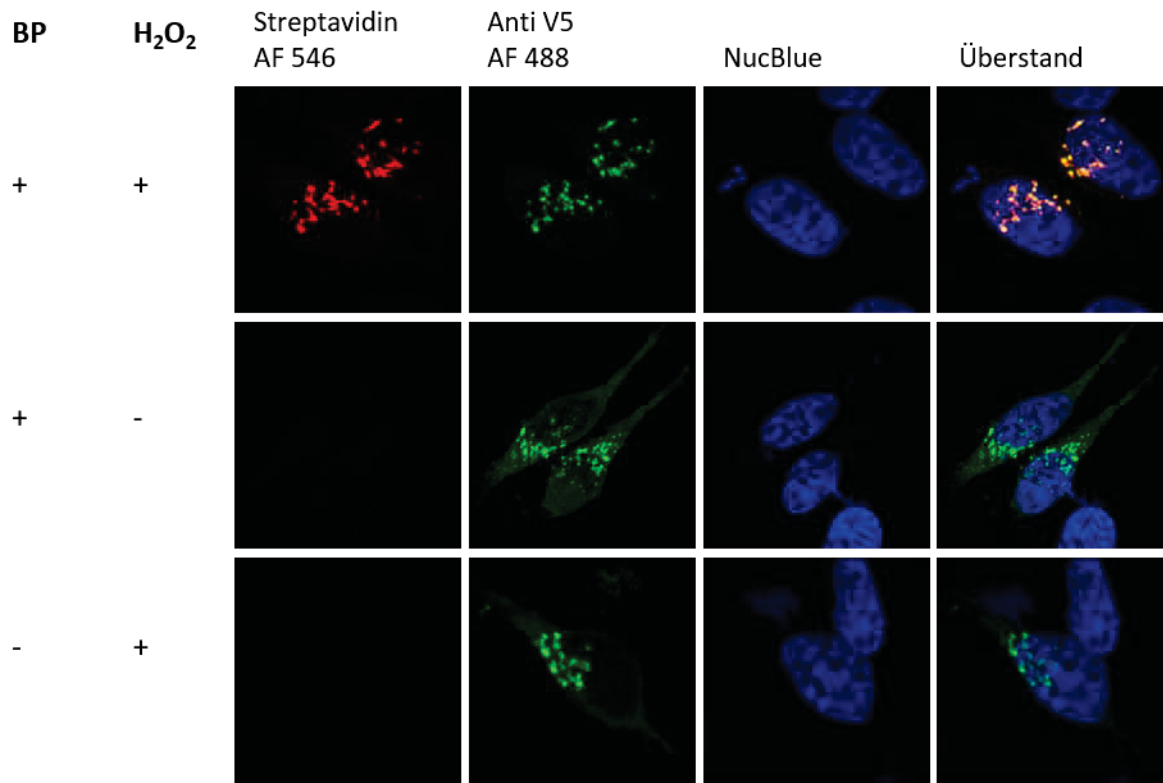


Calreticulin-V5-APEX2

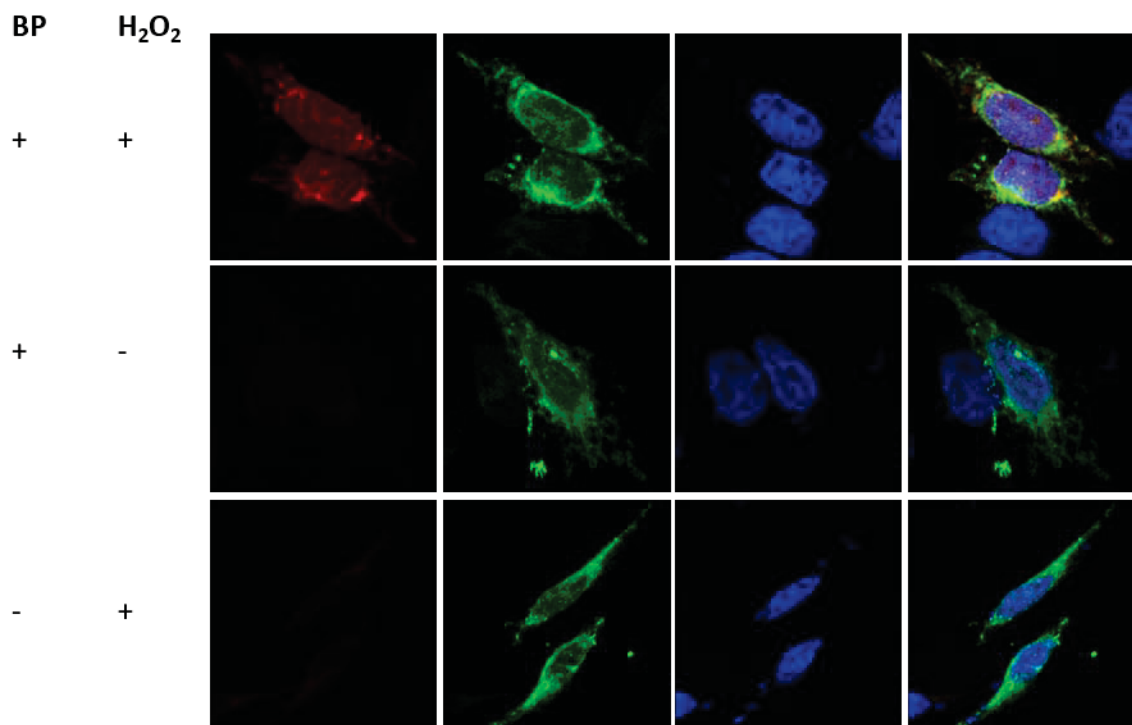
BP H₂O₂



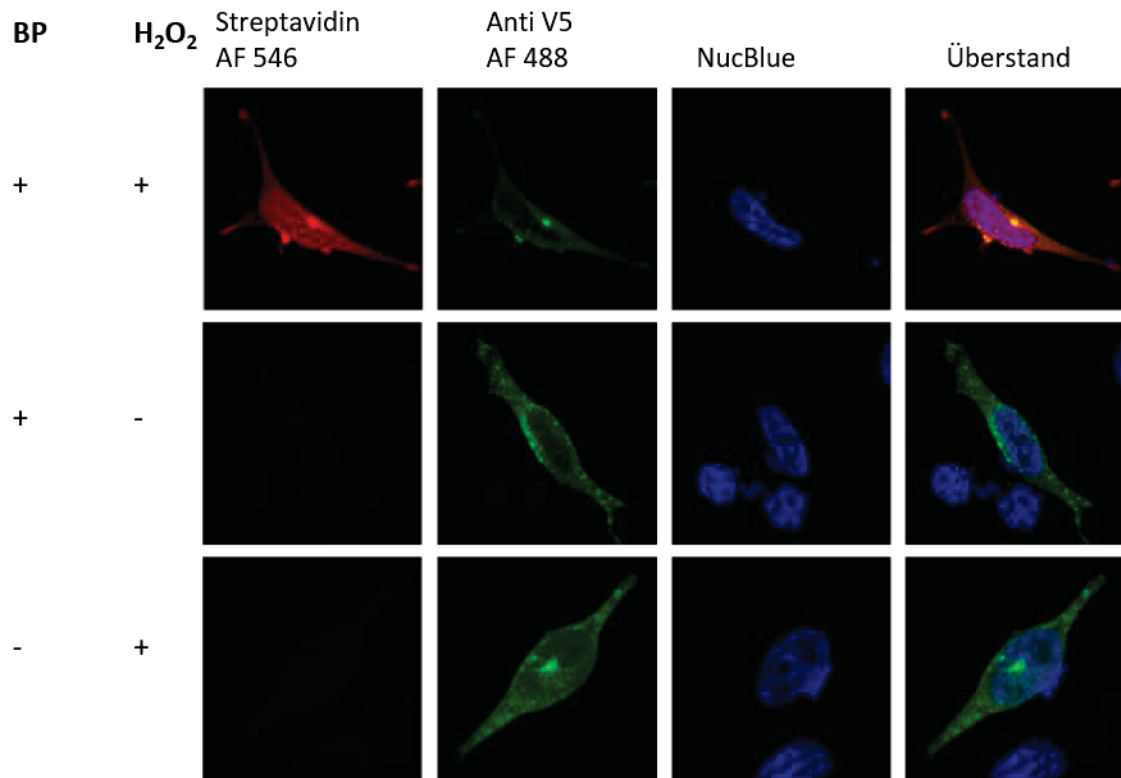
Fyn-V5-APEX2



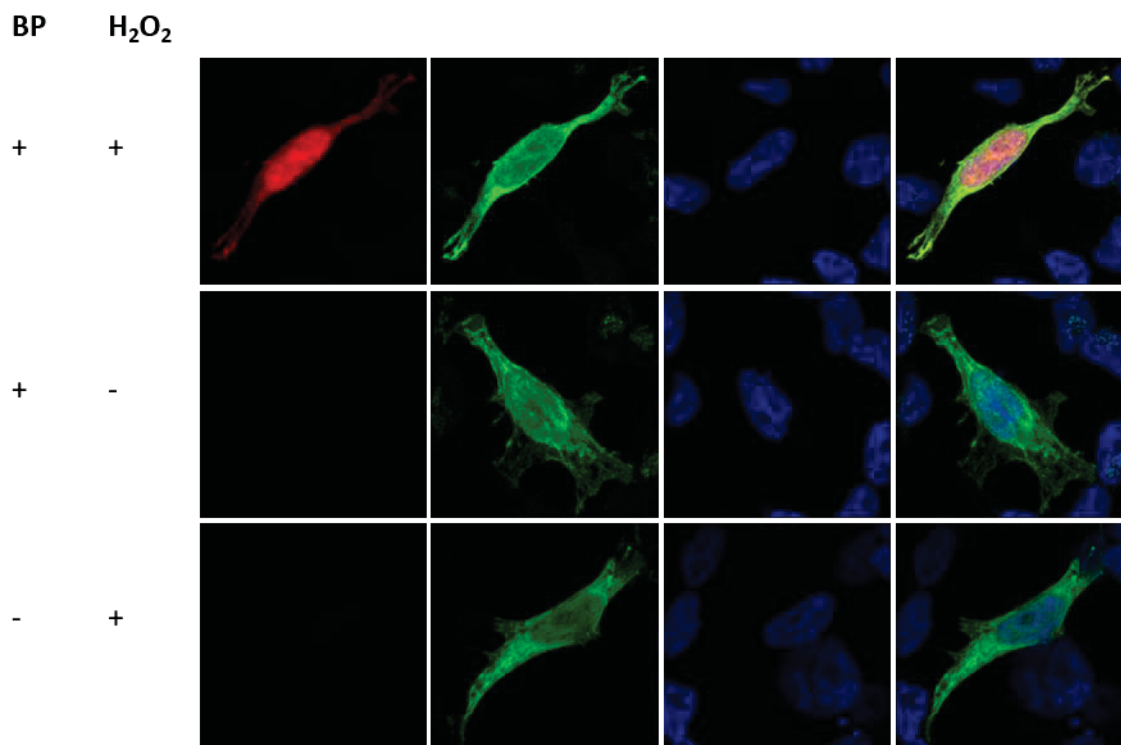
Galactosyltransferase-V5-APEX2



p450-V5-APEX2



Rab11-V5-APEX2



V5-Fyn-APEX2

Abb. 6: Konfokale Darstellung der APEX2-abhängigen Biotinylierung in HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden mit APEX2-Fusionskonstrukten transduziert und lebend nach in Kapitel 2.4.1 beschriebenen Protokoll behandelt. Parallel dazu wurden Negativkontrollen, die BP bzw H₂O₂ ausließen, durchgeführt. Nach Fixierung wurden die Zellen mit Streptavidin AlexaFluor 546, um die biotinylierten Proteine in Rot darzustellen und mit Anti-V5-Antikörper und Alexa Fluor 488, um die APEX2-Fusionsproteine in grün darzustellen, gefärbt. Der Zellkern ist in Blau gezeigt. Die jeweilig obere Bilderzeile zeigt, dass die APEX2 nur in Anwesenheit von BP und H₂O₂ biotinyliert, da nur dort biotinylierte Proteine nachgewiesen werden. In den Abbildungen für die Galactosyltransferase-V5-APEX2, Calreticulin-V5-APEX2, p450-V5-APEX2 sowie Fyn-V5-APEX2 zeigt sich zudem eine Anreicherung der Fusionsproteine in typischer Kompartimentmorphologie, welche bei den übrigen Fusionsproteinen nicht gegeben ist.

3.1.4. Biochemischer Nachweis der Biotinylierungsreaktion

In Ergänzung zur Immunzytochemie konnten die APEX2-Fusionsproteine und die H₂O₂- und BP-abhängige Biotinylierung auch im Western Blot gezeigt werden.

Mittels V5-Tags konnte eine homogene APEX2-Expression in den Proben gezeigt werden (Abb. 7).

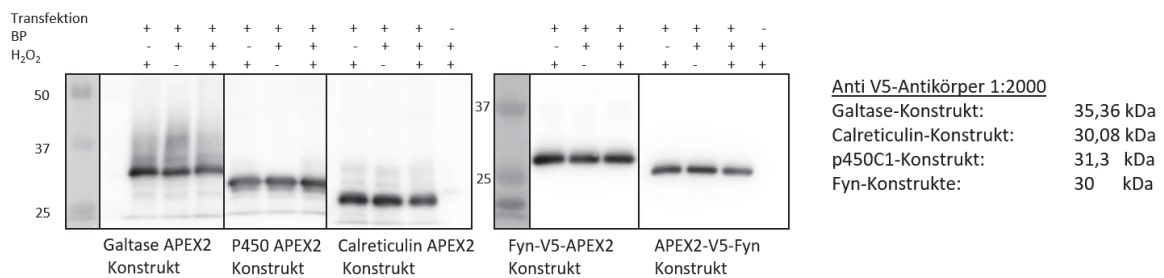


Abb. 7: Homogene Expression der Fusionsproteine

Dargestellt ist ein Immunoblot mit Nachweis der indizierten Proteine in Lysaten von HeLa-Zellen, transduziert mit den jeweiligen APEX2-Fusionskonstrukten. Die Zellen wurden präpariert wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben, die Zelllysate per SDS aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und durch Inkubation mit Anti-V5-Antikörper die APEX2-Fusionsproteine dargestellt. Der Legende an der rechten Seite können die erwarteten Größen entnommen werden. Es zeigt sich eine homogene Expression der APEX2-Fusionsproteine.

