

Subzelluläre Lokalisation von BASIC (bile acid sensitive ion channel)

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Zahnmedizin genehmigte
Dissertation

vorgelegt von

Nirosha Sivagnanam

aus Düsseldorf

Berichter: Privatdozent Dr. Dominik Wiemuth
Universitätsprofessor Dr. Michael Wolf

Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.2021

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Universitätsbibliothek online verfügbar.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Degenerin/ Epithelial Na ⁺ -channel (Deg/ ENaC Genfamilie).....	1
1.1.1 C. elegans Degenerine	3
1.1.2 Hydra Na ⁺ channels (HyNaCs)	4
1.1.3 Epithelial Na ⁺ channel (ENaC)	5
1.1.4 Acid-sensing ion channel (ASIC).....	6
1.2 Bile acid-sensitive ion channel (BASIC).....	8
1.3 Trafficking von Membranproteinen in Zellen.....	10
1.4 Fragestellung.....	13
2 Material und Methoden	15
2.1 Materialien	15
2.1.1 Chemikalien	15
2.1.2 Materialien für molekularbiologische Methoden	15
2.1.3 Lösungen und Puffer für molekularbiologische Methoden	18
2.1.4 Primer	19
2.1.5 Materialien für zellbiologische Methoden	20
2.2 Methoden.....	22
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	22
2.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion.....	22
2.2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese	24
2.2.1.3 Aufreinigung der DNA-Fragmente.....	24
2.2.1.4 Klonierung.....	25
2.2.1.5 Transformation von kompetenten E. Coli.....	26
2.2.1.6 Isolation der Plasmid-DNA	27
2.2.1.7 DNA-Restriktionsverdau	27
2.2.1.8 Sequenzierung.....	28
2.2.2 Immunzytologische Methoden	28
2.2.2.1 Zellkultur	28
2.2.2.1.1 Kultivierung der Zellen.....	28
2.2.2.2 Transfektion	29
2.2.2.3 Färbung	30
2.2.2.4 Fluoreszenzmikroskopie	31
3 Ergebnisse.....	34
3.1 Expressionsmuster von BASIC.....	34
3.2 Organellmarker (BASIC Kolokalisation).....	37
3.3 Immunfärbung (BASIC Kolokalisation)	41
3.4 Expressionsmuster ASIC.....	44
3.5 Trunkationen.....	48
3.6 Dynamin/ Dynasore Ergebnisse	54
4 Diskussion	57
4.1 Ist BASIC im ER lokalisiert?	57
4.2 Sind aktive Mechanismen für die Retention von BASIC im ER verantwortlich?	59
4.3 Was ist die physiologische Funktion von BASIC?	60
4.4 Aussicht.....	61
5 Zusammenfassung	62

6	Anhang	64
6.1	Literaturverzeichnis.....	64
6.2	Abbildungsverzeichnis	73
6.3	Tabellenverzeichnis	75
7	Danksagung.....	76
8	Erklärung zur Datenaufbewahrung	77
9	Erklärung über den Eigenanteil.....	78
10	Lebenslauf	79

Abkürzungsverzeichnis

ADH	Antidiuretisches Hormon
AF	Alexa Fluor
ASIC	Acid-sensing ion channel
BamH	Bacillus amyloliquefaciens
BLINaC	Brain Liver Intestine Na ⁺ channel
BSA	bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Calciumion
Cl ⁻	Chloridion
C. elegans	Caenorhabditis elegans
CA	Cholsäure
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CDCA	Chenodesoxycholsäure
cDNA	complementary DNA
CHO	Chinese Hamster Ovary
CIPP	channel-interacting PDZ domain Protein
COP	coat protein
C-Terminus	Carboxyterminus
DAPI	4', 6- Diamidin-2-phenylindol
DCA	Desoxycholsäure
DEG	Degenerin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E. Coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEA	early endosome antigen
ENaC	Epithelial Sodium Channel
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-assoziiertes Degradationsweg
ERGIC	ER-Golgi-Intermediärkompartiment
FBS	fetal bovine serum
FFA	Flufenaminsäure
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein

GFP	green flurescent protein
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
H ⁺	Wasserstoffion
HCO ₃ ⁻	Hydrogencarbonation
HDCA	Hyodesoxycholsäure
HEK293	human epithelial kidney 293
Hind	Haemophilus influenzae
HyNaC	Hydra Na ⁺ channel
INaC	Intestine Na ⁺ channel
K ⁺	Kaliumion
Li ⁺	Lithiumion
LAMP	lysosomal assoiiertes Membranprotein
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MCA	Muricholsäure
mRNA	messenger RNA
Na ⁺	Natriumion
NH ₄ ⁺	Ammoniumion
NaOH	Natronlauge
N-Terminus	Aminoterminus
PBS	Phosphate Buffered Solution
PCR	polymerase chain reaction
PDI	Protein-Disulfid-Isomerase
PFA	Paraformaldehyd
PICK	Protein-interacting with C-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
rER	raues endoplasmatisches Retikulum
Rab	Ras-related in brain
RFP	red fluorescent protein
SLP	Stomatin-like Protein
SRP	Signal Recognition Particle
TAE-Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	Thermus aquaticus
TMD	Transmembrandomäne

UBC

wt

unipolar brush cells

wild typ

1. Einleitung

1.1 Degenerin/ Epithelial Na⁺-channel (Deg/ ENaC Genfamilie)

Die Superfamilie der DEG/ENaC-Kanäle, die nach den zwei zuerst beschriebenen Subfamilien benannt wurde, besteht aus den *Caenorhabditis elegans* Degenerinen, Hydra Na⁺ channels (HyNaCs), Epithelial Na⁺ channels (ENaCs), *Acid-sensing ion channels* (ASICs) und *Bile acid-sensitive ion channels* (BASICs) (Abb. 1). Die Vertreter der DEG/ENaC-Kanäle wurden in vielen Spezies nachgewiesen, wobei das Spektrum von Nematoden über Fliegen, Schnecken und Vertebraten, den Menschen eingeschlossen, reicht. Alle Mitglieder weisen die folgenden gemeinsamen Merkmale auf: Erstens kommen sie nur in vielzelligen Tieren (Metazoen) vor, zweitens sind sie selektiv für Natrium und drittens werden sie durch Amilorid blockiert (Kellenberger & Schild, 2002). Auch haben sie eine ähnliche konservierte Sekundärstruktur, bestehend aus zwei Transmembrandomänen (M1 und M2), einem Cystein-reichen extrazellulären Loop (CRD I bis III) und intrazellulär liegenden N- und C-Termini (Abb. 2). Der extrazelluläre Loop macht zwei Drittel des ganzen Proteins aus und repräsentiert ein einzigartiges strukturelles Merkmal, das man in anderen Kanalfamilien nicht findet (Kellenberger & Schild, 2002). Einige Sequenzbereiche der DEG/ENaC Familie sind hoch konserviert. Dazu gehören das HG-Motiv (His-Gly) in der N-terminalen Domäne und eine Fp_{xx}TxC-Sequenz direkt nach der M1 Domäne (post-M1), Cystein-reiche Domänen (CRD II und III) im extrazellulären Loop (Kellenberger & Schild, 2002), sowie ein GAS-Motiv in TMD2, ein Di-Arginin-Motiv und ein konserviertes Tryptophan in der TMD1 (Gründer & Chen, 2010). Die durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärte Kristallstruktur von ASIC1 liefert Grund zu der Annahme, dass die Ionenkanäle eine trimere Struktur besitzen (Jasti et al., 2007). Die Größe der Ionenkanäle variiert zwischen 530 und 740 Aminosäuren.

Trotz dieser Gemeinsamkeiten unterscheiden sich die Kanäle bezüglich Funktion, Expressionsmuster und Aktivierungsmechanismen stark voneinander. Zu den Funktionen gehören u. a. die Na⁺-Homöostase, die Nozizeption, die Propriozeption, die Wahrnehmung mechanischer Reize und die synaptische Transmission. Die Expression der einzelnen Kanäle erfolgt in verschiedenen

Gewebe einschließlich Epithelien, Muskeln und Neuronen. Auch zeigen die Subfamilien unterschiedliche zelluläre Funktionen und ein unterschiedliches *gating* Verhalten. Beispielsweise gibt es Kanäle, die konstitutiv offen sind (ENaCs) (Garty et al., 1997), die durch mechanische Stimuli aktiviert werden (*C. elegans* Degenerine) (Gu et al., 1998) oder die durch Protonen oder Neuropeptide aktiviert werden (ASICs) (Waldmann et al., 1997), (HyNaCs) (Golubovic et al., 2007).

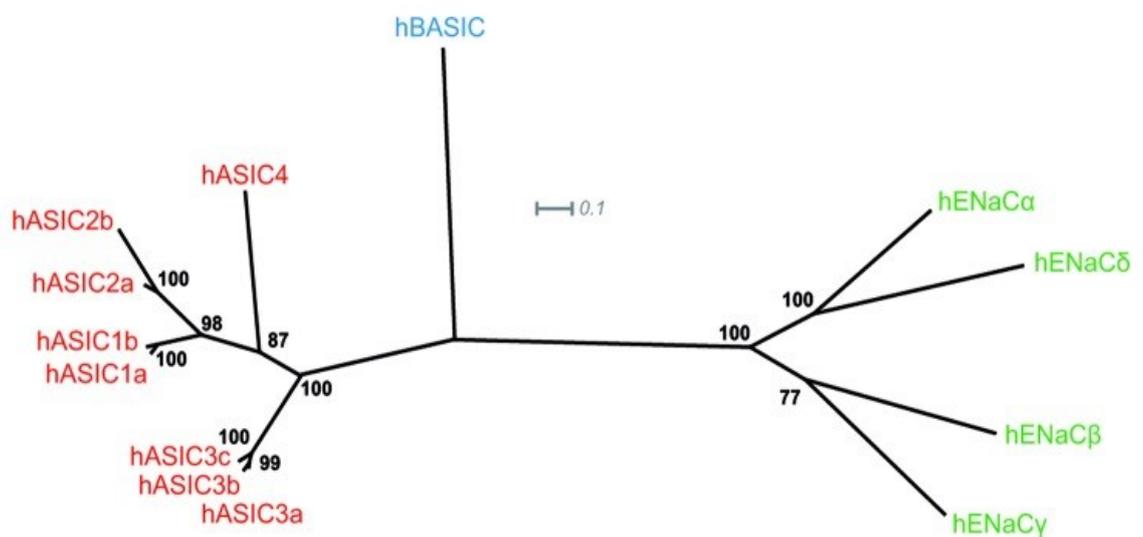


Abbildung 1: BASIC stellt eine Subgruppe innerhalb der DEG/ENaC-Genfamilie dar (Wiemuth et al., 2011).

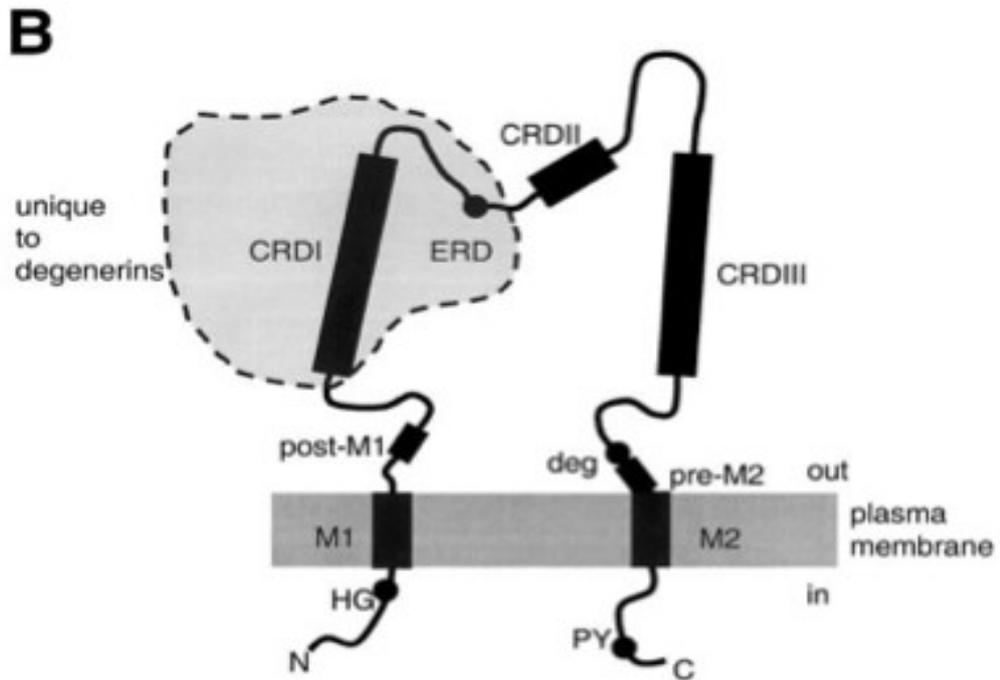


Abbildung 2: Schematische Darstellung einer DEG/ENaC-Untereinheit (Kellenberger & Schild, 2002).