Die Positivkontrolle, wo neben der Transfektion auch BP und H₂O₂ vorhanden war, zeigt bei allen Fusionsproteinen viele Banden. Dies deutet auf eine Biotinylierung von allen Proteinen im spezifischen Kompartiment hin. Die Banden in den Negativkontrollen bei 72, 75 und 150 kDa entsprechen endogen biotinylierten Proteinen. Abb. 8 zeigt den biochemischen Nachweis der APEX2 im Westernblot.

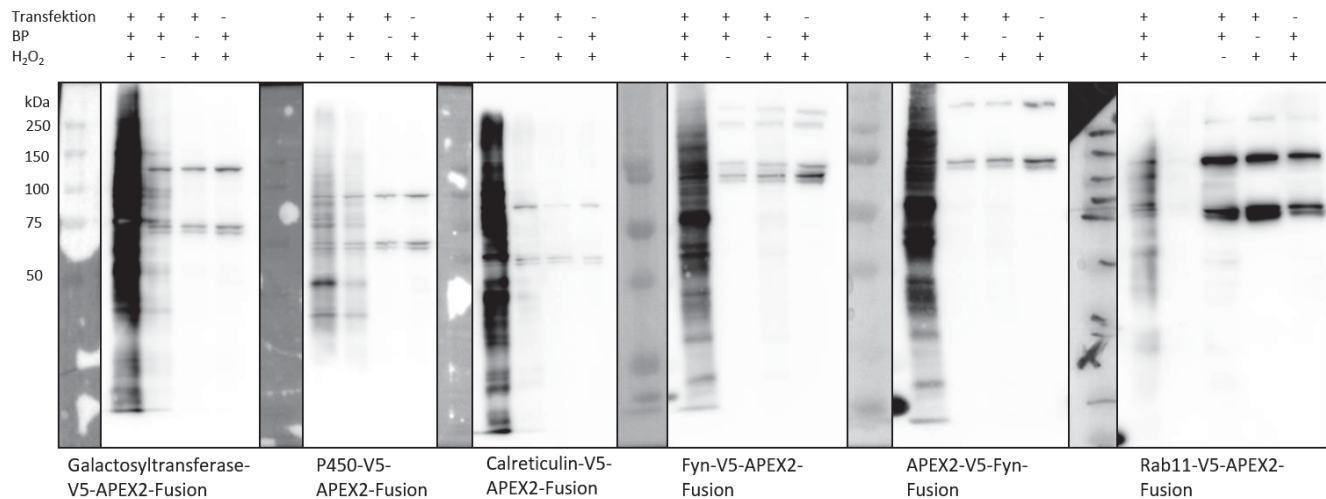


Abb. 8: Darstellung der APEX2-abhängigen Biotinylierung mittels SDS und Streptavidin-blotting

Zellen wurden wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben behandelt und mittels SDS in einem 10% igen Gel aufgetrennt. Durch anschließendes *Blotting* und Inkubation mit Streptavidin-HRP konnten die biotinylierten Proteine sichtbar gemacht werden. Die erste Spur zeigt eine Spannbreite an biotinylierten Proteinen aus Zellen, die mit BP und H₂O₂ behandelt wurden, in den Spuren 2-4 des jeweiligen APEX2-Fusionsproteins sind die Negativkontrollen, bei denen entweder BP, H₂O₂ oder die Transfektion ausgelassen wurde dargestellt. Die Banden der Höhe 72, 75 und 150 kDa in den Negativkontrollen entsprechen endogen biotinylierten Proteinen.

3.1.5. Kompartimentspezifische Lokalisation im Western Blot

Die oben beschriebenen Experimente zeigten auf immunzytochemischer Ebene eine kompartimentspezifische Biotinylierung sowie auf proteinchemischer Ebene eine homogene Expression der APEX2-Fusionsproteine und deren H₂O₂- und BP-abhängige Aktivierung. Die Analyse der Kompartimente soll nach der Biotinylierung mit nachfolgender Aufreinigung durch Streptavidin-beschichtete *beads* erfolgen. Vor erfolgreichem Abschluss der Etablierung sollte ein Nachweis erbracht werden, dass nur das Kompartiment von Interesse eluiert wird und keine Verunreinigung durch andere Zellorganellen erfolgt ist.

Dieser Nachweis erfolgte mit drei unterschiedlichen Methoden (s. Kap. 3.1.5.1 ff)

3.1.5.1. Identifizierung subzellulärer Kompartimente mit Hilfe von endogenen Markerproteinen

Die Zellen wurden zunächst wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben behandelt und präzipitiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels SDS und nach Übertragung auf eine Nitrocellulosemembran mittels Westernblot konnten diese durch Antikörperbindung und darauffolgender Lumineszenzreaktion dargestellt werden. Dabei wurden für jedes Fusionsprotein das Lysat, in der das endogene Markerprotein für

das Kompartiment enthalten sein soll, ein Überstand, in der das endogene Markerprotein nicht vorhanden sein sollte sowie ein Eluat in dem das Markerprotein angereichert sein sollte, aufgetragen. In den Spuren der anderen Fusionsproteine sollte dieses Markerprotein dann nur in Lysat und Überstand detektierbar sein. Die endogenen Markerproteine finden sich in Tabelle 20.

Das Galtase-V5-APEX2-Fusionsprotein, das Golgi-spezifisch sein sollte, wurde mittels Biotinylierung und Streptavidin *beads* aufgereinigt und in den entsprechenden Western Blots neben den spezifischen Antikörpern auch mit Antikörpern gegen Ehd1, und Calnexin inkubiert. Ehd1 findet sich vorwiegend im ERC und Calnexin im ER. Der Nachweis der kompartimentspezifischen Aufreinigung konnte nicht erbracht werden, denn wie in Abb. 9 zu erkennen ist, kann das entsprechende Markerprotein nur jeweils im Lysat und der Überstandsfraktion nachgewiesen werden, jedoch nicht im Eluat. Das gleiche gilt auch für die Negativkontrollen.

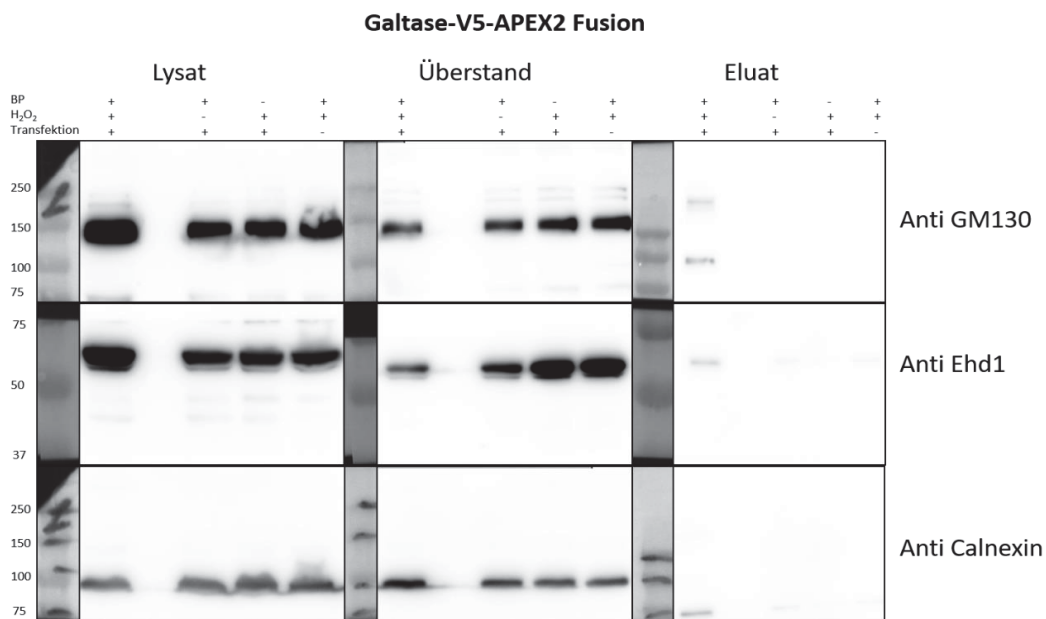


Abb. 9: Mangelnde Detektion der indizierten Kompartiment-Markerproteine in Galactosyltransferase-V5-APEX2 transfizierten Zellen nach Aufreinigung mittels Streptavidinbeschichteten *beads*.

Repräsentative Western Blots der Aufreinigung von Galtase-V5-APEX2-transfizierten Zellen, den entsprechenden Negativkontrollen und Fraktionen. Nach Transfektion und Aufreinigung erfolgte die Auftrennung der Proteine durch 10% iges SDS-Gel und Blotting. Inkubiert wurden die Blots mit drei verschiedenen Antikörpern, die jeweils ein Markerprotein von Golgi-Apparat, ER und ERC detektieren. Die Lysate zeigen eine homogene Expression des Golgi-Markers GM130 (130 kDa), des ERC-Markers Ehd1 (60 kDa) und des ER-Markers Calnexin (98 kDa) in den Lysaten. In den Überständen sind alle Markerproteine nachweisbar mit geringer Abnahme in den Positivkontrollen und keiner Expressionsveränderung in den Überständen. In den Eluaten lässt sich keines der endogenen Markerproteine nachweisen.

3.1.5.2. *Ausschluss einer Epitopveränderung durch die Biotinylierung*

Es konnten keine endogenen Markerproteine in den Eluaten der Aufreinigung detektiert werden. Um auszuschließen, dass die zuvor erfolgende Biotinylierung die Konformation des Antikörper-Epitops verändert und somit die Antikörper für die Aufreinigung nicht mehr binden können, wurden folgende Experimente abgeschlossen: Die cDNA des AMPA-Rezeptors mit den cDNAs der Fusionskonstrukte wurde kotransfiziert und der Versuch wie in 2.5.1 durchgeführt. Zwei verschiedene Antikörper wurden verwendet, einen, der die extrazelluläre Sequenz des Rezeptors detektiert, der andere der die intrazelluläre Sequenz detektiert. Die extrazelluläre Sequenz liegt während der Prozessierung intrakompartimentär. Da der Rezeptor sowohl eine zytoplasmatische als auch eine intrakompartimentäre Komponente hat, kann er von beiden Seiten aus detektiert werden. Sollte die intrakompartimentäre Bindungsstelle durch die Biotinylierungsreaktion eine Konformationsänderung des Epitops durchlaufen haben, kann dieser Antikörper nicht binden. Der Antikörper der zytoplasmatischen Seite sollte allerdings weiterhin nachweisbar sein. In der Negativkontrolle sind HeLa-Zellen mit dem GluA1 transfiziert und es erfolgte eine Kotransfektion von GluA1 mit den Fusionsproteinen für Golgi, ER und ERC (Abb. 10). Die Rezeptorexpression in den Lysaten ist nicht homogen. In den Überständen der Negativkontrolle und der Kotransfektion mit dem Rab11-V5-APEX2-Fusionsprotein konnte der Rezeptor nachgewiesen werden, in den anderen Überständen nicht. Diese wurden, wie die Eluatsfraktion von Calreticulin-V5-APEX2-KDEL und Galactosyltransferase-V5-APEX2 zeigen, aufgereinigt. Die Negativkontrolle zeigt keine Spuren einer Aufreinigung und das ERC-Fusionsprotein hat nur eine schwache Bande. Unterschiede der beiden Antikörper sind bis auf die Stärke der Banden nicht zu erkennen.

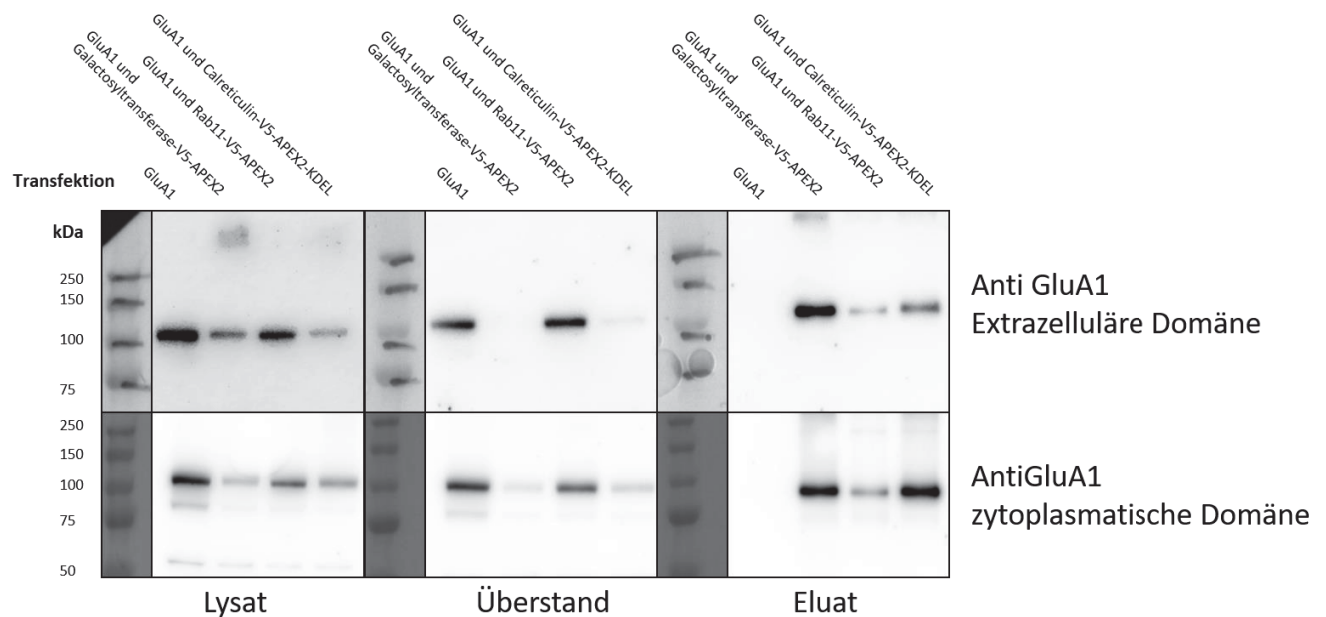


Abb. 10: Darstellung der Aufreinigung des AMPA-Rezeptors durch APEX2-Fusionsproteine mit Nachweis von intra- und extrazellulärem Anteil des GluA1-Rezeptors

Es erfolgte eine Kotransduktion des GluA1-Rezeptors mit den jeweiligen APEX2-Fusionsproteinen und anschließender Aufreinigung nach oben beschriebem Protokoll. Die Auftrennung erfolgte in 10% igem SDS-Gel und die Darstellung mittels Western Blot und Inkubation der GluA1-Antikörper für extrazelluläre und zytoplasmatische Domäne. Die Expression des GluA1-Rezeptors (100 kDa) schwankt, wie die Lysatspuren zeigen. Überstand und Eluat zeigen eine Aufreinigung des GluA1-Rezeptors aus Golgi-Apparat und ER, da in den entsprechenden Spuren der Rezeptor im Überstand ab- und im Eluat angereichert ist. Die Negativkontrolle ohne APEX2-Fusionsprotein zeigt keine Aufreinigung.

Es zeigen sich weiterhin nur marginale Unterschiede in der Auswertung der Antikörper. Sowohl der GluA1-Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne als auch der Antikörper gegen die zytoplasmatische Domäne detektieren den Rezeptor.

Es wurde weiterhin überprüft, ob die Epitope, die von den Antikörpern detektiert werden, die Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan, Cystein und Histidin enthalten. Diese werden durch die APEX2 biotinyliert. Im Epitop des Anti-GM130- Antikörper befindet sich ein Tryptophan, im Epitop des Anti-Ehd1- Antikörper dagegen keine dieser „kritischen“ Aminosäuren. Diese Informationen wurden in dieser Form von der Firma *abcam* zur Verfügung gestellt, die genauen Sequenzen der Epitope wurden aus urheberrechtlichen Gründen nicht übermittelt.

3.1.5.3. Nachweis exogener Markerproteine: transduzierte Ionenkanalmutationen mit Retention in ER, ERC, Golgi und an der Zellmembran

Als weitere Option zum Nachweis der kompartimentspezifischen Aufreinigung wurden mutierte Ionenkanäle, die in ER, ERC, Golgi oder an der Zellmembran retiniert werden, mit den APEX2-Fusionskonstrukten kotransfiziert. Dadurch erwei-

tert sich das Spektrum der Markerproteine von den endogenen auf transduzierte Proteine. Mittels Literaturrecherche wurden Ionenkanäle, die in gewissen Kompartimenten retinieren ausgewählt (Tabelle 21).

Tabelle 21: Ionenkanäle mit Mutationen, die im jeweiligen Kompartiment retinieren

Ionenkanal	Lokalisation	Quelle	Antikörper
Kv4.2	Plasmamembran	(Moise et al. 2010)	Anti GFP
CD4KKXX	ER	(Shikano und Li 2003)	Anti CD4
Kir 2.1 E377/379A	ER	(Stockklausner et al. 2001; Stockklausner und Klocker 2003)	Anti GFP
Kir 2.1 Δ 1- 76	Golgi	(Stockklausner et al. 2001; Stockklausner und Klocker 2003)	Anti GFP

Golgi-Konstrukt

Zum Nachweis der Kompartimentspezifität der Galactosyltransferase-V5-APEX2, wurde die cDNA einer Deletionsmutante des Kir 2.1. Kanals kotransfiziert. Diese reichert sich im Golgi-Apparat an (siehe Tab., (Stockklausner et al. 2001; Stockklausner und Klocker 2003)). Bei Kotransfektionen mit den APEX2-Fusionsproteinen sollte sich die Kir-Deletionsmutante daher nur im Eluat der Golgi-spezifischen Galactosyltransferase-V5-APEX2 finden.

Der Kir-Kanal in allen Kotransfektionen wurde gleich exprimiert. Die Überstandsfraction weist in etwa die gleiche Menge Protein bei jedem Fusionsprotein nach, in den Eluaten ist der Kanal nicht aufgereinigt worden. Dies lässt auf eine mangelnde Aufreinigung des Ionenkanals schließen und weist keine Kompartimentspezifität der Golgi-spezifischen Galactosyltransferase-V5-APEX2 nach. (s. Abb. 11).

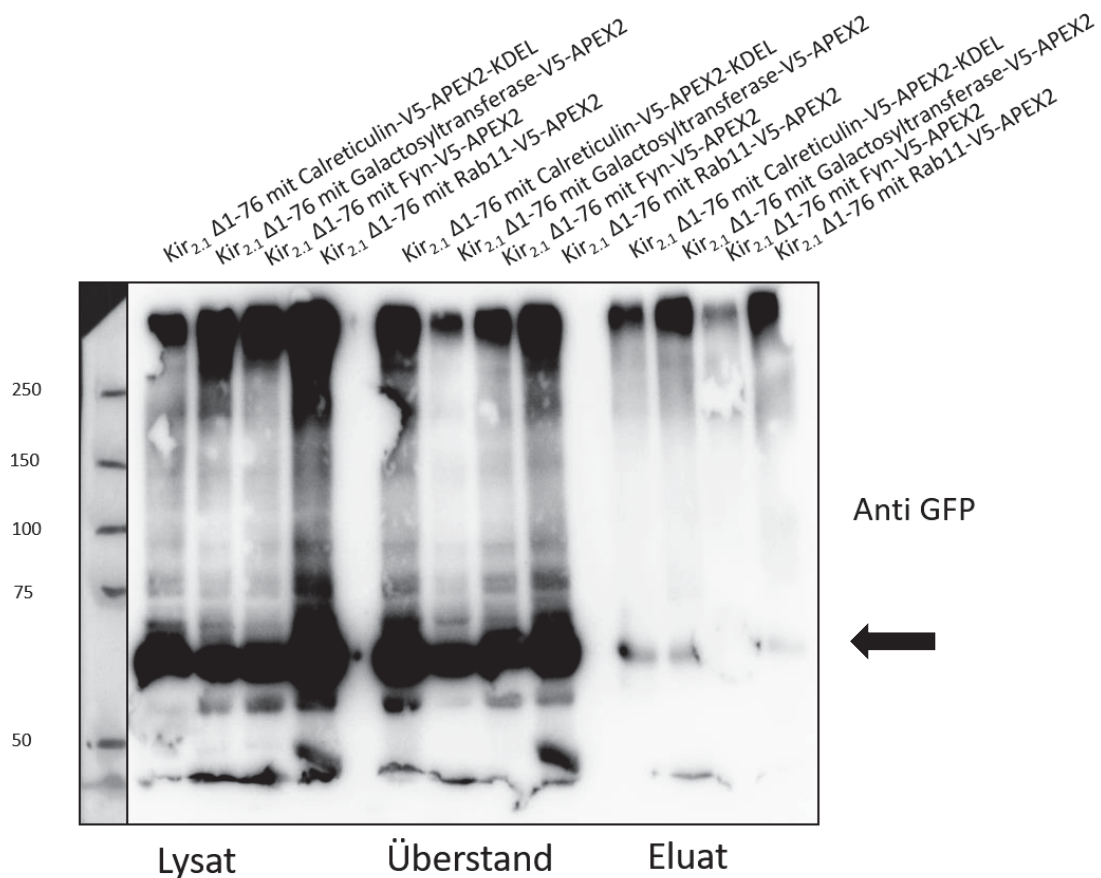


Abb. 11: Detektion der K_{ir} -Deletionsmutante im Western Blot nach Aufreinigung mit APEX2-Fusionsproteinen

HeLa-Zellen wurden kotransfiziert mit Kir 2.1 Δ 1-76 und APEX2-Fusionskonstrukten. Anschließend erfolgte die Aufreinigung, Auftrennung und Darstellung mittels Western Blot wie in Kapitel 2.5.1 und 2.5.2 beschrieben. Zum Nachweis der GFP-markierten Kir-Deletionsmutante wurde der Anti-GFP-Antikörper verwendet. Die Expression der K_{ir} -Kanal-Deletionsmutante (70 kDa) ist in allen vier Zellpopulationen gleichmäßig mit den APEX2-Fusionsproteinen exprimiert wie die Spuren der Ly-sate erkennen lassen. In der ERC-Fraktion ist die Expression erhöht. Die Überstände weisen in gleicher Menge den mutierten Ionenkanal nach, wohingegen in den Eluaten nur Spuren des Ionenkanals in der Fraktion der Golgi-spezifischen Galactosyltransferase-V5-APEX2 und der ER-spezifischen Calreticulin-V5-APEX2-KDEL nachzuweisen sind.

ER-Konstrukt

Als Markerprotein für das ER wurde sowohl CD4-KKXX als auch eine ER-Retentionsmutante des K_{ir} 2.1 Kanals (K_{ir} 2.1 E377/379A) verwendet. Es wurde analog zum Experiment der Golgi-Fusionsproteine vorgegangen. Bei der Verwendung des CD4-Antikörpers zeigten sich neben der spezifischen Bande bei 51 kDa, weitere unspezifische Banden, daher wurde von weiteren Versuchen mit diesem Antikörper abgesehen. In der Zellpopulation mit dem ER-spezifischen APEX2-Fusionsprotein Calreticulin-V5-APEX2-KDEL findet sich kein Kanal im Lysat, was auf einen Auftragsfehler schließen lässt. Die Überstände weisen die gesamte

Rezeptormenge aus dem Lysat auf, das Eluat keine CD4KKXX-Spuren, dies ist vereinbar mit einer fehlenden Aufreinigung der Rezeptoren durch die APEX2-Fusionsproteine.

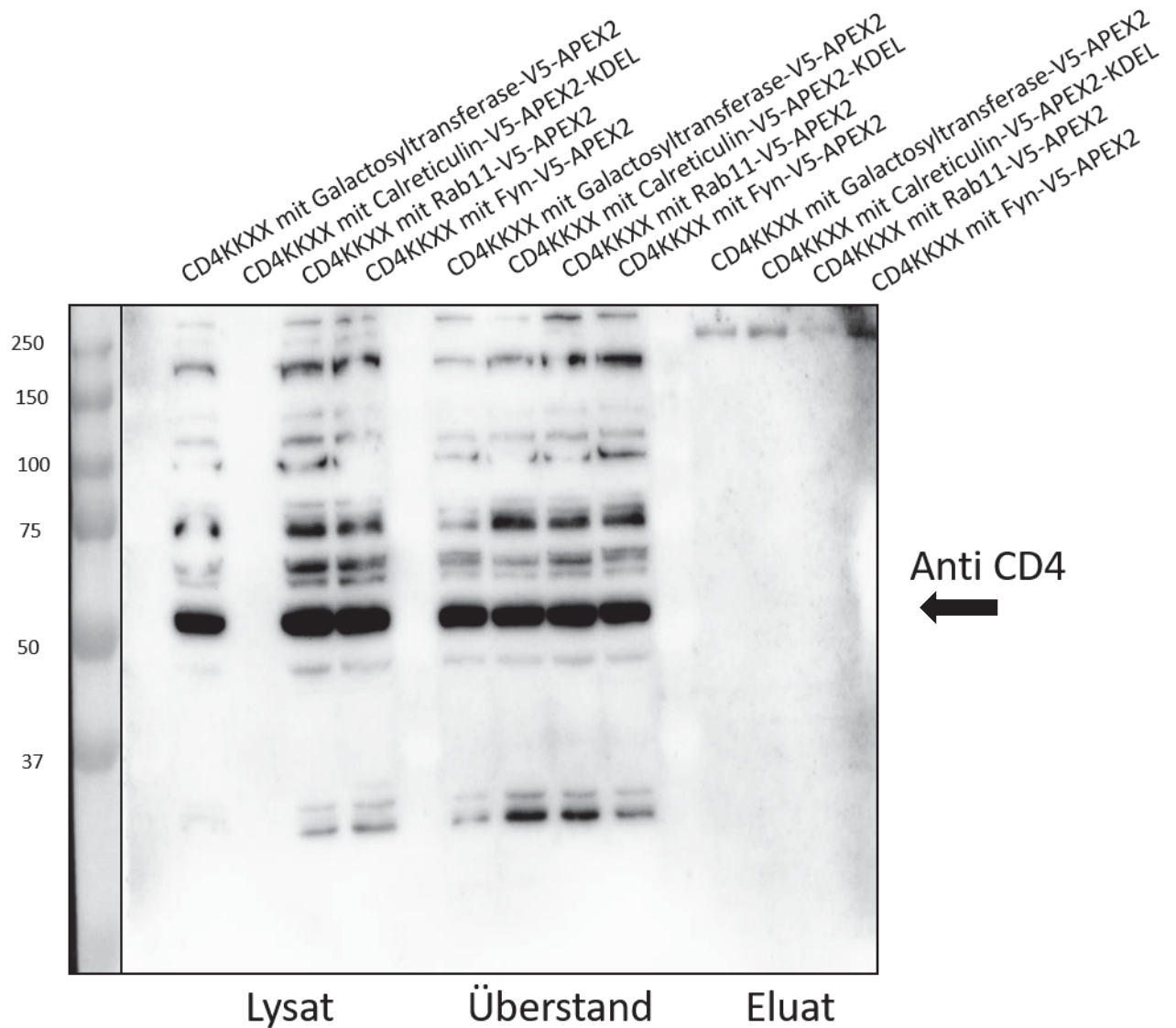


Abb. 12: Detektion des CD4KKXX-Rezeptors im Western Blot nach Aufreinigung mit APEX2-Fusionsproteinen

HeLa-Zellen wurden kotransfiziert mit CD4KKXX und APEX2-Fusionskonstrukten. Anschließend erfolgte die Aufreinigung, Auftrennung und Darstellung mittels Western Blot wie in Kapitel 2.5.1 und 2.5.2 beschrieben. Zum Nachweis wurde der Anti-CD4-Antikörper verwendet (51 kDa). Neben den spezifischen Banden in Lysat und Überständen zeigen sich weitere unspezifische Banden, die auch im Antikörper-Test auftauchen (Daten nicht gezeigt), weswegen von einer weiteren Nutzung mit diesem Antikörper abgesehen wurde. Die fehlenden Banden in der Lysatspur der Calreticulin-V5-APEX2-KDEL lassen sich auf einen Auftragsfehler zurückführen. Die übrigen Lysatspuren zeigen eine homogene Expression des Rezeptors, die sich in gleicher Intensität auch in den Überständen zeigt.