1.1.1 *C. elegans* Degenerine

In *Caenorhabditis elegans* kommen mechanosensitive Kanäle vor, die an der Signaltransduktion von mechanischen Kräften, wie z.B. Strecken, Beugen und Druck, bei zellulären Antworten beteiligt sind. Somit stellen sie die primären Mediatoren des Tastsinnes (Gu et al., 1996; Tavernarakis et al., 1997; Chalfie et al., 1989) und der Propriozeption (Tavernarakis et al., 1997) dar.

Mit Hilfe verschiedener Untersuchungen wurden Gene isoliert, die benötigt werden, um mechanische Kräfte wahrzunehmen. Sie enthalten zum einen die Untereinheiten, die notwendig sind, um den mechanosensitiven Kanalkomplex zu bilden. Zum anderen enthalten sie die Moleküle, die benötigt werden, um die extrazelluläre Matrix zu bilden und schließlich die beiden Arten von Tubulin, die zur Bildung der 15-Protofilament-Mikrotubuli benötigt werden und einige Gene, deren Funktionen noch unbekannt sind.

Die Gene MEC-4 und MEC-10 und die durch sie kodierten Proteine sind an der Bildung des 'touch-transducing-Komplexes' beteiligt (Gu et al., 1996; Tavernarakis et al., 1997). Interessanterweise sind MEC-4 und MEC-10 Degenerine und gehören somit zur DEG/ENaC-Familie. Es wird angenommen,

dass die extrazellulären Domänen dieser beiden Untereinheiten über MEC-5 Kollagen und/oder über MEC-9 mit der extrazellulären Matrix verbunden sind. Die intrazellulären Domänen sollen mit 15 Protofilament Mikrotubuli verbunden sein. Diese Mikrotubuli bestehen aus MEC-12 α -Tubulin, MEC-7 β -Tubulin (Savage et al., 1989; Fukushige et al., 1999) und dem MEC-2 Linkerprotein (Huang et al., 1995).

Die Gene UNC-8 und DEL-1 sind ebenfalls Degenerine und scheinen wichtig für die Propriozeption zu sein (Tavernarakis et al., 1997). Es wird vermutet, dass die beiden Gene UNC-8 und DEL-1 die Untereinheit für einen Kanal bilden, der den Kern des 'mechano-transducing Komplexes' bildet (Tavernarakis et al., 1997).

1.1.2 Hydra Na⁺ channels (HyNaCs)

Diese Subfamilie der DEG/ENaC Superfamilie konnte im Süßwasserpolyphen *Hydra magnipapillata* nachgewiesen werden. Sie können durch zwei endogene Neuropeptide HydraRF Amid I und II aktiviert werden (Golubovic et al., 2007). Diese binden direkt an die Kanäle und öffnen sie. Bisher wurden zwölf Untereinheiten des HyNaC entdeckt (HyNaC 1-12) (Assmann & Gründer, 2014). Die Homologie in der Aminosäuresequenz der Untereinheiten variiert zwischen 29 % und 65 %. Die Ausnahme bildet HyNaC 12, das nur zu 14 % bis 17 % den anderen HyNaCs ähnelt (Assmann & Gründer, 2014). HyNaC 3 und 4 sind zu ca. 60 % homolog, wobei HyNaC 2 nur zu ca. 28 % homolog ist mit HyNaC 3 und 4. HyNaC 3 und HyNaC 11 sind zu 85 % homolog. Phylogenetische Analysen haben gezeigt, dass HyNaC 2 bis HyNaC 11 eine Gruppe eng verwandter Kanäle innerhalb der DEG/ENaC Genfamilie bilden. Sie bilden auch eine monophyletische Gruppe mit ASIC und BASIC. Dabei sind HyNaC 6 und HyNaC 7 eng verwandt mit HyNaC 2 und HyNaC 5, wohingegen HyNaC 8 bis HyNaC 11 mit HyNaC 3 und HyNaC 4 eng verwandt sind und somit zwei Subgruppen innerhalb des HyNaC-Zweigs bilden (Assmann & Gründer, 2014). Es wird auch angenommen, dass es sich bei HyNaC 1 um ein Pseudogen handelt, da sowohl das konservierte N-terminale HG-Motiv der DEG/ENaC Kanalfamilie als auch ein für die Translation wichtiges Methionin fehlen. Außerdem wurde festgestellt, dass HyNaC 2 bis HyNaC 12 die gesamte

DEG/ENaC Genfamilie im Süßwasserpolyphen *Hydra magnipapillata* bilden (Assmann & Gründer, 2014). Die Expression der HyNaCs in Epithelzellen an der Basis der Tentakel und am Stiel lässt vermuten, dass sie eine Rolle in der neuromuskulären Transmission spielen (Assmann & Gründer, 2014).

1.1.3 Epithelial Na⁺ channel (ENaC)

Der epitheliale Natriumkanal (ENaC) ist ein Na⁺-selektiver Ionenkanal und kommt in vielen Epithelien des Körpers vor. ENaC trägt zu einer Vielzahl physiologischer Prozesse bei, dazu gehören die Regulation des Salz- und Wasserhaushalts, des Blutdrucks und die Aufrechterhaltung eines dünnen Flüssigkeitsfilmes, der die Oberfläche der Lungenepithelien bedeckt. ENaC Kanäle setzen sich in der Regel aus den Untereinheiten α , β und γ -ENaC (Canessa et al., 1993/1994) zusammen. Eine vierte Untereinheit, δ -ENaC, kann die α -Untereinheit ersetzen. Die physiologische Funktion des ENaC-Kanals aus den Untereinheiten δ -, β - und γ -ENaC ist bisher aber nicht bekannt.

Der transepitheliale Natriumtransport mittels ENaC ist eine der Haupttriebkraft für den Transport von Wasser über Epithelien. Somit ist auch zu erklären, dass diese Ionenkanäle überall im Körper vorkommen, wo ein regulierter Salz- und Flüssigkeitstransport erfolgen muss. In der Niere ist der transepitheliale Natriumtransport notwendig, um den Salz- und Wasserhaushalt des Körpers zu regulieren. Bei Salz- oder Wassermangel werden hormonelle Regulationsmechanismen eingesetzt. So hat der Körper die Möglichkeit, sowohl kurzfristig mit ADH als auch langfristig mit Aldosteron die Aktivität der ENaCs zu regulieren. Beide Mechanismen führen zu einem gesteigerten Natriumtransport, der die Resorption von Chlorid und Wasser zur Folge hat (Hansson et al., 1995; Lifton, 1995; Schild et al., 1995).

Der transepitheliale Natriumtransport bestimmt auch maßgeblich den Blutdruck, da das resorbierte Wasser dem Blut zugeführt wird. Somit ist das ENaC-Gen ein bekannter Faktor bei der Entstehung von Bluthochdrücken, wie bei der seltenen vererbaren Form von Bluthochdruck, dem Liddle-Syndrom (Hansson et al., 1995; Lifton, 1995; Schild et al., 1995). Hierbei führt eine Mutation im ENaC-Gen dazu, dass der Kanal nicht aus der Zellmembran entfernt werden kann. Die somit permanent verstärkte Natrium- und letztlich

Wasserresorption führt zu einer Zunahme des Blutvolumens und damit zu chronischem Bluthochdruck.

In der α - und β -ENaC Untereinheit liegt das PY-Motiv am cytoplasmatischen C-Terminus, was das Ziel für die schnelle Degradation über den Ubiquitin Signalweg ist. Dies führt zur Verringerung der Oberflächenexpression der ENaC-Kanäle (Staub et al., 1996/1997). Ist das PY-Motiv mutiert, so kann es durch die erhöhte Oberflächenexpression und Aktivität der ENaCs zu Erkrankungen wie dem Liddle-Syndrom kommen (Hansson et al., 1995). ENaCs können durch verschiedene regulatorische Mechanismen, wie PKA/cAMP, PKC, Ca^{2+} und G-Proteine reguliert werden (Garty et al., 1997). Die Kanäle sind permeabel für kleine Kationen wie Na^+ und Li^+ , jedoch nicht für größere Kationen wie K^+ , NH_4^+ oder divalente Kationen (Benos, 1982; Palmer, 1982). Somit wird die Selektivität unter anderem durch die Größe der Kationen bestimmt.

1.1.4 Acid-sensing ion channel (ASIC)

ASICs sind Protonen-sensitive Kationenkanäle. Sie wurden basierend auf ihrer Homologie zu den DEG/ENaC Kanälen kloniert. Bisher wurden 6 Proteine der ASIC-Familie identifiziert, die von 4 Genen ausgehen: ASIC 1a und 1b entstehen aus dem ASIC1 Gen, ASIC2a und 2b aus dem ASIC 2 Gen, ASIC3a, 3b und 3c aus dem ASIC3 und dem ASIC4. Alle ASICs werden im peripheren Nervensystem exprimiert, wobei ASIC 1a, 2a, 2b und 4 auch im zentralen Nervensystem exprimiert werden (Biagini et al., 2001; Waldmann & Lazdunski, 1998). Dabei zeigen ASIC 1a, 2a und 2b ihre höchsten Expressionslevels im Hippocampus, Cerebellum, Neo- und Allocortex, *Bulbus olfactorius*, Habenulae und im basolateralen *Amygdala Nucleus* (Biagini et al., 2001; Waldmann & Lazdunski 1998). ASIC4 wird nicht nur in vielen Arealen des Gehirns exprimiert (Akopian et al., 2000; Gründer et al., 2000), sondern auch in der Hypophyse (Gründer et al. 2000). ASICs sind in verschiedene neuronale Prozesse einschließlich Nozizeption, Mechano- und Chemosensitivität, Neuromodulation und Degeneration involviert. Auch spielen sie eine Rolle bei Lern- und Gedächtnisfunktionen im ZNS und beim Angstverhalten (Reeh & stehen, 1996; Waldmann et al., 1997/1998). ASICs sind genau wie ENaCs permeabel für Na^+

und Li^+ , im Gegensatz zu ENaC zeigt ASIC1a auch eine Permeabilität für Ca^{2+} (Yermolaieva et al., 2004).

Durch die Senkung des extrazellulären pH-Werts entsteht ein depolarisierender H^+ -gesteuerter Strom. Dieser reicht unter Umständen aus, um Aktionspotenziale in ASIC exprimierenden Zellen auszulösen und somit diese Kanäle zu aktivieren (Varming, 1999).

Es gibt viele Proteine, die die Expression von ASICs und ihre elektrophysiologischen Eigenschaften modulieren können. Dazu gehört PICK 1 (*Protein-interacting with C-Kinase*), bei dem es sich um ein scaffolding Protein handelt, das an die verschiedensten Membranproteine bindet und deren subzelluläre Lokalisation reguliert (Boila A. et al., 2012). Die Interaktion von ASIC1a und 2 mit PICK 1 über die PDZ-Domäne wird durch die Proteinkinasen A (PKA) und C (PKC) reguliert und führt zu einer erhöhten Oberflächenexpression der ASICs (Duggan et al., 2002, Hruska-Hageman et al., 2002). Auch Stomatin und SLP3 (Stomatin-like Protein 3) interagieren mit ASIC 1a, 2a und 3 (Price et al., 2004; Wetzen et al., 2007; Lapatsina et al., 2012). Stomatin ist ein integrales Membranprotein, das in der Zellmembran der Erythrozyten und anderer Zelltypen lokalisiert ist und dort die Ionenkanäle und den Transporter reguliert (Yokoyama, 2010). In Bezug auf ASIC beschleunigt Stomatin die Desensibilisierung von ASIC2a und reduziert den Strom von ASIC3 stark (Price et al., 2004; Wetzel et al., 2007; Lapatsina et al., 2012). SLP3 ist ein Mitglied der Stomatin-Familie und wird in sensorischen Geruchsneuronen exprimiert, in denen es eine Rolle beim Zusammenfügen, in der Translokation oder bei der Funktion des Geruchstransduktions-Komplexes spielen könnte (Goldstein et al., 2003). Durch SLP3 wird der Strom von ASIC2a reduziert, ohne die Oberflächenexpression des Kanals zu verändern (Price et al., 2004; Wetzel et al., 2007; Lapatsina et al., 2012). CIPP (*channel-interacting PDZ domain Protein*) und Lin-7b interagieren mit ASIC 3. CIPP wird ausschließlich im Gehirn und in der Niere exprimiert. Dieses Protein könnte als scaffolding Protein dienen, das strukturell unterschiedliche, aber funktionell verknüpfte Proteine in die Nähe der Synapse bringt (Kurschner et al., 1998). CIPP interagiert über seine PDZ Domäne und moduliert durch eine Erhöhung von funktionellen Kanälen an der Zelloberfläche die Stromdichte (Anzai et al., 2002). Lin-7b ist am Erstellen und Aufrechterhalten der asymmetrischen Verteilung der Kanäle

und Rezeptoren an der Plasmamembran von polarisierten Zellen beteiligt. Im Zusammenhang mit ASIC erhöht es die Oberflächenexpression und die Stromamplitude von ASIC3 (Hruska-Hageman et al., 2004). Genau wie bei den anderen Subfamilien der DEG/ENaC-Superfamilie haben Amilorid und nicht-steroidale anti-inflammatorische Wirkstoffe wie Diarylamidine eine inhibierende Wirkung auf ASICs (Voilley et al., 2001).