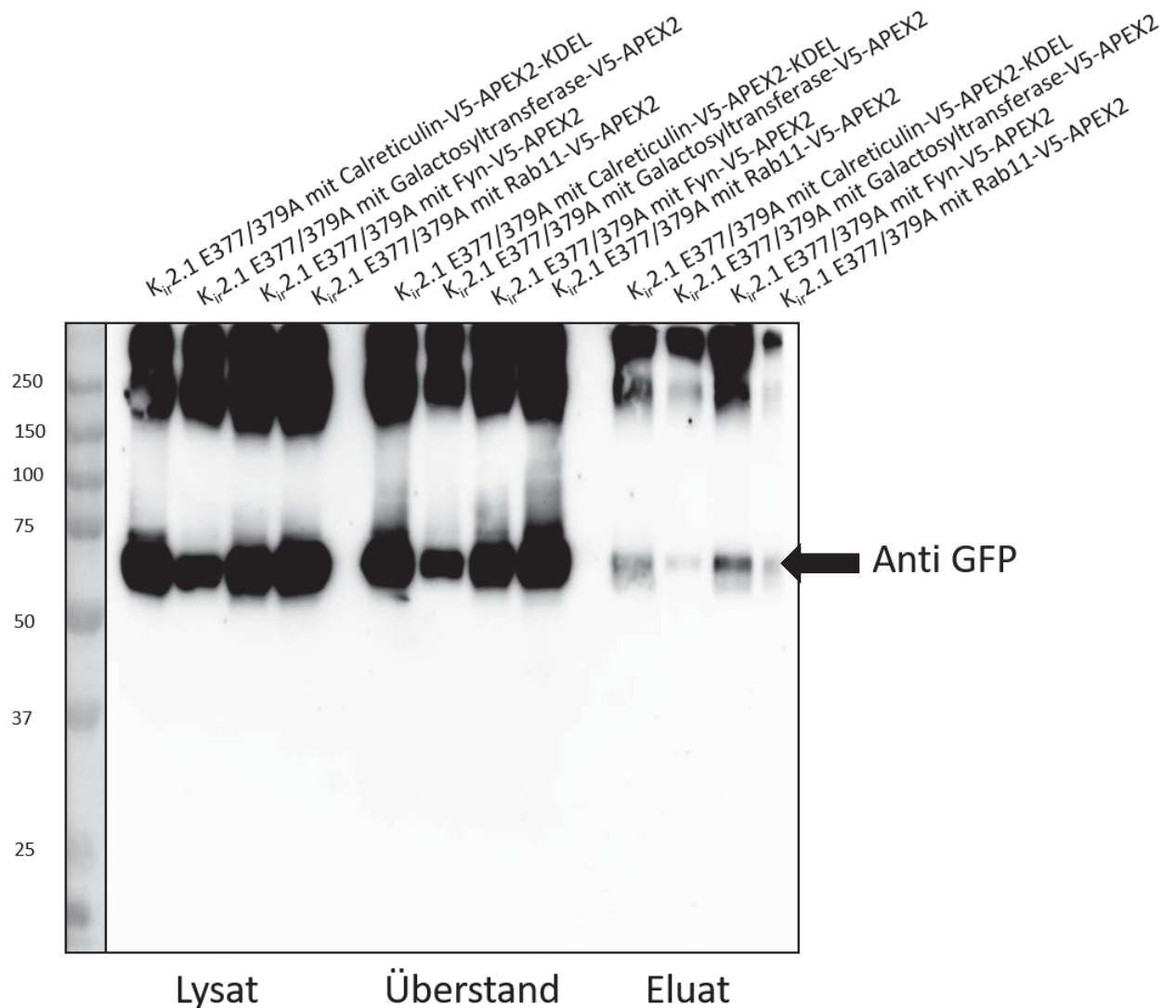


Abb. 13: Detektion der Kir_{ir}-Punktmutante im Western Blot nach Aufreinigung mit APEX2-Fusionsproteinen

HeLa-Zellen wurden kotransfiziert mit Kir 2.1 E377/379A und APEX2-Fusionskonstrukten. Anschließend erfolgte die Aufreinigung, Auftrennung und Darstellung mittels Western Blot wie in Kapitel 2.5.1 und 2.5.2 beschrieben. Zum Nachweis der GFP-markierten Kir_{ir}-Punktmutante wurde der Anti-GFP-Antikörper verwendet (70 kDa).

Die Spuren der Lysate zeigen eine ungleiche Expression des Kanals. Die Überstände weisen keine merkliche Abreicherung des Kanals auf. In den Eluaten lässt sich der Kir 2.1 E377/379A Kanal in der ER-spezifischen Calreticulin-V5-APEX2-KDEL Spur nachweisen sowie an der Membran repräsentiert durch die Fyn-V5-APEX2.

Membran

Für den Nachweis der Membranspezifität der Fyn-V5-APEX2- Fusionsproteine wurden alle Fusionsproteine mit dem spannungsgesteuerten Kaliumkanal Kv4.2 (GFP-fusioniert) kotransfiziert. Dieser findet sich vor allem in der Membran und wird in den intrazellulären Kompartimenten kaum exprimiert. Nach Durchführung der Aufreinigung sollte sich der Kanal im Eluat der Fyn-V5- APEX2 finden lassen

und aus der ungebundenen Fraktion aufgereinigt worden sein. Es zeigte sich eine gleichmäßige Expression in allen 4 Zellpopulationen des Kanals, allerdings ließ er sich in der Golgi-spezifischen Spur nicht mehr nachweisen, sowohl in der ungebundenen Fraktion als auch in der Eluatfraktion. Dies lässt auf einen Probenfehler schließen. Die Abreicherung des Kanals in den Überständen der Fyn-V5-APEX2-Spur und die Anreicherung in den Eluaten zeigt allerdings die gewünschte Kompartimentspezifität.

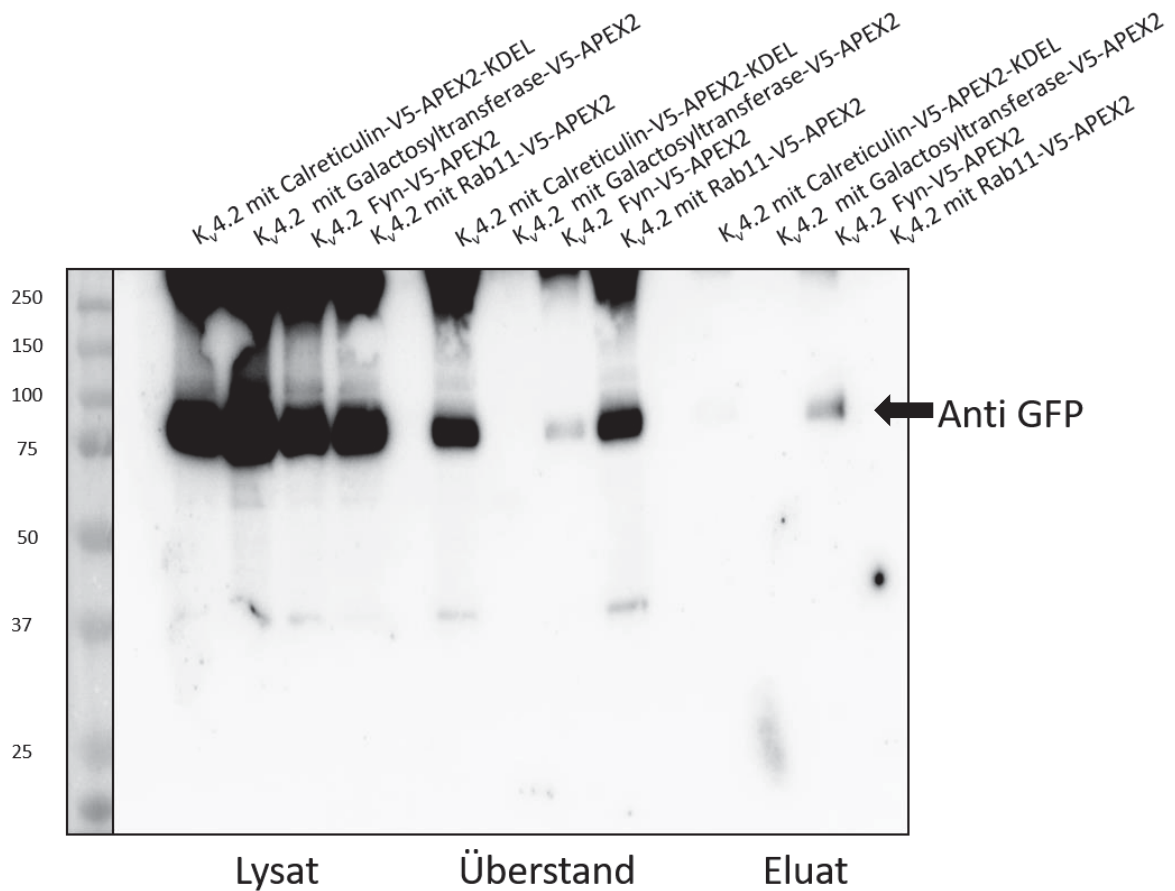


Abb. 14: Detektion des K_v4.2 im Western Blot nach Aufreinigung mit APEX2-Fusionsproteinen

HeLa-Zellen wurden kotransfiziert mit K_v4.2 und APEX2-Fusionskonstrukten. Anschließend erfolgte die Aufreinigung, Auftrennung und Darstellung mittels Western Blot wie in Kapitel 2.5.1 und 2.5.2 beschrieben. Zum Nachweis der diene bei GFP-markiertem Kanal der Anti-GFP-Antikörper (97 kDa).

Der K_v4.2-Kanal ist in allen Lysaten gleichmäßig exprimiert. In den Überständen findet sich der Kanal nicht beim Golgi und Membran-Fusionsprotein. In den Eluaten reichert sich nur bei der Fyn-V5-APEX2 Kotransfektion der Kanal an. Da sowohl in Eluat und Überstand der Galactosyltransferase-V5-APEX2 Kotransfektion der Kanal nicht nachweisbar ist, kann dies nicht als Kompartimentspezifitätsnachweis gelten.

3.2. Ergebnisse der *qPCR* in den kardialen Ganglienzellen der Maus

Neben einem Nachweis auf proteinchemischer Ebene kann auch der Vorläufer der Proteine, die mRNA, in Zellen und Geweben nachgewiesen werden. Die Untersuchung der mRNA zeigt, ob die genetische Information für ein bestimmtes Protein im Gewebe überhaupt vorhanden ist und abgerufen wird. Die mRNA-Expression korreliert außerdem mit der Menge der exprimierten Proteine und daher eignet sich die Analyse der mRNA, bzw. der daraus synthetisierten cDNA, für eine quantitative Bestimmung der zu produzierenden Proteine. Es wurde eine zweite Experimentreihe durchgeführt, die den Nachweis von HCN-Kanälen sowie von deren akzessorischer Untereinheit Trip8b auf mRNA-Ebene in den kardialen Ganglienzellen der Maus erbringen sollte. Kardiale Ganglienzellen der Maus wurden dazu mittels *qPCR* auf die Expression der einzelnen HCN-Isoformen, von Trip8b und verschiedener neuronaler Marker untersucht.

Für die Experimente wurden insgesamt 5 Proben mit jeweils Ganglienzellen von 3-5 Mäusen verwendet. Eine Aufstellung findet sich in Tabelle 9.

3.2.1. Spezifität der *Primer*

Es wurden zunächst mittels NCBI *Primer* entworfen, die den Nachweis der einzelnen HCN-Kanalisoformen in der PCR erbringen sollten. Diese wurden bei biomers bestellt und zunächst in einer konventionellen PCR getestet. Abb. 15 zeigt die Ergebnisse dieser Tests.

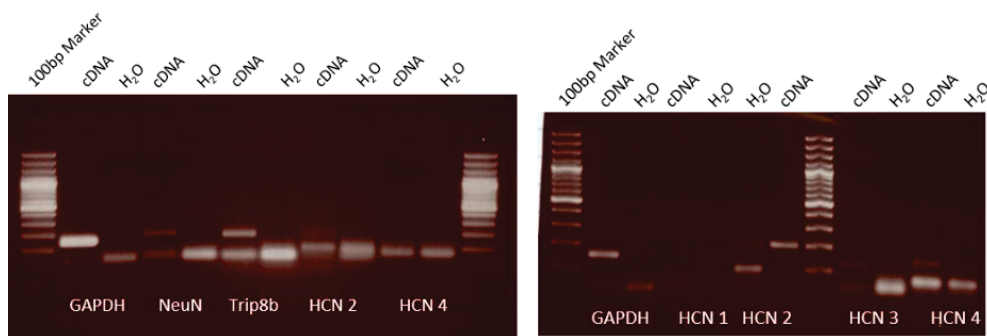


Abb. 15: Test der verwendeten *Primer* auf die kardialen Ganglienzellen der Maus in der konventionellen PCR

Es wurde eine konventionelle PCR durchgeführt und deren Produkte in einer Agarosegelelektrophorese in 1% igem Gel aufgetrennt (vgl. Kapitel 2.2.2 und 2.2.3). Als Negativkontrollen diente jeweils die Hinzugabe von H₂O anstatt von cDNA.

GAPDH, NeuN, Trip8b und HCN2 werden in der konventionellen PCR in den Ganglienzellen nachgewiesen. Die Banden in den Negativkontrollen unterhalb der 100 bp-Marke sind *Primer*dimere.

Wie Abb. 15 zeigt, sind nur bei Zugabe von cDNA Banden der richtigen Größe in der konventionellen PCR detektierbar. Zusätzlich wurde die Spezifität der *Primer* durch Sequenzierung der ausgeschnittenen und aufgereinigten Banden und anschließend durch „BLAST“ bestätigt. (Ergebnisse hier nicht gezeigt). Damit konnte die Funktion der einzelnen *Primer* gezeigt werden.

Danach wurden die *Primereffizienzen* bestimmt. Dazu wurde für die HCN1 und HCN2-*Primer* eine Verdünnungsreihe einer Herz-cDNA und für HCN3 einer Gesamthirn-cDNA angesetzt. Für die HCN4-*Primer* wurde eine Verdünnungsreihe aus Thalamus-cDNA verwendet.

Die *Primer*, sowie deren Effizienzbestimmung für Trip8b, NeuN, GAPDH, MAP2 und PGK1 waren bereits laborintern schon getestet. Die Effizienz für die Trip8b-*Primer* wurde nachbestimmt mit einer Verdünnungsreihe von *total brain* cDNA.

3.2.2. mRNA Expression der HCN-Isoformen

Bei der quantitativen Analyse mittels *realtime* PCR zeigt sich vor allem eine HCN2 mRNA Expression in den kardialen Ganglienzellen, die dennoch deutlich geringer ist als die von GAPDH. Die anderen Untereinheiten der HCN-Kanalfamilie werden nicht exprimiert (s. Abb. 16).

Die akzessorische Untereinheit Trip8b wird nur in sehr geringem Maße exprimiert. Die mRNA des nukleären Proteins NeuN konnte nicht detektiert werden. Alle Expressionen wurden auf AraB normiert. Dies ist eine Ribulokinase und wird gleichmäßig in jedem Organismus exprimiert. Dadurch lassen sich Gewebe sowie unterschiedliche Altersgruppen leichter miteinander vergleichen.

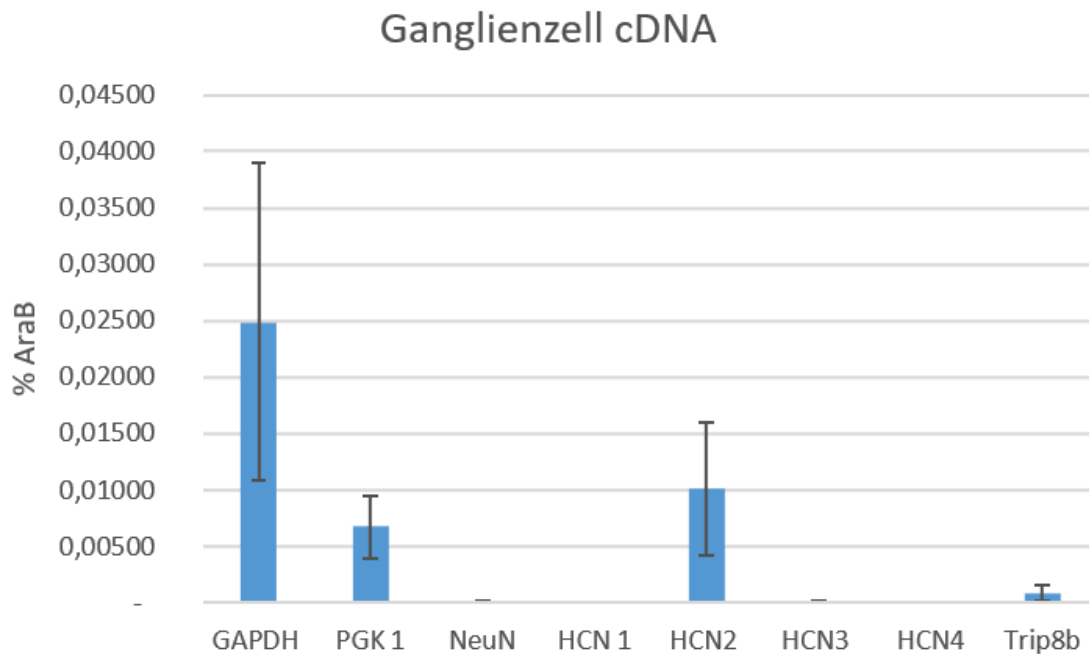


Abb. 16: Auswertung der quantitativen Bestimmung der HCN-Kanalfamilie in den Ganglienzellen der Maus

Es wurde eine *qPCR* auf die kardialen Ganglienzellen der Maus durchgeführt mit *Primern* für die HCN-Unterformen, deren akzessorische Untereinheit Trip8b sowie den neuronalen Marker NeuN. Als Qualitätskontrolle wurden noch GAPDH und PGK 1 bestimmt. Die in der *qPCR* ermittelten Werte wurden auf AraB normiert. Hieran lässt sich das Vorhandensein von GAPDH, PGK1 und HCN2 nachweisen. Die anderen HCN-Kanäle werden nicht exprimiert. Das Trip8b ist in sehr geringem Maße exprimiert. Dargestellt ist der Mittelwert +/- Standardabweichung (n=3).

Neben der quantitativen Bestimmung der HCN-Isoformen und der akzessorischen Untereinheiten, sollte in weiteren Versuchen die Aufschlüsselung der Trip8b-Isoformen erfolgen. Aufgrund der zu geringen Expression des Trip8b auf RNA-Ebene wurde von weiteren Versuchen abgesehen.

4. DISKUSSION

4.1. Reproduktion einer Methode zur Aufreinigung von kompartimentspezifischen Proteomen

Die vorliegende Arbeit diente der Methodenetablierung zur subzellulären Analyse von Kompartimenten. Proteine, wie Rezeptoren und Ionenkanäle, durchlaufen auf Ihrem Weg zur Zellmembran verschiedene Stationen. Der Verbleib in den Kompartimenten kann durch Signalsequenzen erfolgen. Auch akzessorische Untereinheiten und Kofaktoren beeinflussen die subzelluläre Prozessierung. Daher ist es von großer wissenschaftlicher Bedeutung, die Funktion dieser Hilfsuntereinheiten näher zu analysieren, zumal ihre Fehlfunktionen ursächlich in der Entstehung von Erkrankungen sein können.

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel eine Methode zu reproduzieren, die eine kompartimentspezifische Aufreinigung des dortigen Proteoms erlaubt. Die Methode nach Hung et al war auf immunhistochemischer Ebene erfolgreich. Die APEX2-Fusionskonstrukte konnten in die dafür vorgesehenen Kompartimente eingeschleust werden und biotinylierten in der Immunhistochemie lediglich das sie umgebende Kompartiment. Die biochemische Aufreinigung und die Darstellung mittels Westernblot konnte allerdings keine Kompartimentspezifität zeigen.

Eine weitere Experimentalreihe diente dem quantitativen Nachweis von HCN-Kanälen und deren akzessorischer Untereinheit Trip8b in den kardialen Ganglienzellen der Maus. Dort sollte untersucht werden ob vorhandene HCN-Kanäle in den peripheren Neuronen, hier in den kardialen Ganglienzellen, ebenfalls eine Modulation der HCN-Kanäle bewirken. Es konnte mittels *qPCR* gezeigt werden, dass die HCN2-Isoform vorwiegend exprimiert ist. Trip8b konnte nur in sehr geringem Maße nachgewiesen werden, so dass eine weitere Untersuchung der *Splice*-Formen nicht erfolgen konnte.

4.1.1. Auswahl der Kompartimente

Mit Hilfe der verwendeten Methode ist es möglich, durch die Klonierung der APEX2 an entsprechende „Transportsequenzen“ nahezu jeden intrazellulären Raum spezifisch aufzureinigen. Für die Untersuchung subzellulärer Prozessierung von Ionenkanälen eignen sich daher die Stationen, die das Protein auf dem Weg zur Zellmembran durchläuft.

Es wurden mittels Literaturrecherche Markersequenzen gesucht, an die die APEX2 gekoppelt wurde. Für die Fusionskonstrukte Calreticulin-V5-APEX2-KDEL, Galactosyltransferase-V5-APEX2 und Fyn-V5-APEX2 konnte auf immunhistochemischer Ebene eine Kompartimentspezifität gezeigt werden. Eine Aufreinigung des entsprechenden Kompartiments mittels Präzipitation und Westernblot gelang nicht.

Nach Synthese an den Ribosomen wird es zunächst ins ER sezerniert (Klinke et al. 2010), dieses sollte mit der Calreticulin-V5-APEX2-KDEL aufgereinigt werden. Calreticulin dient gemeinsam mit Calnexin als Chaperon im Lumen des ER (Kozlov et al. 2017). Des Weiteren ist es für die Calcium-Homöostase zuständig und reguliert Apoptose, Zellproliferation und Phagozytose (Pinton et al. 2008; Krebs et al. 2015).

Die weitere Modifikation findet nach COPII-vermitteltem Transport im Golgi-Apparat statt, der durch die Galactosyltransferase-V5-APEX2 detektiert wird. Die Galactosyltransferase katalysiert den Transfer der UDP-Galactose an N-Acetylglucosaminreste im Golgi-Apparat (Gleeson 1998). Eine um 13 Aminosäuren erweiterte Galactosyltransferase wird bevorzugt an die Plasmamembran lokalisiert (Lopez et al. 1991). Die Fusionsproteine für das ER und den Golgi decken die zwei Schlüsselstationen in der Proteinmodifikation und Prozessierung ab. Mithilfe der Analyse von Proteinen während des anterograden Transports zur Zellmembran können akzessorische Untereinheiten und Proteinvariationen ermittelt werden, die regulierenden Einfluss auf diesen Prozess nehmen.

Eine Entdeckung auf diesem Weg war, dass das PAQ3 mit Sec13 und Sec31 interagiert und somit die ER-Golgi-Interaktion über COPII reguliert. Diese Interaktion konnte durch eine Fusion von PAQ3 und APEX2 und der daraus folgenden Biotinylierung der assoziierten und räumlich nahen Proteine gezeigt werden (Cao et al. 2018). Diese Arbeit ist ein Beispiel für die Möglichkeiten der subzellulären Analyse von Transportmechanismen mittels *proximity labeling* Methode mit der APEX2.

Die Zelloberfläche sollte mit der Fyn-V5-APEX2 aufgereinigt werden. Die Tyrosinkinase Fyn wird durch eine Lipidmodifikation (Palmitoylierung bzw Myristolation) an die Zelloberfläche sortiert und bindet die APEX2 somit an die Zelloberfläche (Kameda et al. 2008). Durch ein wässriges Zwei-Phasensystem und Sucrose-

Gradientenzentrifugation kann die Zellmembran bereits aufgereinigt werden. Diese Methode zeigte allerdings Probleme mit Verunreinigungen und mangelnder Selektivität. Intrazelluläre Membranen werden in diesem Verfahren zum Teil mit aufgereinigt (Everberg et al. 2008; Chang et al. 2008).

Die membranständige Peroxidase Fyn-APEX2 sollte in der vorliegenden Arbeit membranäre sowie assoziierte Proteine biotinylieren und zu einer selektiveren Aufreinigung führen, ohne Anteile von z.B. Mitochondrienmembranen. Die Konstruktion des Fusionsproteins lokalisiert die APEX2 an der intrazellulären Seite der Zellmembran. Dadurch kommt es auch zu einer Biotinylierung der membrannahen Cytosolproteine, die dann durch Diffusion im gesamten Zytosol dargestellt werden können. Ein Fusionsprotein, dass die APEX nach extrazellulär sortiert, wäre Gegenstand weiterer Entwicklungen in Experimenten. Eine Fusion APEX2-Fyn zeigte keine reine Expression an der Plasmamembran.

Der anterograde Weg sollte nach Literaturrecherchen also durch die Fusionsproteine für ER und Golgi nachvollzogen werden können und die Expression an der Zelloberfläche unter anderem mit dem Fyn-Fusionsprotein untersucht werden können.

Bei der Endozytose, also dem retrograden Weg der Proteinprozessierung, ist eine Schlüsselstation das *endozytotische recycling compartment* (ERC). Dieses ist unter anderem gekennzeichnet durch einen Vertreter der Rab-Familie, dem Rab11 (Ullrich et al. 1996). Die Fusion dieses Rab11 an die APEX2 sollte den endozytotischen Weg aufreinigen. Da die Oberflächenkonzentration von unter anderem HCN4 durch die Bereitstellung von Kanälen aus dem ERC reguliert wird (Hardel et al. 2008), ist dies ein weiteres wichtiges Kompartiment in der Proteinprozessierung. Für eine spezifischere Sortierung des APEX2-Fusionsproteins müssen noch neue Signalsequenzen getestet werden, da die Spezifität des Rab11-Fusionsproteins nicht ausreicht. Als mögliche neue Ziel-Sequenzen kommen unter anderem das Rme1 oder das die YTRF-Sequenz des Transferrinrezeptors in Frage (Lin et al. 2001; Collawn et al. 1990). Neuere Untersuchungen zeigen, dass die Ubiquitylierung durch Ligasen wie der E3 ubiquitin-protein ligase rififylin (RFFL-Gen) maßgeblich die Formation und die Funktion des ERC beeinflussen und auch als mögliche Zielstrukturen in Betracht gezogen werden sollten (Sakai et al. 2019).

Mit den drei der vier entwickelten Fusionsproteine könnte bei Nachweis der spezifischen Biotinylierung der Weg des Proteins vom Zellkern über die subzellulären Stationen an die Zellmembran nachvollzogen werden. Für den endozytotischen Anteil der Prozessierung bedarf es noch weiterer Forschung an Markerproteinen, die an die APEX2 gekoppelt werden können.

4.1.2. Problemanalyse

Bisherige Methoden zur Proteinaufreinigung sind zum einen von der Qualität der aufgereinigten Proteine abhängig und zum anderen können gewisse Regionen, wie zum Beispiel der synaptische Spalt, nicht aufgereinigt werden.

Die Methode von Hung et al. bietet aufgrund einer ortsspezifischen Biotinylierung die Möglichkeit, Kompartimente getrennt voneinander aufzureinigen und zu kategorisieren.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Etablierung der Methode auf immunhistochemischer Ebene erfolgreich ist. Es konnte sowohl eine richtige Sortierung des Markerprotein-APEX2-Fusionsproteins mittels immunozytochemischer Färbung gezeigt werden sowie die selektive Biotinylierung des Kompartiments. Die konfokale Darstellung der durch die Fyn-V5-APEX2 biotinylierten Proteine zeigte eine diffuse Verteilung derselben im Intrazellularraum. Dies lässt sich durch eine Diffusion der membranahen Proteine vor der Fixierung erklären. In der biochemischen Analyse zeigte sich nur bei Hinzugabe von BP und H₂O₂ eine Spannbreite von biotinylierten Proteinen. Da in den dazugehörigen Negativkontrollen hingegen nur jeweils eine Bande bei 72, 75 und 130 kDa detektierbar ist, was endogen biotinylierten Proteinen einer Zelle entspricht, kann eine Autoaktivierung ausgeschlossen werden. Dies bestätigt die Ergebnisse aus der Immunzytochemie und zeigt, dass die APEX2 nur bei Zugabe von Biotinphenol und H₂O₂ aktiviert wird. Dieser Nachweis ist im Originalpaper auch per Western Blot erbracht worden (Hung et al. 2016).

Auf biochemischer Ebene konnte die Kompartimentspezifität mittels der Western Blot Methode in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden. Ein Grund dafür könnte sein, dass die Avidität der biotinylierten Proteine zur Streptavidin HRP herabgesetzt ist. Dies resultiert in einer quantitativ nicht ausreichenden Menge eluierter Proteine durch die *beads* und die Konzentration des Markerproteins sinkt unter

die Nachweisgrenze. Ein weiterer Grund für den fehlenden Nachweis im Western Blot könnte eine zu hohe Avidität gewesen sein, die verhindert hat, dass sich die Proteine bei der Elution von den *beads* lösen. Vorversuche zeigten allerdings eine vollständige Aufreinigung biotinylierter Proteine mit Hilfe des verwendeten Protokolls (siehe Abbildung 17 im Anhang). Dort zeigt sich auch ein schwächeres Signal in der Eluatfraktion als in der Lysatfraktion, was auf einen Proteinverlust während der Aufbereitung hindeutet.

Das Originalprotokoll empfiehlt eine Transfektionsrate von mindestens 50% der APEX2-Fusionskonstrukte um ausreichend biotinyliertes Material zu generieren (Hung et al. 2016). Eine Transfektionsrate wurde vor der Western Blot Analyse nicht bestimmt.