1.2 Bile acid-sensitive ion channel (BASIC)

Im Menschen finden sich neun Gene, die für DEG/ENaC Kanalproteine codieren. Vier Gene codieren für Untereinheiten des ENaCs, weitere vier für die ASICs und ein Gen codiert für den *brain liver intestine Na⁺ channel* (BLINaC) (Wiemuth et al., 2014). Die Funktion von BLINaC ist bisher völlig unbekannt. Lediglich die Expression der mRNA konnte für Gehirn, Leber und Intestinaltrakt nachgewiesen werden (Sakai et al., 2000). Das humane Homolog intestine Na⁺ channel (INaC) wird nur im Dünndarm exprimiert (Schaefer et al., 2000). Obwohl BLINaC aus Maus und Ratte (mBLINaC und rBLINaC) zu 97 % identisch sind, unterscheiden sie sich in ihren elektrischen Merkmalen voneinander. rBLINaC und INaC sind inaktiv, wohingegen mBLINaC konstitutiv aktiv ist (Wiemuth & Gründer, 2011). rBLINaC kann durch eine physiologische Konzentration von Ca²⁺ geblockt werden, wohingegen mBLINaC eine 250-fach geringere Affinität für Ca²⁺ aufweist, was die konstitutive Aktivität erklärt (Wiemuth & Gründer, 2011). Hierbei geht man davon aus, dass das *gating* Verhalten von ASIC Hinweise über das *gating* Verhalten von BASIC gibt. Bei ASIC konkurrieren extrazelluläres H⁺ und Ca²⁺ um die Bindungsstelle an ASIC und die vollständige Entfernung von extrazellulärem Ca²⁺ öffnet ASIC (Wiemuth & Gründer, 2010). mBLINaC ist selektiv für Na⁺, wohingegen rBLINaC unselektiv für monovalente Kationen ist (Wiemuth & Gründer 2010). rBLINaC und INaC haben eine geringe Sensitivität für das Diuretikum Amilorid, während mBLINaC eine 700-fach höhere Sensitivität für Amilorid besitzt. Die molekulare Ursache für all diese Unterschiede konnte auf eine einzelne Aminosäure eingegrenzt werden (Alanin 387 in Ratte bzw. Serin 387 in Maus BLINaC) (Wiemuth & Gründer, 2010).

Die Inhibition durch das Diuretikum Amilorid ist ein wichtiges Merkmal aller

DEG/ENaC-Kanäle. Wie bereits erwähnt wurde, zeigen BASIC von Maus, Ratte und Mensch interessante Unterschiede, es gibt aber auch pharmakologische Gemeinsamkeiten. Sie können alle durch Diminazen und Nafamostat inhibiert werden, wobei die Inhibition spannungsabhängig ist (Schaefer et al., 2000). Fenamate, insbesondere Flufenaminsäure (FFA), sind reversible Aktivatoren für rBLINaC und erhöhen bei der Aktivierung auch dessen Na⁺-Selektivität (Schaefer et al., 2000).

Da sowohl rBLINaC als auch der humane INaC inaktiv sind und eine starke Homologie mit den Liganden-gesteuerten HyNaCs und den Protonen-gesteuerten ASICs aufweisen wurde angenommen, dass beide durch extrazelluläre Aktivatoren aktiviert werden können. Diese Aktivatoren konnten als Gallensäuren identifiziert werden (Wiemuth et al., 2012).

Gallensäuren sind Abkömmlinge des Cholesterins, die durch Hydroxilierungsreaktionen und oxidative Verkürzungen in Hepatozyten der Leber gebildet werden (Hofmann, 2008/2009). Galle besteht vorwiegend aus Wasser und organischen Substanzen wie Gallensäuren, Gallenfarbstoffen, Fettsäuren, Lecithin, Cholesterin, Proteinen, Peptiden und anorganischen Ionen einschließlich Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Cl⁻ und HCO₃⁻. Nach Zwischenlagerung in der Gallenblase werden die Gallensäuren über die Gallengänge ins Duodenum abgegeben, wo sie die Lipolyse und Resorption der Fettsäuren unterstützen. Im Ileum und proximalen Colon werden die Gallensäuren fast komplett resorbiert und zur Leber zurückgeleitet. Die Zusammensetzung der Galle unterscheidet sich je nach Spezies. Schweinegalle setzt sich v. a. aus Hyodesoxycholsäure (HDCA) zu 50-70 % und Chenodesoxycholsäure (CDCA) zu 20-30 % zusammen (Haslewood, 1971; Qiao et al., 2011). Rattengalle beinhaltet vermehrt Cholsäure (CA), β-Muricholsäure (β-MCA) und Hyodesoxycholsäure (HDCA), wohingegen CDCA und Desoxycholsäure (DCA) geringere Bestandteile sind (Sakakura et al., 1993). Humane Galle besteht vor allem aus CA und CDCA (Fisher & Youssef, 1973; Setchell et al., 1997). rBLINaC kann durch HDCA und CDCA aktiviert werden. Dabei ist HDCA schwach hydrophil und CDCA schwach hydrophob und zusammen haben sie einen synergetischen Effekt auf die Aktivität von rBLINaC (Wiemuth et al., 2012). Andere Gallensäuren, wie β-MCA und CA, haben geringere Effekte. Da BLINaCs sind ähnlich wie ASICs oder HyNaCs Liganden-gesteuerte

Vertreter der DEG/ENaC- Familie. Weil deren Gewebeexpression nicht benannt ist, wurde vorgeschlagen, BLINaC in *bile acid-sensitive ion channel* (BASIC) umzubenennen (Wiemuth et al., 2012).

1.3 Trafficking von Membranproteinen in Zellen

Etwa ein Drittel aller im humanen Genom kodierten Proteine sind Membranproteine, von denen die meisten Rezeptoren, Ionenkanäle oder Transportproteine sind. Die Synthese von Membranproteinen erfolgt am rauen endoplasmatischen Retikulum (rER), genau genommen an den Ribosomen, die an das ER gebunden sind. Der intrazelluläre Transport von Membranproteinen erfolgt über den sogenannten 'sekretorischen Weg'. Dabei werden die Membranproteine translatiert, gefaltet, modifiziert und über das ER, das ER-Golgi-Intermediärkompartiment (ERGIC) und den Golgi-Apparat zur Plasmamembran transportiert (Abb. 3).

Der intrazelluläre Transport von Membranproteinen beginnt mit ihrer Insertion in die ER-Membran, die durch ein hydrophobes, abspaltbares Sortierungssignal (Signalpeptid) im N-terminalen Bereich der Membranproteine, vermittelt wird (Brodsky, 1998). Während der initial zytosolischen Translation bindet der Signalerkennungspartikel (SRP = *Signal Recognition Particle*) an das Signalpeptid (Walter & Blobel, 1981), was zu einem Stop bzw. einer deutlichen Verlangsamung der Translation führt. Danach führt der SRP den Komplex aus Ribosom, naszierender Polypeptidkette und SRP zur Membran des ER, auf der der SRP an den membranständigen SRP-Rezeptor bindet und das Ribosom mit dem Translokationsapparat in der ER-Membran interagiert. So wird die Translation an der ER-Membran fortgesetzt und der SRP durch GTP-Hydrolyse freigesetzt. Dabei wird die naszierende Polypeptidkette aus dem Sec 61-Komplex, was der wichtigste Bestandteil des Translokationsapparats ist (Görlich et al., 1992), in die ER-Membran freigesetzt.

Im Lumen des ER wird die Polypeptidkette weiter prozessiert (Gilmore & Blobel, 1983), indem kotranslational O- und N-Glykosylierungen angefügt und Disulfidbrücken geknüpft werden. Glykosylierungen gehören zu den häufigsten chemischen Modifikationen von sezernierten Proteinen und Membranproteinen. Sie erhöhen die Hydrophilität des Proteins und sorgen unter anderem für die

Zell-Zell-Erkennung und die Adhäsion von Zellen. Während der Proteinsynthese überwacht ein Qualitätskontrollsystem die korrekte Faltung. Dabei werden Proteine, die nicht ihre native Struktur erreichen, retiniert und dem ER-assoziierten Degradationsweg (ERAD) zugeführt. Korrekt gefaltete Proteine werden von Transportvesikeln aus dem ER über das ERGIC und den Golgi-Apparat zu ihrem Zielkompartiment transportiert.

ERGIC ist ein tubovesikuläres Intermediat zwischen ER und Golgi-Apparat. Es dient einerseits der Sortierung der zu transportierenden Proteine und ist andererseits in die Qualitätskontrolle involviert (Appenzeller-Herzog et al., 2006).

Der Golgi-Apparat ist aus Stapeln von Membranzisternen zusammengesetzt. Die Vesikel, die das Protein enthalten, werden vom cis-Golgi-Netzwerk, das dem ER zugewandt ist, empfangen und weiter modifiziert. Je nach Bestimmungsort werden Glykosylierungen unterschiedlicher Länge an das Protein angeknüpft. Die komplett prozessierten und reifen Proteine werden durch das trans-Golgi-Netzwerk, das der Plasmamembran zugewandt ist, in verschiedene Vesikel sortiert und ihrem Zielort (Plasmamembran, Endosomen, Lysosomen) zugeführt. Der Golgi-Apparat ist auch die letzte bekannte Station für die Qualitätskontrolle. Hierbei werden die fehlgefalteten Proteine über ein retrogrades Transportsystem zum ER zurückgeführt und dem ERAD zugeführt. Das Qualitätskontrollsystem besteht aus Chaperonen und Enzymen, die sowohl die korrekte Proteinfaltung unterstützen als auch Fehlfaltungen erkennen. Chaperone sind Proteine, die mit Glykosylierungen noch ungefalteter Proteine oder mit hydrophoben Gruppen interagieren und so kotranslational bei der Faltung helfen und Aggregationen verhindern. Proteine, die ihre native Struktur nicht erreichen können, werden verlängert von den Chaperonen gebunden und dem Abbau zugeführt (Schüle, 2004. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Springer Verlag, Volume 151).

Wie bereits erwähnt sind Plasmamembran, Endosomen und Lysosomen die Zielorte der reifen Proteine. Beim Endosom unterscheidet man das frühe vom späten Endosom. Moleküle können entweder direkt vom Trans-Golgi-Netzwerk oder durch die rezeptorvermittelte Endozytose zum Endosom gelangen. Bei der rezeptorvermittelten Endozytose binden Moleküle an spezifische Rezeptoren in der Zellmembran. Die Ligand-Rezeptor-Komplexe bilden eine Vertiefung, an

deren Innenseite sich ein Gitter aus Clathrinmolekülen anlagert (*clathrin coated vesicle*). Dynamin legt sich um das Vesikel und führt unter GTP-Hydrolyse die Ablösung des Vesikels von der Zellmembran durch. Das seiner Hülle beraubte Vesikel wird frühes Endosom genannt und ist durch das kleine G-Protein Rab 5 charakterisiert. Das frühe Endosom fusioniert mit bestimmten Vesikeln zum späten Endosom, das einen erniedrigten pH-Wert von pH 5-6 im Inneren hat und dadurch zur Dissoziation von Rezeptoren und Liganden führt. Das späte Endosom ist durch das G-Protein Rab 7 charakterisiert. Die Rezeptoren konzentrieren sich in den Ausstülpungen, von denen aus sich kleine Vesikel mit Rezeptoren abschnüren, die sogenannten Recycling-Endosome, die durch das G-Protein Rab 11 gekennzeichnet sind. Dadurch werden die Rezeptoren recycelt und wieder in die Plasmamembran eingebaut. Das verbleibende Vesikel verschmilzt die Lysosomen mit den Liganden, die durch das Protein Lamp 1 charakterisiert sind, und wird durch lysosomale Enzyme abgebaut (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1999).

Im Gegensatz zu BASIC ist bei den anderen Subfamilien der DEG/ENaC-Kanalfamilie schon einiges über deren Trafficking-Verhalten bekannt.