Western Blots als Methode zur Proteindarstellung sind fehleranfällig, vor allem weil die Qualität der Probe maßgeblich für den Erfolg ist (Pillai-Kastoori et al. 2020). Es sind die Aufbereitungsbedingungen, die Menge des aufgetragenen Proteins, sowie die Qualität der Antikörper essenziell (Ghosh et al. 2014). In der vorliegenden Arbeit wurden die Proben wie für eine Immunopräzipitation vorbereitet. In den Vorversuchen wurde die Menge des verwendeten Proteins optimiert. Die Antikörper wurden auf Ihre Spezifität getestet. Eine Variation der Detergenzien, Temperaturen und des Aufbereitungsprozesses wäre ein möglicher Lösungsansatz.

Ein weiterer Grund könnte sein, dass die Biotinylierung die sterische Struktur der Antikörperbindungsstelle verändert und dazu führt, dass die aufreinigenden Antikörper nicht mehr binden. Eine Biotinylierung findet an den Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan, Cystein und Histidin statt. Nach Anfrage beim Antikörperhersteller *Abcam* zeigte sich, dass lediglich im Anti-GM130-Antikörper ein Tryptophan in der Sequenz enthalten ist, sonst kommen die Aminosäuren in den Antikörpern nicht vor (*abcam*).

Die Kotransfektion mit den AMPA-Rezeptoren zeigte, dass es keine Veränderung der Antikörperstruktur gibt, da sowohl extra- als auch intrazelluläre Antikörper binden konnten, dass der Rezeptor anscheinend aus den Kotransfektionen mit der Galactosyltransferase und dem Calreticulin quantitativ besser aufgereinigt wurde als aus der Negativkontrolle (keine Kotransfektion mit APEX2-Fusionsproteinen),

die im Eluat keine Rezeptoren enthielt und dem Rab11- Konstrukt. Da der Rezeptor während der Synthese und des Transports zur Zelloberfläche vor allem im ER und weniger im Golgi Komplex modifiziert wird, könnte er hier während dieses Weges aufgereinigt werden (Mah et al. 2005). Eine Endozytose des Kanals in das ERC scheint hier im Zellkultursystem eher weniger vorzuliegen. In Neuronen zeigt sich dahingegen, dass vor allem das ER und das ERC für den intrazellulären Transport essenziell sind und der Golgi-Apparat hingegen eine untergeordnete Rolle (Bowen et al. 2017).

Ein weiterer Grund für den mangelnden Spezifitätsnachweis könnte sein, dass sich das Protein GM130, welches als Lokalisationskontrolle für den Golgi-Apparat genutzt wurde, überwiegend im cis-Golgi exprimiert wird (Nakamura et al. 1995), wohingegen die Galactosyltransferase vorwiegend im trans-Golgi zu finden ist (Schaub et al. 2006). Vorversuche zeigten allerdings in der Immunhistochemie eine gute Kolokalisation der Galactosyltransferase und des GM130 (siehe Anhang Abbildung 18).

Im Originalpaper (Hung et al. 2016) wurden zum Nachweis von endogenen Markern anstatt von *six-well-plates*, T25-Kulturflaschen genutzt. Da bei den vorliegenden Experimenten allerdings immer drei *wells gepooled* wurden, die Proteinkonzentration bestimmt wurde und zudem die Markerproteine in den Lysaten und Überständen nachgewiesen wurden, können wir eine zu geringe Proteinmenge als Ursache weitgehend ausschließen. Hung et al. beschreiben, dass eine ungenügende Entfernung des Biotinphenols zu einer kompetitiven Bindung an den *beads* und damit zu einer ungenügenden Aufreinigung führen kann (Hung et al. 2016). Da mittels Streptavidin Proteine im Eluat nachgewiesen werden konnten und zudem ein zusätzlicher Waschschrift mit *Quencherlösung* der Zellen eingefügt wurde, kann dieser Fehler ausgeschlossen werden.

Die Immunfärbung zeigt eine spezifische Sortierung, die im Western Blot nicht bestätigt werden konnte, daher sollte man als zusätzliche Analyse eine Massenspektrometrie in Erwägung ziehen. Bei Ihrem Nachweis von Proteinen zwischen der äußeren Mitochondrienmembran und der äußeren ER-Membran nutzten Hung, Lam et al. als Lokalisationsnachweis die immunhistochemische und elektronenmikroskopische Darstellung, allerdings keine Darstellung der endogenen Markerproteine im Western Blot (Hung et al. 2017). Sie konnten Ihre Ergebnisse mittels

Massenspektrometrie bestätigen. Shi et al nutzten 2017 die APEX2 und ihre spezifische Biotinylierung um bei einer 3D-Aufnahme der Zelle die Kompartimente besser darstellen zu können (Shi et al. 2017).

Zhen et al konnten 2019 mit derselben Methode Rezeptorliganden des FGF-Rezeptors identifizieren, die bisher nicht bekannt waren (Zhen et al. 2018). Ebenso wie Hung et al. nutzten auch sie in ihren Experimenten die Massenspektrometrie zur Proteom-Analyse. Im Gegensatz zum Western-Blot wird bei der Massenspektrometrie über die Ladung die Masse eines Teilchens bestimmt. Dies mindert gewisse Nachteile, die liganden-assoziierte Verfahren, wie zum Beispiel der Western Blot, aufweisen. Dazu gehört zum Beispiel die Kreuzreaktivität, die Qualität der verwendeten Reagenzien und die mangelnde Standardisierung. Die Massenspektrometrie als Analysemethode bietet die Möglichkeit mehrere Proteine getrennt voneinander zu analysieren und ist unabhängig von Antikörpern (Method of the Year 2012 2012). Die Analyse der aufgereinigten Proteine via Massenspektrometrie wäre eine Möglichkeit in weiteren Experimenten die Kompartimentspezifität zu testen.

4.2. Quantitative realtime PCR als Möglichkeit zum Nachweis der HCN- Untereinheit Trip8b

Bisher konnte die akzessorische Untereinheit des HCN-Kanals, das Trip8b, nur in zentralen neuronalen Geweben nachgewiesen werden. Die Expression des Proteins in peripheren Geweben ist bisher unbekannt. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit kardiale Ganglienzellen auf Ihre Expression von HCN-Kanälen und Trip8b untersucht. Dabei konnte eine Expression von HCN2-Kanälen gezeigt werden. Trip8b konnte nur in sehr geringem Maße nachgewiesen werden.

Kardiale Ganglienzellen gehören zum extrinsischen System der autonomen Regulation des Herzes. Sie stellen die Schaltstelle zwischen den präganglionären parasympathischen Fasern des Nervus vagus auf die zweiten Neurone dar. Die sympathischen Fasern werden aus den aus dem Ganglion stellatum und den Nervi cardiacci gespeist. (Kallmünzer und Schwab 2017). Neben den cholinergen Somata der kardialen Ganglienzellen entwickeln sich parallel Satellitenzellen in den Vorhöfen. Bei einer großen Anzahl von Schwannzellen kommt es zu einem weiteren Wachstum. Dies impliziert, dass neuro-gliale Interaktionen auch für die Entwicklung vom parasympathischen Nervensystem des Herzens wichtig sein können

(Fregoso und Hoover 2012). Es zeigen sich also enge Verknüpfungen zwischen zentralem und peripherem Nervensystem in den kardialen Ganglienzellen, die ein Vorkommen von HCN-Kanälen und daher auch der akzessorischen Untereinheit Trip8b möglich machen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass der HCN2-Subtyp in den kardialen Ganglienzellen der Maus exprimiert ist. Andere HCN-Unterformen lassen sich in der qPCR nicht nachweisen. Des Weiteren lassen sich auch die neuronale Marker MAP2 und NeuN nicht nachweisen. NeuN gilt als ein neuronaler Marker, der ausschließlich in Neuronen exprimiert wird. Gliazellen exprimieren wie alle anderen Zelltypen außer Neuronen kein NeuN. Allerdings sind fehlende NeuN-Nachweise bereits in den dopaminergen Neuronen der substantia nigra beschrieben (Kumar und Buckmaster 2007; Cannon und Greenamyre 2009). Immunhistochemische Färbungen mit Anti-NeuN-Antikörpern können nicht in den Cajal-Zellen des Neocortex, einigen cerebellären Zellen (wie Purkinjezellen), der unteren Olive und den inneren Kernschichten der Retina, sowie der γ -Motorneuronen und den ganglionären Zellen des Sympathikus durchgeführt werden (Gusel'nikova und Korzhevskiy 2015). Kardiale Ganglienzellen sind wie oben beschrieben parasymphatische Zellen und weisen gegebenenfalls kein NeuN auf.

Eine weitere direkte starke Interaktion zeigt sich zwischen Trip8b und Clathrin. Die Clathrin-vermittelte Endozytose ist einer der Hauptmechanismen der Endozytose. Indem Trip8b das Clathrin an seinem N-Terminus bindet, nimmt es wesentlichen Einfluss auf neuronale endozytotische Vorgänge (Popova et al. 2011).

4.3. Schlussfolgerungen

Das Wissen um die subzellulären Verteilungen und Determinanten gewinnt zunehmend an Bedeutung. Zur Analyse der Prozessierung gibt es bislang verschiedene Ansätze. In dieser Arbeit wurde eine biotinylierungsabhängige Aufreinigung von Kompartimenten untersucht. Dafür wurden verschiedene Fusionskonstrukte kloniert und auf Kompartimentspezifität und selektive Aufreinigung untersucht. Die immunhistochemischen Ergebnisse divergierten dabei stark von den biochemischen Aufreinigungen, sodass zukünftige Versuche sich auf die Behebung dieses Problems konzentrieren sollten. Eine Intensivierung des Elutionsprotokolls mit strengeren Bedingungen zeigte eine Erhöhung der Proteinausbeute, konnte allerdings keine Kompartimentspezifität zeigen (Daten intern, hier nicht gezeigt.). Al-

ternativ kann eine massenspektrometrische Untersuchung in Betracht gezogen werden. Darauffolgend kann die Methode zur Beantwortung vieler Fragestellungen genutzt werden, die die subzelluläre Prozessierung und Interaktion von Proteinen betrifft.

Die zweite Versuchsreihe nutzte die quantitative real-time PCR zur Untersuchung von Trip8b und HCN-Kanälen in den kardialen Ganglienzellen der Maus. Dabei zeigte sich eine Dominanz der HCN2- Kanäle, die zu untersuchende Untereinheit Trip8b war zu gering exprimiert. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen, insbesondere zu regulierenden Untereinheiten von HCN-Kanälen in peripheren Neuronen.

5. LITERATURVERZEICHNIS

Akopian, David; Shen, Kuang; Zhang, Xin; Shan, Shu-ou (2013): Signal recognition on particle: an essential protein-targeting machine. In: *Annual review of biochemistry* 82, S. 693–721. DOI: 10.1146/annurev-biochem-072711-164732.

Alanen, Heli I.; Raykhel, Irina B.; Luukas, Marja J.; Salo, Kirsi E.H.; Ruddock, Lloyd W. (2011): Beyond KDEL: The role of Positions 5 and 6 in determining ER Localization. In: *Journal of Molecular Biology* Volume 409 (Issue 3), S. 291–297. Online verfügbar unter doi: 10.1016/j.jmb.2011.03.070.

Andreas Neef (2004): Molekulare Grundlagen der Modulation von HCN-Kanälen durch Protonen. Online verfügbar unter undefined, zuletzt geprüft am 14.06.2019.

Appenzeller-Herzog, Christian; Hauri, Hans-Peter (2006): The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function. In: *Journal of cell science* 119 (Pt 11), S. 2173–2183. DOI: 10.1242/jcs.03019.

Bankston, John R.; Camp, Stacey S.; DiMaio, Frank; Lewis, Alan S.; Chetkovich, Dane M.; Zagotta, William N. (2012): Structure and stoichiometry of an accessory subunit TRIP8b interaction with hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (20), S. 7899–7904. DOI: 10.1073/pnas.1201997109.

Bankston, John R.; DeBerg, Hannah A.; Stoll, Stefan; Zagotta, William N. (2017): Mechanism for the inhibition of the cAMP dependence of HCN ion channels by the auxiliary subunit TRIP8b. In: *The Journal of biological chemistry* 292 (43), S. 17794–17803. DOI: 10.1074/jbc.M117.800722.

Biel, Martin; Schneider, Angela; Wahl, Christian (2002): Cardiac HCN Channels: Structure, Function, and Modulation. In: *Trends in Cardiovascular Medicine* Volume 12 (5), S. 206–213.

Bonifacino, Juan S.; Glick, Benjamin S. (2004): The Mechanisms of Vesicle Budding and Fusion. In: *Cell* 116 (2), S. 153–166. DOI: 10.1016/S0092-8674(03)01079-1.

Bowen, Aaron B.; Bourke, Ashley M.; Hiester, Brian G.; Hanus, Cyril; Kennedy, Matthew J. (2017): Golgi-independent secretory trafficking through recycling endosomes in neuronal dendrites and spines. In: *eLife* 6. DOI: 10.7554/eLife.27362.

- Brignac-Huber, Lauren M.; Park, Ji Won; Reed, James R.; Backes, Wayne L. (2016): Cytochrome P450 Organization and Function Are Modulated by Endoplasmic Reticulum Phospholipid Heterogeneity. In: *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 44 (12), S. 1859–1866. DOI: 10.1124/dmd.115.068981.
- Brunner, Yannick; Schvartz, Domitille; Couté, Yohann; Sanchez, Jean-Charles (2009): Proteomics of regulated secretory organelles. In: *Mass spectrometry reviews* 28 (5), S. 844–867. DOI: 10.1002/mas.20211.
- Cannon, Jason R.; Greenamyre, Timothy (2009): NeuN is not a reliable marker of dopamine neurons in rat substantia nigra. In: *Neuroscience Letters* 464 (1), S. 14–17. DOI: 10.1016/j.neulet.2009.08.023.
- Cao, Qianqian; Wang, Zheng; Wan, Huida; Xu, Lijiao; You, Xue; Liao, Lujian; Chen, Yan (2018): PAQR3 Regulates Endoplasmic Reticulum-to-Golgi Trafficking of COPII Vesicle via Interaction with Sec13/Sec31 Coat Proteins. In: *iScience* 9, S. 382–398. DOI: 10.1016/j.isci.2018.11.002.
- Chanaday, Natali L.; Cousin, Michael A.; Milosevic, Ira; Watanabe, Shigeki; Morgan, Jennifer R. (2019): The Synaptic Vesicle Cycle Revisited: New Insights into the Modes and Mechanisms. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 39 (42), S. 8209–8216. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1158-19.2019.
- Chang, Jennifer; Ruiz, Victoria; Vancura, Ales (2008): Purification of yeast membranes and organelles by sucrose density gradient centrifugation. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 457, S. 141–149.
- Chaudhary, Natasha; Gomez, Guillermo A.; Howes, Mark T.; Lo, Harriet P.; McMahon, Kerrie-Ann; Rae, James A. et al. (2014): Endocytic crosstalk: cavins, caveolins, and caveolae regulate clathrin-independent endocytosis. In: *PLoS biology* 12 (4), e1001832. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001832.
- Chen, Wei; Feng, Yan; Chen, Dayue; Wandinger-Ness, Angela (1998): Rab11 is required for Trans-Golgi Network-to-Plasma Membrane Transport and a preferential target for GDP Dissociation Inhibitor. In: *Molecular Biology of cell* Vol. 9, S. 3241–3257. Online verfügbar unter doi: 10.1091/mbc.9.11.3241.

Collawn, J. F.; Stangel, M.; Kuhn, L. A.; Esekogwu, V.; Jing, S. Q.; Trowbridge, I. S.; Tainer, J. A. (1990): Transferrin receptor internalization sequence YXRF implicates a tight turn as the structural recognition motif for endocytosis. In: *Cell* 63 (5), S. 1061–1072.

Cowieson, Nathan P.; King, Gordon; Cookson, David; Ross, Ian; Huber, Thomas; Hume, David A. et al. (2008): Cortactin adopts a globular conformation and bundles actin into sheets. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (23), S. 16187–16193. DOI: 10.1074/jbc.M708917200.

DeBerg, Hannah A.; Bankston, John R.; Rosenbaum, Joel C.; Brzovic, Peter S.; Zagotta, William N.; Stoll, Stefan (2015): Structural mechanism for the regulation of HCN ion channels by the accessory protein TRIP8b. In: *Structure (London, England : 1993)* 23 (4), S. 734–744. DOI: 10.1016/j.str.2015.02.007.

Dharmawardhane, S.; Schurmann, A.; Sells, M. A.; Chernoff, J.; Schmid, S. L.; Bokoch, G. M. (2000): Regulation of macropinocytosis by p21-activated kinase-1. In: *Molecular biology of the cell* 11 (10), S. 3341–3352. DOI: 10.1091/mbc.11.10.3341.

DiFrancesco, Jacopo C.; Barbuti, Andrea; Milanese, Raffaella; Coco, Stefania; Bucchini, Annalisa; Bottelli, Georgia et al. (2011): Recessive loss-of-function mutation in the pacemaker HCN2 channel causing increased neuronal excitability in a patient with idiopathic generalized epilepsy. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31 (48), S. 17327–17337. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3727-11.2011.

DiFrancesco, Jacopo C.; DiFrancesco, Dario (2015): Dysfunctional HCN ion channels in neurological diseases. In: *Frontiers in cellular neuroscience* 6, S. 174. DOI: 10.3389/fncel.2015.00071.

Doherty, Gary J.; McMahon, Harvey T. (2009): Mechanisms of endocytosis. In: *Annual review of biochemistry* 78, S. 857–902. DOI: 10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540.

Everberg, Henrik; Gustavasson, Niklas; Tjerner, Folke (2008): Enrichment of membrane proteins by partitioning in detergent/polymer aqueous two-phase sys-

tems. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 424, S. 403–412. DOI: 10.1007/978-1-60327-064-9_31.

Falkenburger, Björn H.; Jensen, Jill B.; Dickson, Eamonn J.; Suh, Byung-Chang; Hille, Bertil (2010): Phosphoinositides: lipid regulators of membrane proteins. In: *The Journal of Physiology* 588 (Pt 17), S. 3179–3185. DOI: 10.1113/jphysiol.2010.192153.

Fregoso, S. P.; Hoover, D. B. (2012): Development of cardiac parasympathetic neurons, glial cells, and regional cholinergic innervation of the mouse heart. In: *Neuroscience* 221, S. 28–36. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2012.06.061.

Ghosh, Rajeshwary; Gilda, Jennifer E.; Gomes, Aldrin V. (2014): The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots. In: *Expert review of proteomics* 11 (5), S. 549–560. DOI: 10.1586/14789450.2014.939635.

Gleeson, P. A. (1998): Targeting of proteins to the Golgi apparatus. In: *Histochemistry and cell biology* 109 (5-6), S. 517–532.

Goldenring, James R. (2015): Recycling endosomes. In: *Current opinion in cell biology* 35, S. 117–122. DOI: 10.1016/j.ceb.2015.04.018.

Gorur, Amita; Yuan, Lin; Kenny, Samuel J.; Baba, Satoshi; Xu, Ke; Schekman, Randy (2017): COPII-coated membranes function as transport carriers of intracellular procollagen I. In: *The Journal of cell biology* 216 (6), S. 1745–1759. DOI: 10.1083/jcb.201702135.

Grassart, Alexandre; Dujeancourt, Annick; Lazarow, Paul B.; Dautry-Varsat, Alice; Sauvonnnet, Nathalie (2008): Clathrin-independent endocytosis used by the IL-2 receptor is regulated by Rac1, Pak1 and Pak2. In: *EMBO reports* 9 (4), S. 356–362. DOI: 10.1038/embor.2008.28.

Gusel'nikova, V. v.; Korzhevskiy, D. E. (2015): NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. In: *Acta Naturae* 7 (2), S. 42–47.

Han, Y.; Heuermann, R. J.; Lyman, K. A.; Fisher, D.; Ismail, Q-A; Chetkovich, D. M. (2017): HCN-channel dendritic targeting requires bipartite interaction with TRIP8b and regulates antidepressant-like behavioral effects. In: *Molecular psychiatry* 22 (3), S. 458–465. DOI: 10.1038/mp.2016.99.

- Hardel, Nadine; Harmel, Nadine; Zolles, Gerd; Fakler, Bernd; Klöcker, Nikolaj (2008): Recycling endosomes supply cardiac pacemaker channels for regulated surface expression. In: *Cardiovascular research* (79), S. 52–60. Online verfügbar unter doi: 10.1093/cvr/cvn062.
- Huang, Zhuo; Walker, Matthew C.; Shah, Mala M. (2009): Loss of dendritic HCN1 subunits enhances cortical excitability and epileptogenesis. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29 (35), S. 10979–10988. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1531-09.2009.
- Hung, Victoria; Lam, Stephanie S.; Udeshi, Namrata D.; Svinkina, Tanya; Guzman, Gaelen; Mootha, Vamsi K. et al. (2017): Proteomic mapping of cytosol-facing outer mitochondrial and ER membranes in living human cells by proximity biotinylation. In: *eLife* 6. DOI: 10.7554/eLife.24463.
- Hung, Victoria; Udeshi, Namrata D.; Lam, Stephanie S. (2016): Spatially resolved proteomic mapping in living cells with the engineered peroxidase APEX2. In: *Nature Protocols* Vol. 11 (3), S. 456–475. Online verfügbar unter doi: 10.1038/nprot.2016.018.
- Johnson, Nicholas; Powis, Katie; High, Stephen (2013): Post-translational translocation into the endoplasmic reticulum. In: *Biochimica et biophysica acta* 1833 (11), S. 2403–2409. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2012.12.008.
- Jovic, Marko; Sharma, Mahak; Rahajeng, Juliati; Caplan, Steve (2010): The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. In: *Histology and histopathology* 25 (1), S. 99–112. DOI: 10.14670/HH-25.99.
- Kallmünzer, Bernd; Schwab, Stefan (2017): Herzrhythmusstörungen nach Schlaganfall. In: *Akt Neurol* 44 (02), S. 89–98. DOI: 10.1055/s-0043-101374.
- Kameda, Hiroshi; Furuta, Takahiro; Matsuda, Wakoto; Ohira, Koji; Nakamura, Kouichi; Hioki, Hiroyuki; Kaneko, Takeshi (2008): Targeting green fluorescent protein to dendritic membrane in central neurons. In: *Neuroscience research* 61 (1), S. 79–91. DOI: 10.1016/j.neures.2008.01.014.
- Klinke, Rainer; Pape, Hans-Christian; Silbernagl, Stefan; Kurtz, Armin (Hg.) (2010): Physiologie. 6. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.

Kozlov, Guennadi; Munoz-Escobar, Juliana; Castro, Karla; Gehring, Kalle (2017): Mapping the ER Interactome: The P Domains of Calnexin and Calreticulin as Plurivalent Adapters for Foldases and Chaperones. In: *Structure (London, England : 1993)* 25 (9), 1415-1422.e3. DOI: 10.1016/j.str.2017.07.010.

Krebs, Joachim; Agellon, Luis B.; Michalak, Marek (2015): Ca(2+) homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress: An integrated view of calcium signaling. In: *Biochemical and biophysical research communications* 460 (1), S. 114–121. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.02.004.

Kumar, Sanjay S.; Buckmaster, Paul S. (2007): Neuron-specific nuclear antigen NeuN is not detectable in gerbil substantia nigra pars reticulata. In: *Brain research* 1142, S. 54–60. DOI: 10.1016/j.brainres.2007.01.027.

Le Borgne, Roland; Hoflack, Bernard (1998): Protein transport from the secretory to the endocytic pathway in mammalian cells. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1404 (1-2), S. 195–209. DOI: 10.1016/S0167-4889(98)00057-3.

Lewis, Alan S.; Schwartz, Emily; Chan, C. Savio; Noam, Yoav; Shin, Minyoung; Wadman, Wytse J. et al. (2009): Alternatively spliced isoforms of TRIP8b differentially control h channel trafficking and function. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29 (19), S. 6250–6265. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0856-09.2009.

Lin, Sharron X.; Grant, Barth; Hirsh, David; Maxfield, Frederick R. (2001): Rme-1 regulates the distribution and function of the endocytotic recycling compartment in mammalian cells. In: *Nature Cell Biology* Volume 3, S. 567–572. Online verfügbar unter doi: 10.1038/35078543.

Lopez, L. C.; Youakim, A.; Evans, S. C.; Shur, B. D. (1991): Evidence for a molecular distinction between Golgi and cell surface forms of beta 1,4-galactosyltransferase. In: *The Journal of biological chemistry* 266 (24), S. 15984–15991.

Ludwig, A.; Zong, X.; Jeglitsch, M.; Hofmann, F.; Biel, M. (1998): A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. In: *Nature* 393 (6685), S. 587–591. DOI: 10.1038/31255.

Lyman, Kyle A.; Han, Ye; Chetkovich, Dane M. (2017): Animal models suggest the TRIP8b-HCN interaction is a therapeutic target for major depressive disorder. In: *Expert opinion on therapeutic targets* 21 (3), S. 235–237. DOI: 10.1080/14728222.2017.1287899.

Mah, Stephanie J.; Cornell, Elizabeth; Mitchell, Nicholas A.; Fleck, Mark W. (2005): Glutamate receptor trafficking: endoplasmic reticulum quality control involves ligand binding and receptor function. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25 (9), S. 2215–2225. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4573-04.2005.

Malhotra, Vivek; Serafini, Tito; Orci, Lelio; Shepherd, James C.; Rothman, James E. (1989): Purification of a novel class of coated vesicles mediating biosynthetic protein transport through the Golgi stack. In: *Cell* 58 (2), S. 329–336. DOI: 10.1016/0092-8674(89)90847-7.

Marks, M. S.; Woodruff, L.; Ohno, H.; Bonifacino, J. S. (1996): Protein targeting by tyrosine- and di-leucine-based signals: evidence for distinct saturable components. In: *The Journal of cell biology* 135 (2), S. 341–354.

Mellman, I. (1996): Endocytosis and molecular sorting. In: *Annual review of cell and developmental biology* 12, S. 575–625. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.12.1.575.

Method of the Year 2012 (2012). In: *Nature methods* 10, 1 EP -. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1038/nmeth.2329>.

Michalak, Marek; Groenendyk, Jody; Szabo, Eva; Gold, Leslie I.; Opas, Michal (2009): Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. In: *The Biochemical journal* 417 (3), S. 651–666. DOI: 10.1042/BJ20081847.

Moise, Leonard; Liu, Jing; Pryazhnikov, Evgeny; Khiroug, Leonard; Jeromin, Andreas; Hawrot, Edward (2010): K(V)4.2 channels tagged in the S1-S2 loop for alpha-bungarotoxin binding provide a new tool for studies of channel expression and localization. In: *Channels (Austin, Tex.)* 4 (2), S. 115–123. DOI: 10.4161/chan.4.2.10878.

- Nakamura, N.; Rabouille, C.; Watson, R.; Nilsson, T.; Hui, N.; Slusarewicz, P. et al. (1995): Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130. In: *The Journal of cell biology* 131 (6 Pt 2), S. 1715–1726. DOI: 10.1083/jcb.131.6.1715.
- Nonnenmacher, Mathieu; Weber, Thomas (2011): Adeno-associated virus 2 infection requires endocytosis through the CLIC/GEEC pathway. In: *Cell host & microbe* 10 (6), S. 563–576. DOI: 10.1016/j.chom.2011.10.014.
- Parton, Robert G.; Molero, Juan Carlos; Floetenmeyer, Matthias; Green, Kathryn M.; James, David E. (2002): Characterization of a distinct plasma membrane macrodomain in differentiated adipocytes. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (48), S. 46769–46778. DOI: 10.1074/jbc.M205683200.
- Pillai-Kastoori, Lakshmi; Schutz-Geschwender, Amy R.; Harford, Jeff A. (2020): A systematic approach to quantitative Western blot analysis. In: *Analytical biochemistry* 593, S. 113608. DOI: 10.1016/j.ab.2020.113608.
- Pinton, P.; Giorgi, C.; Siviero, R.; Zecchini, E.; Rizzuto, R. (2008): Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis. In: *Oncogene* 27 (50), S. 6407–6418. DOI: 10.1038/onc.2008.308.
- Popova, Nadezhda V.; Deyev, Igor E.; Petrenko, Alexander G. (2011): Association of adaptor protein TRIP8b with clathrin. In: *Journal of neurochemistry* 118 (6), S. 988–998. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2011.07384.x.
- Poteryaev, Dmitry; Datta, Sunando; Ackema, Karin; Zerial, Marino; Spang, Anne (2010): Identification of the switch in early-to-late endosome transition. In: *Cell* 141 (3), S. 497–508. DOI: 10.1016/j.cell.2010.03.011.
- Praefcke, Gerrit J. K.; McMahon, Harvey T. (2004): The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 5 (2), S. 133–147. DOI: 10.1038/nrm1313.
- Rassow, Joachim; Hauser, Karin; Netzker, Roland; Deutzmann, Rainer (Hg.) (2012): *Biochemie*: Thieme.
- Rink, Jochen; Ghigo, Eric; Kalaidzidis, Yannis; Zerial, Marino (2005): Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. In: *Cell* 122 (5), S. 735–749. DOI: 10.1016/j.cell.2005.06.043.