Die Anzahl und Funktion der ASIC-Rezeptoren in der Plasmamembran ist teilweise durch die dynamischen trafficking-Prozesse determiniert, bei denen es zum einen um die Sortierung und das *'forward trafficking'* der Rezeptoren vom ER über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran geht. Zum anderen geht es um die Endozytose der Oberflächen-Rezeptoren, die Umsortierung der Rezeptoren im Anschluss an die Endozytose, das Recycling der Rezeptoren zurück zur Plasmamembran und um die Beförderung der Rezeptoren zur Degradation (Zeng et al., 2014). Außerdem sind die N-Glykolisierungen im Golgi-Apparat wichtig für die korrekte räumliche Verteilung und Kanalfunktion des ASICs. Dies verdeutlicht, dass die Prozesse, die die Proteinreifung während des sekretorischen Weges kontrollieren, eine wichtige Rolle bei der Regulation der Funktion von ASIC spielen (Zha, 2013).

Auch die Reifung der ENaCs beinhaltet das Durchlaufen des Golgi-Komplexes mit den dazugehörigen Asparagin-verknüpften Glykosylierungen, sodass das reife Protein zur apikalen Oberfläche der Epithelzellen wandert (Butterworth et al., 2011).

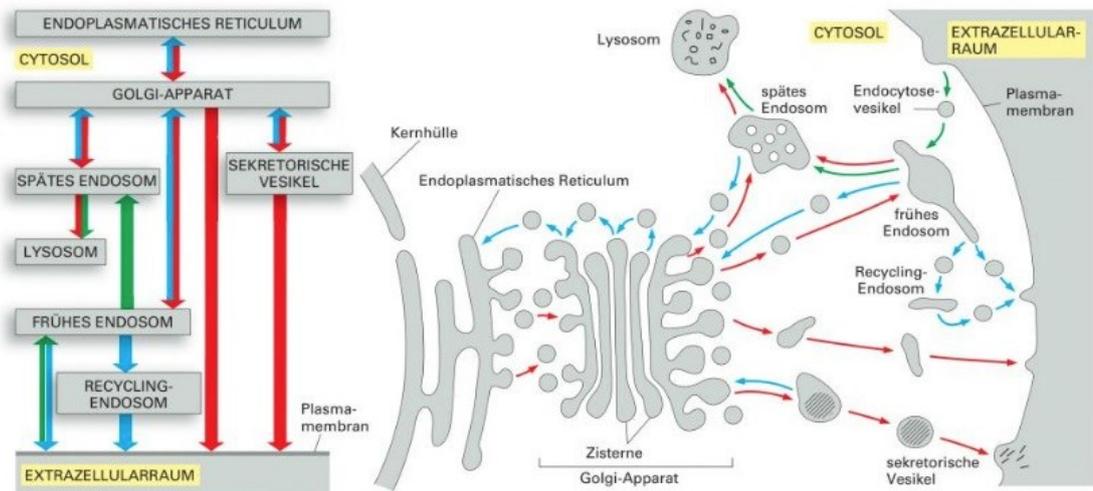


Abbildung 3: Schematische Darstellung des intrazellulären Transports von Membranproteinen „sekretorischer Weg“ (Aus: Bruce Alberts et al., Molekularbiologie der Zelle, 6. Auflage, S. 786, Kapitel 13)

1.4 Fragestellung

Im heterologen Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten konnte bisher gezeigt werden, dass BASIC durch Gallensalze aktiviert wird, was zu einem Kationeneinstrom führt. In anderen heterologen Expressionssystemen jedoch, wie zum Beispiel CHO oder HEK 293 Zellen, konnte dieser Aktivierungsmechanismus bisher nicht nachgewiesen werden. Als mögliche Ursache kommt eine unzureichende Plasmamembran-Lokalisation in Betracht. Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, die subzelluläre Lokalisation von BASIC herauszufinden.

Hierfür wurden fluoreszenz-markierte BASIC-Konstrukte in HEK 293- und CHO-Zellen transfiziert und im konfokalen Laserscanning-Mikroskop untersucht, wobei ein retikuläres Verteilungsmuster beobachtet werden konnte.

Um festzustellen, um welches Zellorganell es sich hierbei handelt, wurden die fluoreszenzmarkierten BASIC-Konstrukte und die verschiedenen Zellorganellen mit Antikörpern gefärbt oder mit fluoreszenzmarkierten Organellmarkern kof transfiziert. Die anschließende Analyse erfolgte am konfokalen Laserscanning-Mikroskop.

Für die genauere Untersuchung der Motive, die für diese Verteilung verantwortlich sind, wurden die Amino- und Carboxy-Termini schrittweise

trunkiert. Diese Konstrukte wurden auch in die heterologen Zelllinien HEK293 und CHO-Zellen transfiziert und im konfokalen Laserscanning-Mikroskop untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben wurden Feinchemikalien für die Elektrophorese von Bio-Rad (München), Zellkulturmedien und -zusätze von Gibco/Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) und weitere Chemikalien sowie Verbrauchsmaterialien von Roth (Karlsruhe) bzw. Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo, USA) verwendet. Für das Ansetzen von Lösungen wurde steriles Reinstwasser verwendet.

2.1.2 Materialien für molekularbiologische Methoden

Ready to use Materialien:

RedSafe DNA-staining dye	Chembio, Medford, NY, USA
1kB GeneRuler DNA-ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, DE
dNTPs	Carl Roth, Karlsruhe, DE

Enzyme:

KAPA HiFi DNA-Polymerase	Peqlab, Erlangen, DE
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA

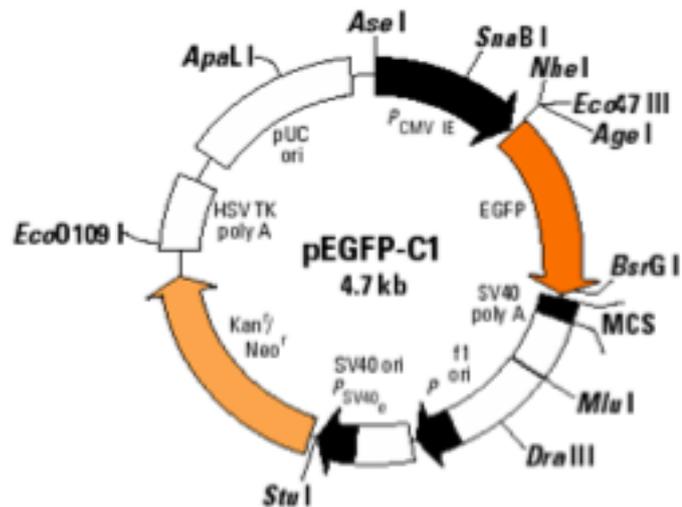
Plasmidvektoren:

Alle Konstrukte, welche für die Transfektion in HEK293-Zellen und CHO-Zellen verwendet wurden, sind zunächst in die Vektoren pEGFP-C1 oder pEGFP-N1 kloniert worden. Die Größe des Vektors beträgt 4,7 kB. Außerdem beinhaltet der Vektor eine Kanamycin Resistenz für die Selektion positiv transformierter E. Coli.

Tabelle 1: Informationen über die Vektoren pEGFP-C1 und pEGFP-N1

Name	Größe (bp)	Plasmidtyp	Promoter	5'Primer	Resistenzgen	Selektionsmarker	Quelle
pEGFP-C1	4700	Expression in Säugetieren	CMV	EGFP-C	Kanamycin	Neomycin	Clontech
pEGFP-N1	4700	Expression in Säugetieren	CMV	EGFP-N	Kanamycin	Neomycin	Clontech

pEGFP-C1:



pEGFP-N1:

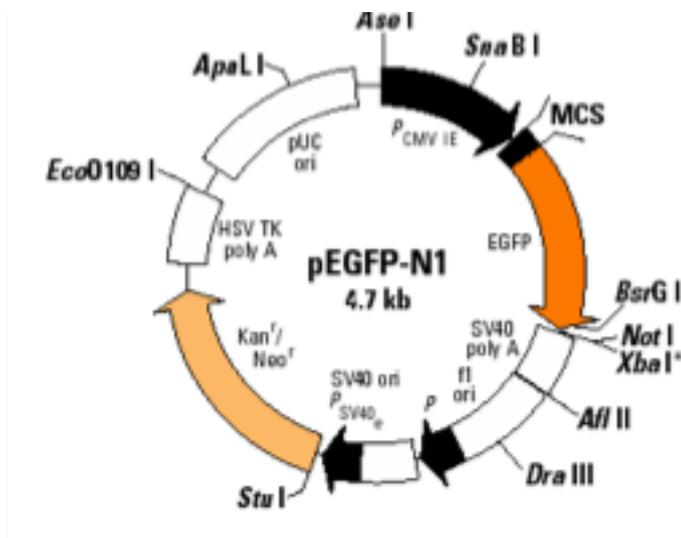


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Vektoren pEGFP-C1 und pEGFP-N1. (mit freundlicher Genehmigung von Nova lifetech Inc.)

GFP (*green fluorescent protein*) ist ein Protein aus der Qualle *Aequorea victoria*, was bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht grün fluoresziert. Der Vorteil liegt darin, dass durch die Fluoreszenz des GFP die räumliche und zeitliche Verteilung des BASIC in lebenden Zellen direkt beobachtet werden kann. Das Anregungsmaximum liegt bei 475 nm und die Emissionswellenlänge bei 509 nm. GFP kann sowohl C- als auch N-terminal mit anderen Proteinen fusioniert werden, ohne dass die Fluoreszenz verlorengeht (Chalfie, 1995). Die Primärsequenz von GFP besteht aus 238 Aminosäuren (Ormo et al., 1996; Yang et al., 1996). Das grün fluoreszierende Protein hat eine Zylinderstruktur, das aus einer α -Helix und 11 β -Faltblättern besteht. Die β -Faltblätter umgeben die α -Helix, in der sich der Chromophor befindet. Die chromophore Eigenschaft ergibt sich durch die Ausbildung eines intramolekularen Imidazolrings der Aminosäurereste Serin 65-Tyrosin 66-Glycin 67 (Cody et al., 1993).

Top10 kompetente E. Coli:

Für alle Transformationsversuche wurden Top10 kompetente E. Coli Zellen (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) mit einer Transformationseffizienz von 10^9 cfu/ μ g verwendet.

Kits:

High Pure PCR Product Purification Kit

Roche, Mannheim, DE

High Pure Plasmid Isolation Kit

Roche, Mannheim, DE

2.1.3 Lösungen und Puffer für molekularbiologische Methoden

Agarosegel

30 ml oder 70 ml TAE-Puffer +
1 % Agarosepulver

50x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer)

242 g Tris-Base
57,1 ml Eisessig
100 ml 0,5 M EDTA
add H₂O auf 1 l

LB-Medium

10 g Trypton
5 g Hefe Extrakt
10 g NaCl
add H₂O auf 1 l, pH 7,5
durch Autoklavieren sterilisiert

Agarplatten

15 g/l Agarose
50 μ g/ml Kanamycin
add LB-Medium auf 1 l
durch Autoklavieren sterilisiert

2.1.4 Primer

Alle verwendeten Primer wurden bei MWG-Biotech AG, Ebersberg, DE bestellt und werden in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Tabelle 2: Liste aller in der Arbeit verwendeten Primer

Name	Sequenz	Verwendung
5' BASIC pEGFP- C1	5'TCTCGAGCTCAAGCTTtaATGG AACATACTGAG-3'	Quickchange 5'PCR Primer zur Entfernung des Stop Codons bei rBASIC cDNA und mBASIC cDNA, kloniert im Vektor pEGFPC1
3'rBASIC pEGFP- C1	5'TAGATCCGGTGGATCCCTAAA CTGTCTGAGG-3'	Quickchange 3'PCR Primer zur Entfernung des Stop Codons bei rBASIC cDNA, kloniert im Vektor pEGFPC1
3'mBASIC pEGFP- C1	5'TAGATCCGGTGGATCCTTAAA CTGCCTGAGG-3'	Quickchange 3'PCR Primer zur Entfernung des Stop Codons bei mBASIC cDNA, kloniert im Vektor pEGFPC1
5' BASIC N-trunc pEGFP- N1	5'gagctcgagctcAAGCTTaccaggAT GGGATACATAATATT-3'	Quickchange 5'PCR Primer zur Entfernung des Stop Codons bei rBASIC N-trunc cDNA und mBASIC N-trunc cDNA, kloniert im Vektor pEGFPN1
3'rBASIC pEGFP- N1	5'ggcgaccggtGGATCCcgAACTGT CTGAGGTGG-3'	Quickchange 3'PCR Primer zur Entfernung des Stop Codons bei rBASIC N-trunc cDNA, kloniert im Vektor pEGFPN1
3'mBASIC pEGFP- N1	5'ggcgaccggtGGATCCcgAACTGC CTGAGGTGG-3'	Quickchange 3'PCR Primer zur Entfernung des Stop Codons bei mBASIC N-trunc cDNA, kloniert im Vektor pEGFPN1