Sakai, Ryohei; Fukuda, Ryosuke; Unida, Shin; Aki, Misaki; Ono, Yuji; Endo, Akinori et al. (2019): The integral function of the endocytic recycling compartment is regulated by RFFL-mediated ubiquitylation of Rab11 effectors. In: *Journal of cell science* 132 (3). DOI: 10.1242/jcs.228007.

Schaub, Beat E.; Berger, Bea; Berger, Eric G.; Rohrer, Jack (2006): Transition of galactosyltransferase 1 from trans-Golgi cisterna to the trans-Golgi network is signal mediated. In: *Molecular biology of the cell* 17 (12), S. 5153–5162. DOI: 10.1091/mbc.e06-08-0665.

Schmid, Eva M.; Ford, Marijn G. J.; Burtey, Anne; Praefcke, Gerrit J. K.; Peak-Chew, Sew-Yeu; Mills, Ian G. et al. (2006): Role of the AP2 beta-appendage hub in recruiting partners for clathrin-coated vesicle assembly. In: *PLoS biology* 4 (9), S. e262. DOI: 10.1371/journal.pbio.0040262.

Semelka, Michael; Gera, Jerome; Usman, Saif (2013): Sick sinus syndrome: a review. In: *American family physician* 87 (10), S. 691–696.

Shi, Yang; Wang, Li; Zhang, Jianguo; Zhai, Yujia; Sun, Fei (2017): Determining the target protein localization in 3D using the combination of FIB-SEM and APEX2. In: *Biophysics reports* 3 (4), S. 92–99. DOI: 10.1007/s41048-017-0043-x.

Shikano, Sojin; Li, Min (2003): Membrane receptor trafficking: evidence of proximal and distal zones conferred by two independent endoplasmic reticulum localization signals. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (10), S. 5783–5788. DOI: 10.1073/pnas.1031748100.

Shin, Jaekyoon; Dunbrack, Roland L.; Lee, Songjae; Strominger, Jack L. (1991): Signals for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum studied with CD4 truncation mutants. In: *National Academy of Sciences* Volume 88 (Issue 5), S. 1918–1922.

Sorkin, Alexander (2004): Cargo recognition during clathrin-mediated endocytosis: a team effort. In: *Current opinion in cell biology* 16 (4), S. 392–399. DOI: 10.1016/j.ceb.2004.06.001.

Stockklausner, C.; Ludwig, J.; Ruppertsberg, J. P.; Klocker, N. (2001): A sequence motif responsible for ER export and surface expression of Kir2.0 inward rectifier K(+) channels. In: *FEBS letters* 493 (2-3), S. 129–133.

Stockklausner, Clemens; Klocker, Nikolaj (2003): Surface expression of inward rectifier potassium channels is controlled by selective Golgi export. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (19), S. 17000–17005. DOI: 10.1074/jbc.M212243200.

Ullrich, O.; Reinsch, S.; Urbe, S.; Zerial, M.; Parton, R. G. (1996): Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. In: *The Journal of cell biology* 135 (4), S. 913–924. DOI: 10.1083/jcb.135.4.913.

Wandinger-Ness, Angela; Zerial, Marino (2014): Rab Proteins and the Compartmentalization of the Endosomal System. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. Online verfügbar unter doi: 10.1101/cshperspect.a022616.

Zhen, Yan; Haugsten, Ellen Margrethe; Singh, Sachin Kumar; Wesche, Jorgen (2018): Proximity Labeling by a Recombinant APEX2-FGF1 Fusion Protein Reveals Interaction of FGF1 with the Proteoglycans CD44 and CSPG4. In: *Biochemistry* 57 (26), S. 3807–3816. DOI: 10.1021/acs.biochem.8b00120.

Zolles, Gerd; Wenzel, Daniela; Bildl, Wolfgang; Schulte, Uwe; Hofmann, Andreas; Muller, Catrin S. et al. (2009): Association with the auxiliary subunit PEX5R/Trip8b controls responsiveness of HCN channels to cAMP and adrenergic stimulation. In: *Neuron* 62 (6), S. 814–825. DOI: 10.1016/j.neuron.2009.05.008.

6. ABBILDUNGSSVERZEICHNIS

ABB. 1 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER INTRAKOMPARTIMENTÄREN BIOTINYLIERUNG DURCH DIE APEX2 (MODIFIZIERT, VERWENDET UND GEDRUCKT HUNG ET AL. 2016 <i>SPATIALLY RESOLVED PROTEOMIC MAPPING IN LIVING CELLS WITH THE ENGINEERED PEROXIDASE APEX2</i> MIT ERLAUBNIS VON SPRINGER NATURE (4640151034333), 2016)	10
ABB. 2: MOLEKULARER AUFBAU DES HCN-KANALS (VERWENDET UND GEDRUCKT BIEL ET AL. 2002 CARDIAC HCN CHANNELS: STRUCTURE, FUNCTION, AND MODULATION MIT ERLAUBNIS VON ELSEVIER (4640240943235), 2016)	12
ABB. 3: ERFOLGREICHE KLONIERUNG DER APEX2-FUSIONSPROTEINE	38
ABB. 4: SUBZELLULÄRE VERTEILUNG DER APEX2-FUSIONSPROTEINE IN RELATION ZU MARKERPROTEINEN	39
ABB. 5: RAB11-V5-APEX2-FUSIONSPROTEIN IN RELATION ZU AF488-MARKIERTEM TRANSFERRIN	40
ABB. 6: KONFOKALE DARSTELLUNG DER APEX2-ABHÄNGIGEN BIOTINYLIERUNG IN HELA-ZELLEN	45
ABB. 7: HOMOGENE EXPRESSION DER FUSIONSPROTEINE	45
ABB. 8: DARSTELLUNG DER APEX2-ABHÄNGIGEN BIOTINYLIERUNG MITTELS SDS UND STREPTAVIDIN-BLOTTING	46
ABB. 9: MANGELNDE DETEKTION DER INDIZIERTEN KOMPARTIMENT-MARKERPROTEINE IN GALACTOSYLTRANSFERASE-V5-APEX2 TRANSFIZIERTEN ZELLEN NACH AUFREINIGUNG MITTELS STREPTAVIDIN-BESCHICHTETEN <i>BEADS</i> .	47
ABB. 10: DARSTELLUNG DER AUFREINIGUNG DES AMPA-REZEPTORS DURCH APEX2-FUSIONSPROTEINE MIT NACHWEIS VON INTRA- UND EXTRAZELLULÄREM ANTEIL DES GLUA1-REZEPTORS	49
ABB. 11: DETEKTION DER K_{IR} -DELETIONSMUTANTE IM WESTERN BLOT NACH AUFREINIGUNG MIT APEX2-FUSIONSPROTEINEN	51
ABB. 12: DETEKTION DES CD4KKXX-REZEPTORS IM WESTERN BLOT NACH AUFREINIGUNG MIT APEX2-FUSIONSPROTEINEN	52
ABB. 13: DETEKTION DER K_{IR} -PUNKTMUTANTE IM WESTERN BLOT NACH AUFREINIGUNG MIT APEX2-FUSIONSPROTEINEN	53
ABB. 14: DETEKTION DES $K_{v4.2}$ IM WESTERN BLOT NACH AUFREINIGUNG MIT APEX2-FUSIONSPROTEINEN	54
ABB. 15: TEST DER VERWENDETEN <i>PRIMER</i> AUF DIE KARDIALEN GANGLIENZELLEN DER MAUS IN DER KONVENTIONELLEN PCR	55
ABB. 16: AUSWERTUNG DER QUANTITATIVEN BESTIMMUNG DER HCN-KANALFAMILIE IN DEN GANGLIENZELLEN DER MAUS	57
ABBILDUNG 17: VOLLSTÄNDIGE AUFREINIGUNG DER BIOTINYLIERTEN PROTEINE	78
ABBILDUNG 18: VORVERSUCH KOLOKALISATION GM130 UND GALTASE GFP	79

7. TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1: VERBRAUCHSMATERIALIEN	16
TABELLE 2: PUFFER UND LÖSUNGEN	16
TABELLE 3: CHEMIKALIEN	16
TABELLE 4: CHEMIKALIEN	17
TABELLE 5: ENZYME, REAGENZIEN UND MARKER	17
TABELLE 6: ENZYME, REAGENZIEN UND MARKER	18
TABELLE 7: KITS	18
TABELLE 8: BAKTERIEN, ZELLINIEN UND GEWEBE	19
TABELLE 9: GANGLIENZELLEN UND TRACHEA	19
TABELLE 10: ANTIKÖRPER	19
TABELLE 11: ANTIKÖRPER	20
TABELLE 12: SEREN	20
TABELLE 13: VERWENDETE GERÄTE	20
TABELLE 14: VERWENDETE SOFTWARE	20
TABELLE 15: VERWENDETE SOFTWARE	21
TABELLE 16: ÜBERSICHT MARKERPROTEINE UND APEX2-FUSIONSPROTEINE	22
TABELLE 17: ÜBERSICHT DER FUSIONSPROTEINE	24
TABELLE 18: ANSÄTZE FÜR RESTRIKTIONSVERDAU	26
TABELLE 19: TRANSFEKTIONSANSATZ	29
TABELLE 20: AUFLISTUNG DER MARKERPROTEINE	38
TABELLE 21: IONENKANÄLE MIT MUTATIONEN, DIE IM JEWEILIGEN KOMPARTIMENT RETINIEREN	50

8. ANHANG

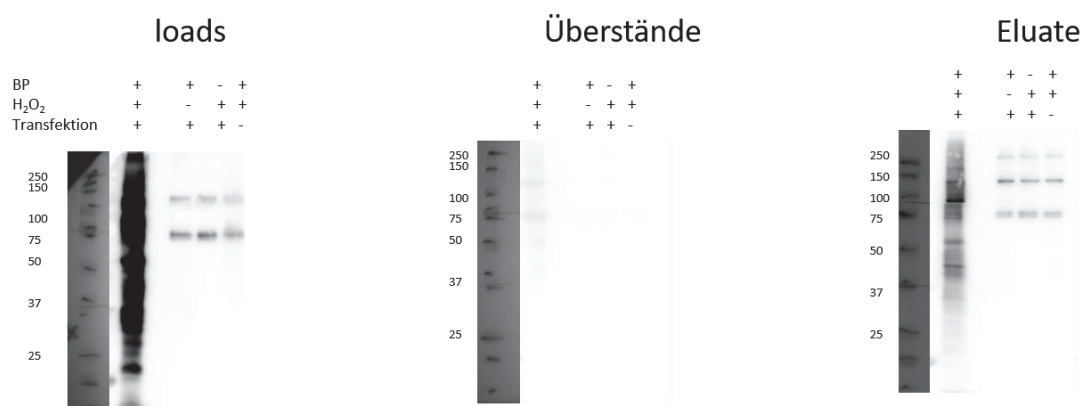


Abbildung 17: Vollständige Aufreinigung der biotinylierten Proteine

Es zeigen sich in den Lysaten (*loads*) der Positivkontrolle eine Spannbreite von biotinylierten Proteinen, in den Negativkontrollen nur die endogen vorkommenden biotinylierten Proteine. Die Überstandsfraktion ist frei von biotinylierten Proteinen, da diese im Eluat zu finden sind. Es verbleiben keine biotinylierten Proteine im Überstand sondern es werden alle gebunden.

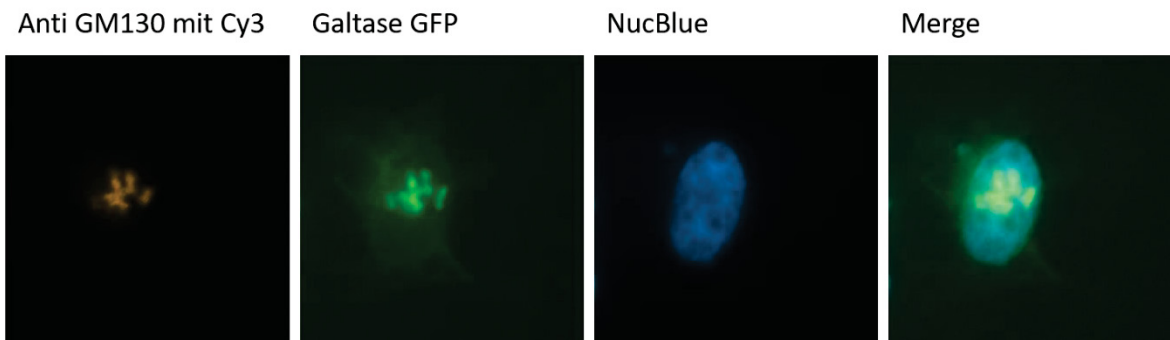


Abbildung 18: Vorversuch Kolokalisation GM130 und Galtase GFP

Die Abbildung zeigt beispielhaft in Rot dargestellt das Markerprotein GM130 mit Anti-GM130 Antikörper und Cy3 gefärbt. In Grün wird die Galactosyltransferase, die mit GFP markiert ist, gezeigt. Die überlagerte Merge-Aufnahme zeigt eine Übereinstimmung der beiden Markerproteine.

DANKSAGUNG

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Klöcker für die Überlassung des Themas, sowie seine Unterstützung während der gesamten Bearbeitungsphase meiner Dissertation

Ich möchte ebenfalls herzlich Frau Prof. Dr. Erlenhardt für die Betreuung und Unterstützung der Arbeit danken.

Frau Dr. Scherschel aus Hamburg danke ich für die Bereitstellung der Ganglienzellen. Frau Dr. Mölders danke ich für die Bereitstellung der Primer, sowie für die Einarbeitung in die qPCR.

Außerdem gilt mein Dank den Kolleginnen aus dem Büro, die stets für wissenschaftliche Gespräche zur Verfügung standen und immer ein offenes Ohr hatten. Auch den anderen wissenschaftlichen MitarbeiterInnen, sowie den biologisch-technischen Assistenteninnen möchte ich meinen herzlichen Dank für die tatkräftige Unterstützung aussprechen.

Besonders möchte ich an dieser Stelle auch meinen Eltern, Henry, Sebastian und meinen Freundinnen und Freunden, für die unermüdliche Unterstützung und Motivation danken.