2.1.5 Materialien für zellbiologische Methoden

Ready to use Materialien:

X-treme Gene 9 DNA Transfection Reagent	Roche, Mannheim, DE
Mowiol	Sigma Aldrich, St. Louis, Mo, USA
Triton X-100	Sigma Aldrich, St. Louis, Mo, USA
DAPI	Roth, Karlsruhe, DE
Normal Goat Serum	PAN Biotech, DE

Lösungen für zellbiologische Methoden:

4 % Paraformaldehyd	10 g Paraformaldehyd
	50 g NaOH
	25 ml 10x PBS
	200 ml H ₂ O

Tabelle 3: Liste der in den Versuchen verwendeten Organellmarker mit RFP-Tag

Organellmarker mit RFP-Tag	Marker für...
pmRFP-C3-Rab 5	Frühe Endosomen
pmRFP-C3-Rab 7	Späte Endosomen
pDsRed-C1-Rab 11	Recycling-Endosomen
pmRFP-C3-Lamp 1	Lysosomen

Rab-Proteine (*Ras-related in brain*) gehören zur Ras-Superfamilie monomerer G-Proteine. Sie sind periphere Membranproteine, die eine spezifische subzelluläre Lokalisation aufweisen und eine Rolle bei der intrazellulären Vesikelsortierung spielen. Rab 5 ist im frühen Endosom lokalisiert und in die

Reifung der frühen Endosomen zu späten Endosomen involviert. Rab 7 ist in späten Endosomen lokalisiert und spielt eine wichtige Rolle beim Transport von späten Endosomen zu Lysosomen. Rab 11 befindet sich in Recycling-Endosomen und reguliert die Exozytose der Recycling-Vesikel an der Plasmamembran.

Lamp1 (*lysosomal-associated membrane protein 1*) ist ein Glykoprotein, welches im Lysosom lokalisiert ist. Es ist mitverantwortlich für das Aufrechterhalten der lysosomalen Integrität und des pH-Wertes.

Tabelle 4: Liste der in den Versuchen verwendeten Antikörper

Antikörper	Sekundärantikörper	Antikörper für...
anti-PDI	anti-rabbit AF633	Endoplasmatisches Retikulum
anti-Giantin	anti-rabbit AF633	Golgi-Apparat
anti-EEA1	anti-rabbit AF633	Frühe Endosomen

PDI (Protein-Disulfid-Isomerase) ist ein Enzym im endoplasmatischen Retikulum, das die Bildung und den Bruch von Disulfidbrücken während der Proteinfaltung katalysiert. Giantin ist ein Protein im Golgi-Apparat und in das Andocken der COP I-Vesikel an der Golgi-Membran involviert. EEA1 (*early endosome antigen 1*) ist ein hydrophiles und peripheres Membranprotein, das im frühen Endosom lokalisiert ist und eine wichtige Rolle beim endosomalen Trafficking spielt.

Dynamamin und Dynasore:

Dynamamin ist eine GTPase und in die Abschnürung neugebildeter Vesikel von der Membran eines Zellkompartiments involviert. Dabei bildet es eine spiralförmige Struktur um den Hals des abknospenden Vesikels. Es spielt auch eine Rolle beim Transport des Vesikels zur Membran und beim Verschmelzen mit der Membran des Golgi-Apparates oder der Zellmembran.

Dynasore ist ein Inhibitor von Dynamin.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion ist eine Methode, um DNA-Bereiche *in vitro* im größeren Umfang zu vervielfältigen. Der PCR-Prozess besteht aus 20 bis 30 Zyklen, wobei jeder Zyklus aus den drei Teilschritten Denaturierung, Annealing und Elongation besteht. Zunächst wird die doppelsträngige DNA in Einzelstränge aufgetrennt. Dafür wird sie für wenige Minuten auf 95 °C erhitzt, wodurch die Wasserstoffbrückenbindungen, die die Einzelstränge zusammenhalten, aufgebrochen werden. In der darauffolgenden Annealing-Reaktion lagern sich die Primer an die DNA-Sequenz an. Dabei wählt man die Annealingtemperatur vor allem nach der Sequenz der Primer und sie liegt meist zwischen 55 °C und 60 °C. Die Primerpaare stellen Startermoleküle dar und bestehen aus einem „forward“ und einem „reverse“ Primer, die spezifisch für den gewünschten DNA-Abschnitt hergestellt werden.

Dem Annealing folgt die Elongation bei einer Temperatur von 72 °C, wobei es sich um das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase handelt. Bei dieser Reaktion bindet die DNA-Polymerase am 3'-Ende des Primers und beginnt mit der Anlagerung von komplementären Basen von 3' nach 5'. So entsteht wieder eine doppelsträngige DNA, die der ursprünglichen Template-DNA exakt gleicht. Die Zeit für diesen Reaktionsschritt richtet sich nach der Länge des zu synthetisierenden DNA-Strangs.

Pipettierschema für eine Standard-PCR:

DNA-Template	1 µl
dNTPs	1,5 µl
5´-Primer	1,5 µl
3´-Primer	1,5 µl
5 x KAPA HiFi Polymerase Puffer	10 µl
DNA-Polymerase	1 µl
add H ₂ O	33,5 µl
 Reaktionsvolumen	 50 µl

Tabelle 5: PCR-Protokoll

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	300 s	1
Denaturierung	98 °C	20 s	20-30
Annealing	58 °C	20 s	
Elongation	72 °C	30 s/kb	
Finale Elongation	72 °C	180 s	1

Zur Kontrolle der PCR wurde nach dem Ablauf der Zyklen das PCR-Fragment auf ein Agarosegel aufgetragen und die DNA aus diesem aufgereinigt. Der Ablauf wird in den folgenden Abschnitten 2.2.1.2 und 2.2.1.3 näher erläutert.

2.2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung von Nukleinsäuren nach ihrer Größe, um ihre Größe und ihre Masse durch einen Vergleich mit Nukleinsäuren bekannter Größe zu bestimmen. Nach dem

Anlegen eines elektrischen Feldes bewegen sich die negativ geladenen Nukleinsäure-Moleküle durch die Gelmaschen in der Richtung des Pluspols. Da die kleineren Moleküle sich schneller durch das Gel bewegen können, erfolgt eine Auftrennung der Stränge nach ihrer Größe. Der Vernetzungsgrad des Gels wird je nach der Größe der zu trennenden Moleküle ausgewählt. Für die Herstellung des Gels wurde 1 % Agarose in 1x TAE-Puffer verwendet. Die Mischung aus Agarosepulver und TAE-Puffer wurde in der Mikrowelle erhitzt und dieser Mischung wurden dann 1,5 µl Red Safe DNA-staining dye pro 30 ml Gel hinzugefügt. Taschen, die den Startpunkt für die Wanderung der Moleküle darstellen, wurden durch Kunststoff Kämmen eingefügt. Nach der Bildung der Gelschicht wurden die Gele in Laufkammern (Bio-Rad) gelegt, die mit 1x TAE-Puffer als Laufpuffer aufgefüllt wurden. Die DNA-Proben wurden mit 6x Gel-Ladepuffer besetzt. Nach dem Verbinden der Laufkammern mit der Spannungsquelle (Power PaC 300, Bio-Rad) liefen die Gele bei 90 V für 20-30 Minuten. Danach wurden die DNA-Fragmente unter einer UV-Lampe (Gel Doc XR, Bio-Rad) sichtbar gemacht und mit der Quantity-One 4.6.1 (Bio-Rad) Software analysiert.

2.2.1.3 Aufreinigung der DNA-Fragmente

Die unter dem UV-Licht sichtbaren DNA-Banden wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Aufreinigung der DNA-Fragmente erfolgte mit dem High Pure PCR Purification Kit (Roche) nach dem Protokoll des Herstellers.

2.2.1.4 Klonierung

Das Ziel der Klonierung ist die Herstellung identischer Moleküle der DNA. Hierfür wird das DNA-Fragment in einen Vektor integriert.

Vektoren sind DNA-Moleküle und enthalten alle Strukturabschnitte, die benötigt werden, um sie in eine bakterielle Wirtszelle einzubringen und sie dort zu vermehren. Die am häufigsten verwendete Wirtszelle für Plasmidvektoren ist das Bakterium *Escheria coli*. Plasmidvektoren sind klein und daher leicht in die Empfängerzelle einzuschleusen. Außerdem können sie sich unabhängig vom Bakterienchromosom replizieren und gewährleisten dadurch eine starke

Vermehrung. Sie bestehen fast ausschließlich aus den für die DNA-Klonierung nötigen Sequenzabschnitten, einem Replikationsursprung, einem Resistenzgen und einer *multiple cloning site*: Wenn der Replikationsursprung kompatibel mit der Wirtszelle ist, dann kann das Plasmid unabhängig von der chromosomalen DNA repliziert werden; durch das Resistenzgen kann für das transformierte Bakterium eine Resistenz resultieren, während die nicht transformierten Bakterien absterben; die *multiple cloning site* ist ein DNA-Abschnitt, dessen Sequenz verschiedene Restriktionsschnittstellen für Restriktionsendonukleasen enthält und somit die Möglichkeit bietet, Fremd-DNA in das Plasmid einzubauen.

Für Klonierungsarbeiten wurden die folgenden Vektoren benutzt:

- 1) pEGFP-C1
- 2) pEGFP-N1

Klonierte Konstrukte:

rBASIC wt in pEGFP-C1
mBASIC wt in pEGFP-C1
rBASIC Δ N10 in pEGFP-C1
mBASIC Δ N10 in pEGFP-C1
rBASIC Δ N20 in pEGFP-C1
mBASIC Δ N20 in pEGFP-C1
rBASIC Δ N30 in pEGFP-C1
mBASIC Δ N30 in pEGFP-C1
rBASIC Δ N40 in pEGFP-C1
mBASIC Δ N40 in pEGFP-C1
rBASIC Δ C in pEGFP-C1
mBASIC Δ C in pEGFP-C1
rBASIC wt in pEGFP-N1
mBASIC wt in pEGFP-N1
rBASIC Δ N10 in pEGFP-N1
mBASIC Δ N10 in pEGFP-N1

rBASIC Δ N20 in pEGFP-N1
mBASIC Δ N20 in pEGFP-N1
rBASIC Δ N30 in pEGFP-N1
mBASIC Δ N30 in pEGFP-N1
rBASIC Δ N40 in pEGFP-N1
mBASIC Δ N40 in pEGFP-N1
rBASIC Δ C in pEGFP-N1
mBASIC Δ C in pEGFP-N1

2.2.1.5 Transformation von kompetenten E. Coli

Für die Aufnahme und die Vervielfältigung von DNA-Plasmiden wurden kompetente Top 10 E. Coli Bakterien (Invitrogen) verwendet. Die Bakterien wurden in 50 μ l Aliquots bei -80 °C gelagert. Um sie zu transformieren, wurden die Bakterien zunächst auf Eis aufgetaut. Danach wurden 30 μ l Plasmid-DNA hinzugefügt und die Mischung wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (42 °C für 45 Sekunden) wurden 250 μ l LB-Medium hinzugefügt und die Mischung wurde wiederum für 60 Minuten bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Die 50-100 μ l der Bakteriensuspension wurden anschließend auf Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika aufgetragen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden einzelne Klone für weiterfolgende Versuche gepickt.

2.2.1.6 Isolation der Plasmid-DNA

Zur Identifizierung positiver Kolonien wurden von der Agarplatte mit einem sterilen Zahnstocher Einzelkolonien gepickt und in 5 ml Antibiotikum-haltigem (5 μ l Kanamycin) LB-Medium bei 37 °C und 220 rpm über Nacht im Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurde die Kultur abzentrifugiert, das Pellet wurde mit dem High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) präpariert und die Plasmid-DNA wurde aufgereinigt.

2.2.1.7 DNA-Restriktionsverdau

Zur Analyse der durch die Plasmidpräparation gewonnenen DNA wurden 5 µg dieser DNA mit den Enzymen BamH1 und HindIII für 1,5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Dabei wurde die doppelsträngige DNA von den Restriktionsendonukleasen an spezifischen Stellen hydrolisiert. Anschließend konnte mittels Agarosegel-Elektrophorese das Muster der entstandenen Fragmente analysiert werden, weil durch diese Methode der Vektor und das Insert anhand ihrer unterschiedlichen Größen aufgetrennt wurden.

Folgender Standardansatz wurde verwendet:

Plasmid-DNA	5 µg
BamH1	2 µl
HindIII	2 µl
BSA (100x)	0,5 µl
10x Puffer	2 µl
ad H ₂ O	8,5 µl
Reaktionsvolumen	20 µl

2.2.1.8 Sequenzierung

Im Anschluss wurde die Konzentration des Plasmids bestimmt und sie wurde dann zur Sequenzierung an MWG Biotech geschickt.

2.2.2 Immunzytologische Methoden

2.2.2.1 Zellkultur

2.2.2.1.1 Kultivierung der Zellen

Für die Versuche wurden CHO-Zellen und HEK 293-Zellen verwendet. Als CHO-Zellen sind eine immortalisierte Zelllinie aus Ovarien des chinesischen Hamsters und HEK 293 Zellen sind menschliche embryonale Nierenzellen. Die Zellen wurden in Schalen mit 10 cm Durchmesser bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem Inkubator der Firma BINDER kultiviert. Für die Passage wurde das Nährmedium vorsichtig abgenommen und die Zellen wurden einmal mit 10 ml PBS (*phosphate buffered saline*) gewaschen. Durch Versetzen mit 1 ml Trypsin/EDTA wurden die Zellen abgelöst und zur Neutralisation wurden 9 ml des Nährmediums *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) mit einem Zusatz von 10 % FBS (*fetal bovine serum*) und 1 % Penicillin/Streptomycin beigemischt. Die abtrypsinieren Zellen wurden im Kulturmedium resuspendiert und eine bestimmte Menge dieser Suspension wurde in eine neue Schale mit DMEM überführt. Für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung wurden die Zellen in 35 mm-Schalen ausplattiert.

2.2.2.2 Transfektion

Die Transfektion ermöglicht es, Fremd-DNA in eine lebende Eukaryotenzelle einzuschleusen. Dabei ist die Zelle anhand der genetischen Information der eingeschleusten DNA in der Lage, das gewünschte Protein zu exprimieren. Die zu transfizierende DNA ist in der Regel in ein Vektorsystem eingebaut. Die negative Ladung der DNA und die ebenfalls negative Ladung der Zellmembran führen zu einer Abstoßungsreaktion, die mit Hilfe der Lipofektion umgangen werden kann. Bei der Lipofektion wird ein Komplex aus DNA und einem kationischen Lipid gebildet. Der resultierende DNA-Lipid-Komplex kann die Zellmembran dann endozytotisch passieren.

Es gibt zwei Arten der Transfektion, die stabile und die transiente Transfektion. Bei einer stabilen Transfektion wird die eingeschleuste DNA in das Genom der Wirtszelle aufgenommen, wohingegen bei der transienten Transfektion die

genetische Information der Fremd-DNA nicht ins Genom aufgenommen wird, sondern frei als Plasmid in der Zelle vorliegt. Außerdem geht bei der transienten Transfektion die genetische Information bei einer Teilung der Zellen verloren. Die transiente Zelltransfektion fand 24 Stunden nach Aussaat der Zellen statt. Als lipidhaltiges Transfektionsreagenz wurde Xtreme Gene 9 der Firma Roche (Mannheim, DE) verwendet. DMEM ohne Zusätze und Xtreme Gene 9 wurden mit der zu transfizierenden DNA versetzt. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde das Gemisch zu den mit PBS gewaschenen und mit Medium aufgefüllten Zellen in den 35 mm-Schalen tropfenweise pipettiert. Anschließend wurden die Schalen bei 37°C und 5% CO₂ in den Inkubator gestellt.

Für die 6-well-Platten wurde folgender Ansatz verwendet:

DMEM ohne Zusätze	100 µl
Xtreme Gene 9	4,5 µl
DNA	1,5 µg

Folgender Ansatz wurde verwendet:

DMEM ohne Zusätze	100 µl
Xtreme Gene 9	4,5 µl
DNA	1 µg
Organellmarker	1 µg

2.2.2.3 Färbung

In diesem Projekt wurden die Zellen angefärbt, um sie im Anschluss unter dem Fluoreszenzmikroskop analysieren zu können. Dafür wurden die Zellfärbung und die Antikörper-Färbung herangezogen.

Bei der Zellfärbung wurde der Zellkern mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) angefärbt, einem Fluoreszenzfarbstoff, der zur Markierung von DNA eingesetzt wird. Dieser Farbstoff lagert sich bevorzugt an AT-reiche Regionen in der kleinen Furche doppelsträngiger DNA an. Bei der Anregung mit ultraviolettem

Licht fluoresziert DAPI im sichtbaren Bereich mit blauer bis cyaner Farbe. Das Absorptionsmaximum liegt bei einer Wellenlänge von 358 nm, das Emissionsmaximum bei 461 nm.

Zum Fixieren der transfizierten Zellen wurde nach 48 Stunden das Medium aus den 35 mm Schalen abgenommen. Die Zellen wurden einmal mit PBS und anschließend einmal mit 4 % PFA gewaschen. Nach einem weiteren dreimaligen Waschen der Zellen mit PBS wurden die Zellkerne mit DAPI angefärbt, im Verhältnis 1:5000 mit PBS verdünnt. Pro well wurden 2 ml zugegeben und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgte ein Waschgang mit PBS. Anschließend erfolgte das Eindecken der Zellen mit 10 µl Mowiol. Nach dem Trocknen des Mowiol über Nacht bei Raumtemperatur wurden die Zellen im Fluoreszenzmikroskop analysiert und fotografiert.

Die Antikörper-Färbung ist eine Methode, bei der Proteine oder andere Strukturen mit Hilfe von spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht werden können. Der Nachweis beruht auf der Affinität von Antikörpern zu einem bestimmten Epitop, wobei es zu einer Antigen-Antikörper-Reaktion kommt. Das Epitop ist ein Bereich der Oberfläche des Antigens, an den der Primäantikörper bindet. Danach wird der Sekundäantikörper aufgetragen, der sich gegen den zuvor aufgebrauchten Primäantikörper richtet und mit einem Enzym gekoppelt ist, das sein Vorhandensein im Präparat sichtbar macht. Das Ziel besteht darin, ein ausreichend starkes Färbesignal im Areal des Epitops zu erreichen, während die nicht zum Epitop gehörenden Gewebeabschnitte möglichst ungefärbt bleiben sollen. So kann bestimmt werden, in welchem Gewebe oder auch in welchem Kompartiment der Zelle ein bestimmtes Protein lokalisiert ist. Die anfänglichen Waschvorgänge für die Antikörper-Färbung liefen genauso ab wie bei der Zellfärbung. Danach wurden die Zellen mit Hilfe einer Lösung aus PBS, 2 % Normal Goat Serum und 0,1 % Triton permeabilisiert. Nach dem Absaugen wurde der erste Antikörper, im Verhältnis 1:100 mit PBS und 2 % Normal Goat Serum verdünnt, hinzugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die Zellen mit PBS gewaschen und reblockiert wurden, wurde der zweite Antikörper in der Verdünnung 1:500 mit PBS und 2 % Normal Goat Serum hinzugegeben und die Mischung wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wieder gewaschen, die Kerne mit DAPI angefärbt und die Zellen mit Mowiol

eingedeckt.

2.2.2.4 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine Variante der Lichtmikroskopie. Hierbei wird sichtbares Licht absorbiert und ein Teil dieser Energie wird in der Form einer Strahlung emittiert, was als Fluoreszenz bezeichnet wird. Bestimmte Elektronen der fluoreszierenden Moleküle absorbieren dabei die Photonen und gelangen dadurch auf ein höheres Energieniveau. Die Elektronen fallen augenblicklich auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück und setzen dabei die aufgenommene Energie wieder frei. Es kommt zur Emission des Fluoreszenzlichts. Da jedoch die Energie nicht nur als Licht freigesetzt wird, ist das emittierte Licht etwas energieärmer als das Anregungslicht. Allerdings besitzt die energieärmere Lichtstrahlung eine größere Wellenlänge und daher auch eine andere Lichtfarbe als die energiereichere Lichtstrahlung. Das emittierte Fluoreszenzlicht besitzt oft eine um etwa 20-50 nm größere Wellenlänge als das Anregungslicht, was auch als Stokes-Differenz bezeichnet wird.

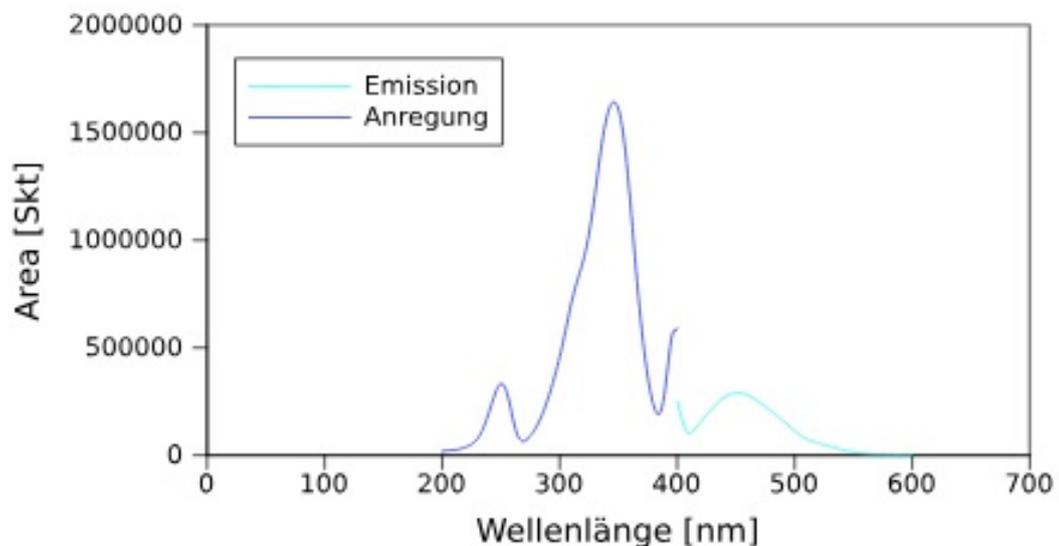


Abbildung 5: Fluoreszenzspektrum. (Aus: wikipedia.de)

Beim Fluoreszenzmikroskop werden als Lichtquellen Lampen mit sehr hoher Leuchtstärke verwendet. Durch einen Anregungsfilter wird nur der Teil des

erzeugten Lichts durchgelassen, der die für die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs notwendigen Wellenlängen enthält. Soll Fluoreszenz im Präparat nachgewiesen werden, wird ein dichroitischer Spiegel als Strahlteiler eingesetzt, der das Anregungslicht spiegelt, aber das Fluoreszenzlicht durchlässt. Das zum Objektiv gespiegelte Licht beleuchtet das Präparat. Der Anteil des Fluoreszenzlichts, das vom Objektiv gesammelt wird, gelangt wiederum zum Strahlteiler und dann weiter in der Richtung Detektors. Anregungslicht, das im Präparat reflektiert wird, wird wieder zur Lampe gelenkt. Jedoch gelangt ein geringer Anteil in die Richtung des Detektors. Da die Intensität der Fluoreszenz im Vergleich zur Anregung sehr schwach ist, ist ein Emissionsfilter notwendig, der dieses restliche Anregungslicht eliminiert.

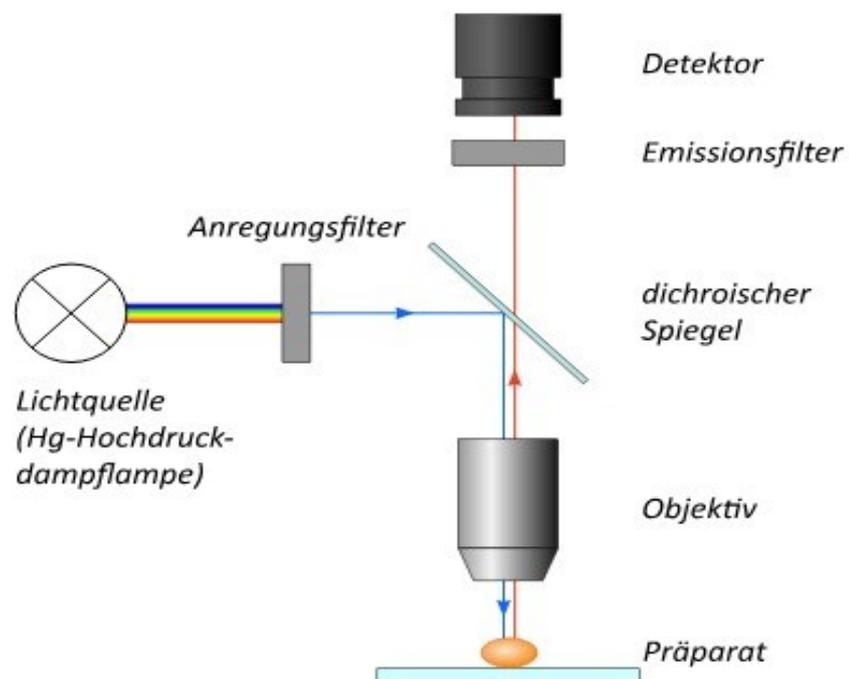


Abbildung 6: Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops. (Aus: ip.uni-goettingen.de, Autor: Niedermayr, A.)

In der Fluoreszenzmikroskopie unterscheidet man Primär-, Sekundär- und Immunfluoreszenz. Bei der Primärfluoreszenz geht es um Stoffe, die autofluoreszent sind und keine Färbung benötigen. Bei der Sekundärfluoreszenz werden nicht selbst fluoreszierende Objekte mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und bei der Immunfluoreszenz werden

spezifische Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt.

Diese Art von Mikroskopie wird vor allem genutzt, um einzelne Zellbestandteile spezifisch anzufärben. Sie werden mit DAPI, mit spezifischen Antikörpern oder durch Fusion mit einem fluoreszierenden Protein wie GFP markiert.

Um die Lokalisation von BASIC herauszufinden, wurde ein Konfokalmikroskop benutzt. Bei einem Konfokalmikroskop wird nicht das gesamte Präparat beleuchtet, sondern zu jedem Zeitpunkt nur ein Bruchteil davon. Diese Beleuchtung wird dann Stück für Stück über das Präparat gerastert. Die Lichtintensitäten des durch Fluoreszenz abgegebenen Lichtes werden nacheinander an allen Orten des abzubildenden Objektes gemessen, sodass eine anschließende Konstruktion des Bildes möglich ist. Von der so beleuchteten Stelle wird Licht durch das Objektiv auf eine Lochblende fokussiert, bevor es den Detektor erreicht. Der Punkt in der Mitte der Lochblende und der Beleuchtungspunkt im Präparat sind dabei konfokal zueinander, das heißt sie sind gleichzeitig im Fokus.

Die optische Information, die nicht aus dem Fokuspunkt des Präparats stammt, wird doppelt unterdrückt. Sie erreicht den Detektor nicht, weil zum einen die Beleuchtungsintensität außerhalb des Fokus schwach ist und zum anderen das Licht des Fokuspunkts an der Lochblende fast vollständig blockiert wird. Auf diese Weise können eine deutliche Kontrastverbesserung und eine bessere Auflösung erzielt werden.

3 Ergebnisse

3.1 Expressionsmuster von BASIC

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die subzelluläre Lokalisation von BASIC zu identifizieren. Hierzu wurden heterologe Expressionssysteme verwendet. Zu Beginn der Arbeit wurden rBASIC cDNA und mBASIC cDNA in die Vektoren pEGFP-C1 und pEGFP-N1 kloniert, um sie mit GFP zu fusionieren. Diese Konstrukte wurden in HEK293-Zellen und CHO-Zellen heterolog exprimiert. Das Expressionsmuster von BASIC wurde mittels konfokaler Mikroskopie begutachtet.

Der in HEK 293-Zellen exprimierte pEGFP-rBASIC (grün) zeigte sich als retikuläres Verteilungsmuster in der Zelle (Abb. 7.1 links). Die Überlagerung der DAPI-Färbung des Zellkerns und des Expressionsmusters von pEGFP-rBASIC zeigte, dass rBASIC in HEK 293-Zellen nicht im Zellkern exprimiert wird, sondern in einem weiter zu untersuchenden Zellorganell, das sich um den Zellkern anordnet und bis in die Peripherie reicht.

Der in HEK 293-Zellen exprimierte pEGFP-mBASIC wies ebenfalls ein retikuläres Verteilungsmuster auf (Abb. 7.2 links). Die Transfektion von pEGFP-rBASIC und pEGFP-mBASIC in CHO-Zellen zeigte eine ähnliche Akkumulation von netzförmigen Strukturen (Abb. 7.3 und 7.4 links). pEGFP-rBASIC und pEGFP-mBASIC zeigten demnach ein identisches Verteilungsmuster.

Es war keine Membranfärbung sichtbar. Elektrophysiologische Messungen deuteten jedoch darauf hin, dass BASIC in der Membran vorkommt (Lenzig et al., 2018). Die Fluoreszenzmikroskopie war aber nicht sensitiv genug, um die geringe Anzahl an Molekülen in der Membran zu detektieren.

GFP wurde sowohl N- als auch C-terminal mit BASIC fusioniert. Es konnte festgestellt werden, dass die verschiedenen Fusionskonstrukte keine Unterschiede im Expressionsmuster von BASIC aufwiesen. So konnte ausgeschlossen werden, dass die Position von GFP die Lokalisation von BASIC beeinflusst, weshalb in den folgenden Abbildungen nur BASIC dargestellt wird, das N-terminal mit GFP fusioniert wurde (pEGFP-rBASIC bzw. pEGFP-mBASIC).

GFP-BASIC

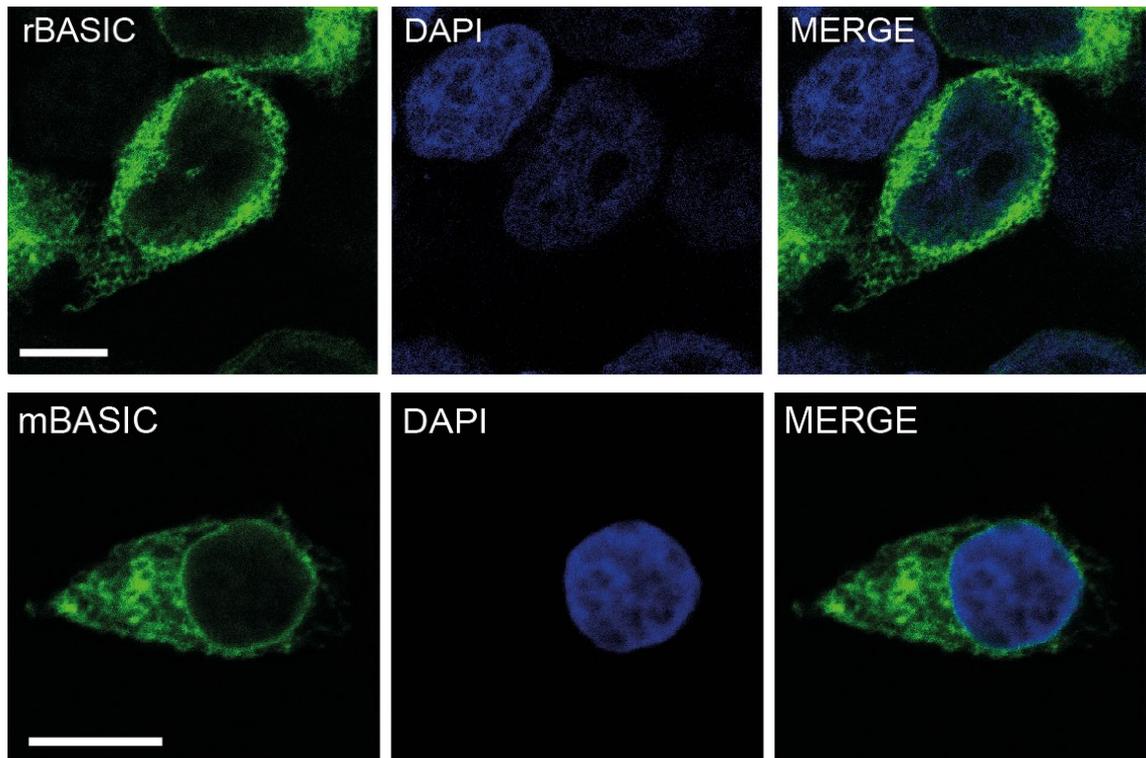
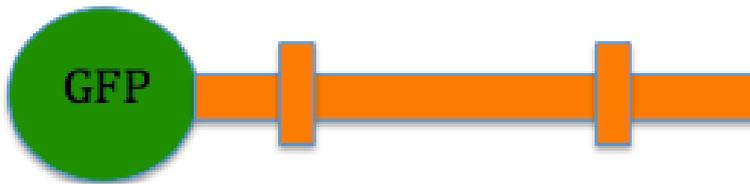


Abb. 7.1: Expressionsmuster von pEGFP-rBASIC und pEGFP-mBASIC in HEK 293-Zellen.

Links zeigt die grüne Färbung ein retikuläres Verteilungsmuster von rBASIC und mBASIC in HEK 293-Zellen. In der Mitte ist die blaue Färbung des Zellkerns dargestellt. Rechts zeigt die Überlagerung der Expressionsmuster von rBASIC bzw. mBASIC und Zellkern.

Maßstabsbalken: 10 μm .

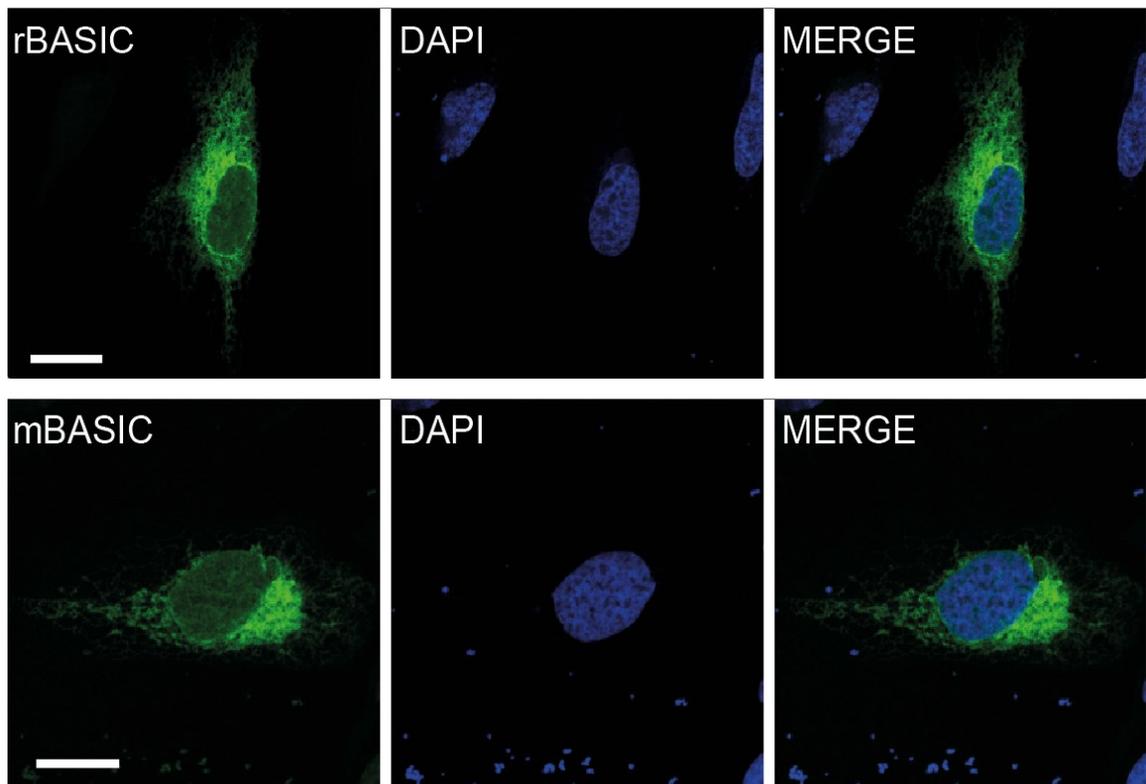


Abb. 7.2: Expressionsmuster von pEGFP-rBASIC und pEGFP-mBASIC in CHO-Zellen.

Links zeigt die grüne Färbung ein retikuläres Verteilungsmuster von rBASIC und mBASIC in CHO-Zellen. In der Mitte ist die blaue Färbung des Zellkerns dargestellt. Rechts zeigt die Überlagerung der Expressionsmuster von rBASIC bzw. mBASIC und Zellkern. Maßstabsbalken: 10 μm .

Da weder ein Unterschied im Expressionsmuster von rBASIC und mBASIC zu erkennen ist, noch die Position von GFP einen Einfluss auf das Verteilungsmuster hat, wurde in den nachfolgenden Experimenten nur noch pEGFP-rBASIC analysiert.

3.2 Organellmarker (BASIC Kolokalisation)

Um die diffus retikuläre Struktur zu identifizieren, in denen rBASIC sich akkumuliert, wurden verschiedene Zellkompartimente mit fluoreszenzmarkierten Organellmarkern gefärbt. Genutzt wurden die Organellmarker pmRFP-C3-Rab5, pmRFP-C3-Rab7, pmRFP-C3-Rab11 und pmRFP-C3-Lamp1. Die RFP-markierten Organellmarker sind spezifisch für periphere Membranproteine namens Rab. Rab-Proteine gehören zur Ras-Superfamilie und sind wichtig für die Vesikelsortierung innerhalb der Zelle. Dabei markiert pmRFP-C3-Rab5 die frühen Endosomen, pmRFP-C3-Rab7 die späten Endosomen, pmRFP-C3-Rab11 die Recycling-Endosomen und pmRFP-C3-Lamp1 die Lysosomen.

rBASIC zeigt in HEK 293-Zellen ein diffuses und retikuläres Verteilungsmuster (Abb. 8.1). Die Organellmarker werden in rot dargestellt. Rab5, Rab7 und Rab11 zeigen eine Anhäufung in Vakuolen-ähnlichen Strukturen in den frühen, späten und Recycling-Endosomen. Im Gegensatz dazu zeigt Lamp1 eine gepunktete Struktur in den Lysosomen.

Die Koexpression von pEGFP-rBASIC mit dem Proteinmarker für Lysosomen (pmRFP-C3-Lamp1) in HEK 293-Zellen zeigt keine Kolokalisation (Abb.8.1 D rechts). Im Unterschied dazu weist die Koexpression mit Proteinmarker für frühe Endosomen (pmRFP-C3-Rab5), späte Endosomen (pmRFP-C3-Rab7) und Recycling-Endosomen (pmRFP-C3-Rab11) eine partielle Überlappung der grünen und roten Fluoreszenz auf. Deshalb kann man annehmen, dass sich in HEK 293-Zellen pEGFP-rBASIC auch in endosomalen Strukturen akkumuliert. Die Kolokalisation zeigte sich durch eine Gelbfärbung, die sich aus einer Überlagerung der endosomalen Rotfärbung und des grünen pEGFP-rBASIC ergibt (Abb. 8.1 A-C rechts).

Analog zu den HEK 293-Zellen wies auch die Koexpression von pEGFP-rBASIC mit dem Proteinmarker für Lysosomen in CHO-Zellen keine Kolokalisation auf (Abb. 8.2 D rechts). Jedoch war eine partielle Überlappung der grünen und roten Fluoreszenz in der Koexpression mit den Proteinmarkern für die frühen, späten und die Recycling-Endosomen zu erkennen (Abb. 8.2 A-C rechts).

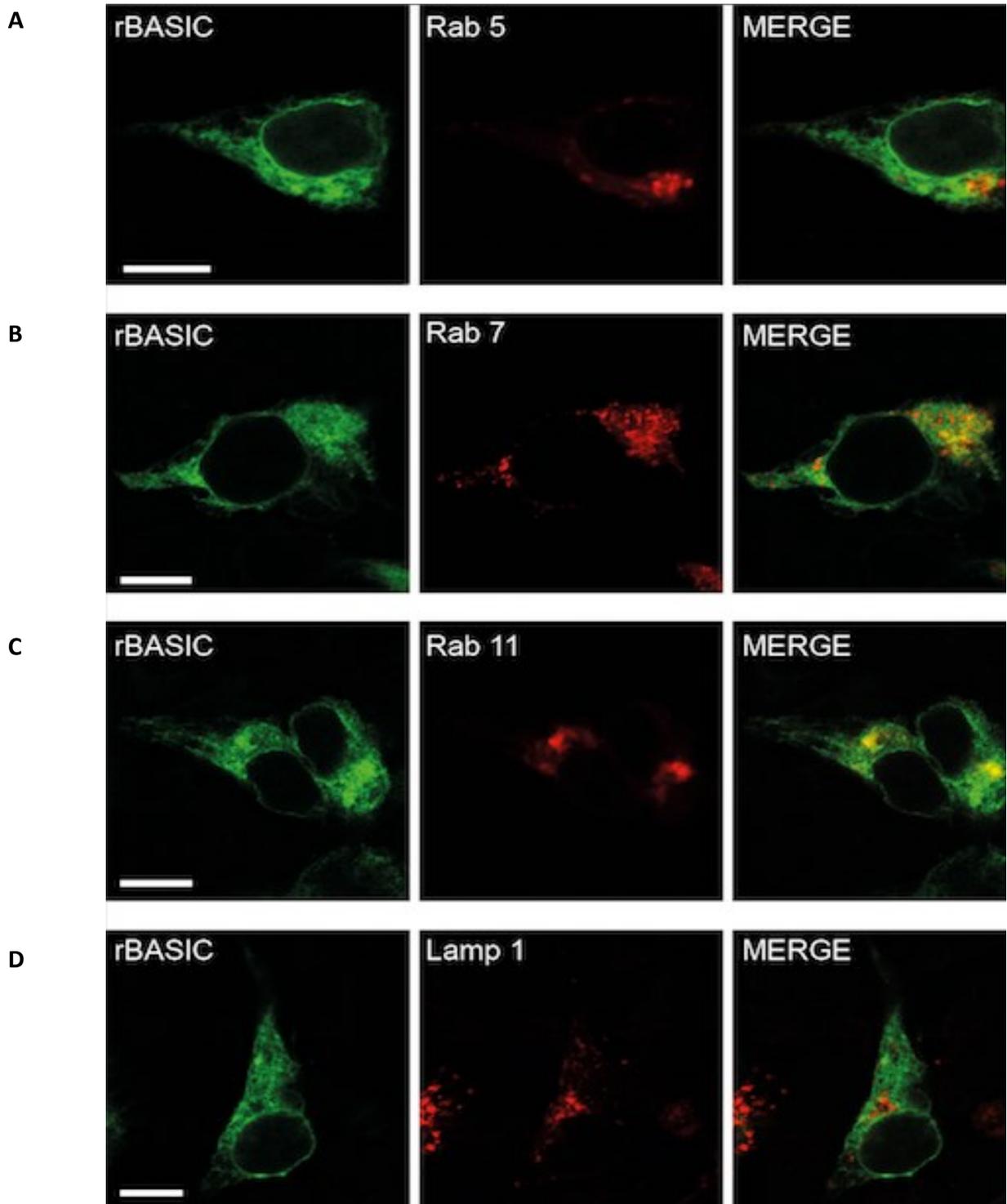


Abb. 8.1: Expressionsmuster von pEGFP-rBASIC und den frühen Endosomen, späten Endosomen, Recycling-Endosomen und Lysosomen in HEK 293-Zellen.

Links zeigt bei pEGFP-rBASIC in HEK 293-Zellen ein retikuläres Verteilungsmuster. In der Mitte zeigt sich eine rote Färbung der Organellen durch Rab5 (frühe Endosomen), Rab7 (späte Endosomen), Rab11 (Recycling-Endosomen) und Lamp1 (Lysosomen). Rechts zeigt eine partielle Überlappung der Endosomen mit pEGFP-rBASIC und keine Überlappung der Lysosomen mit pEGFP-rBASIC. Maßstabsbalken: 10 μm

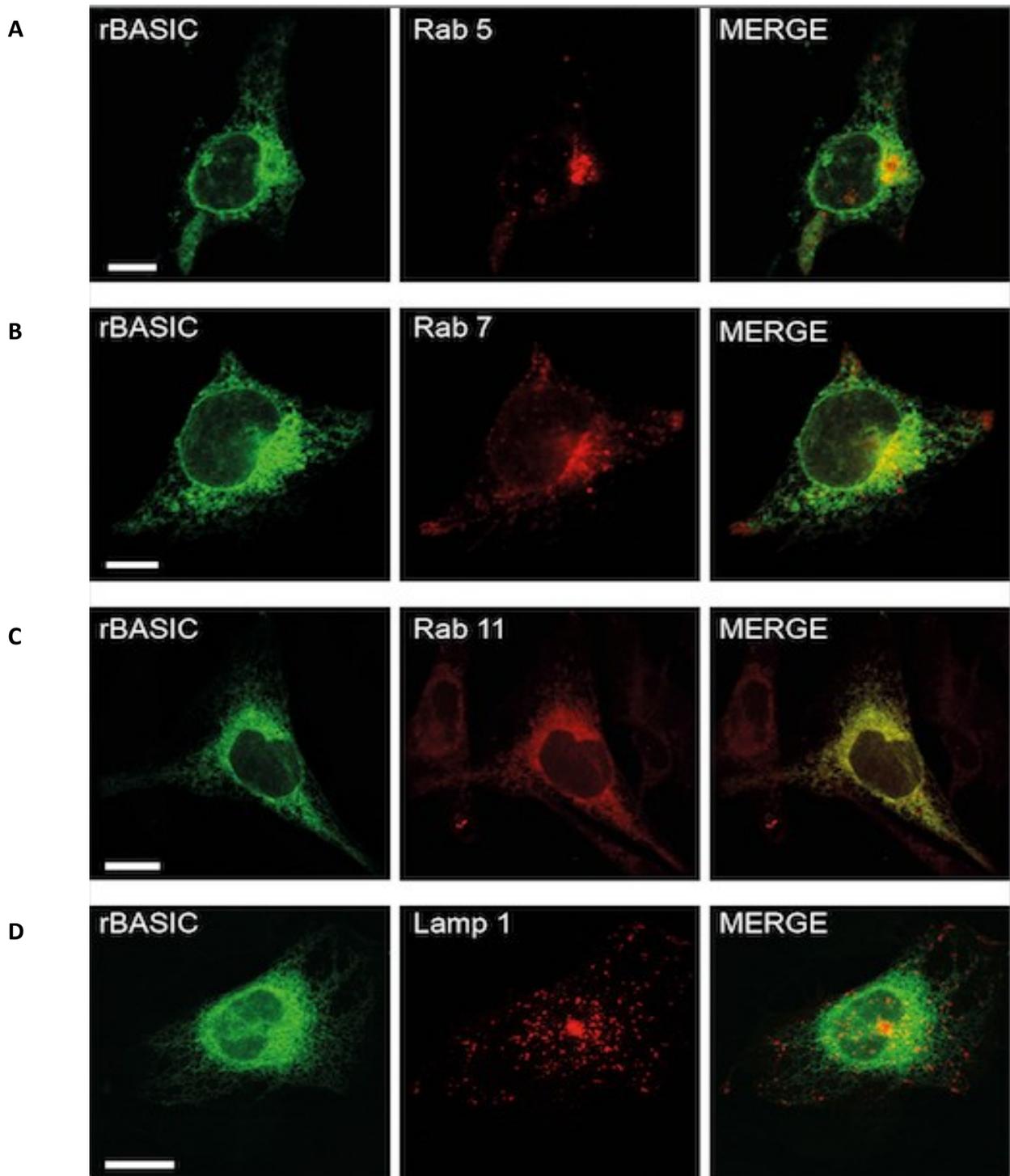


Abb. 8.2: Expressionsmuster von pEGFP-rBASIC und den frühen Endosomen, späten Endosomen, Recycling-Endosomen und den Lysosomen in CHO-Zellen.

Links zeigt bei pEGFP-rBASIC in CHO-Zellen ein retikuläres Verteilungsmuster. In der Mitte zeigt sich eine rote Färbung der Organellen durch Rab5 (frühe Endosomen), Rab7 (späte Endosomen), Rab11 (Recycling-Endosomen) und Lamp1 (Lysosomen). Rechts zeigt eine partielle Überlappung der Endosomen mit pEGFP-rBASIC und eine Überlappung der Lysosomen mit pEGFP-rBASIC.

Maßstabsbalken: 10 μm .

3.3 Immunfärbung (BASIC Kolokalisation)

Um die subzelluläre Lokalisation von BASIC in weiteren Organellen zu verifizieren, wurden neben der Expression von Markerproteinen auch immunzytochemische Methoden verwendet, um endogene Proteine nachzuweisen. Die Antikörper PDI, Giantin und EEA1 wurden zur Markierung des endoplasmatischen Retikulums, des Golgi-Apparates und der frühen Endosomen verwendet. Als sekundäre Antikörper wurden AF633-markierte Antikörper verwendet.

rBASIC in HEK 293-Zellen zeigte ein retikuläres Verteilungsmuster, das sich bei der Überlappung der mit anti-PDI gefärbten Organellen flächig deckt (Abb. 9.1 A). Diese Kolokalisation wurde durch die Gelbfärbung sichtbar gemacht und verdeutlicht, dass pEGFP-rBASIC im endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten wird.

Das retikuläre Verteilungsmuster von pEGFP-rBASIC in HEK 293-Zellen zeigte eine partielle Überlappung mit dem Golgi-Apparat (Färbung mit anti-Giantin) und dem frühen Endosom (Färbung mit EEA1) (Abb. 9.1 B-C).

Die Kolokalisation der mit anti-PDI, anti-Giantin und anti-EEA1 gefärbten Organellen mit pEGFP-rBASIC wurde ebenso in CHO-Zellen analysiert (Abb. 9.2). Auch hier war eine vollständige Überlappung von pEGFP-rBASIC mit dem endoplasmatischen Retikulum zu erkennen (Abb. 9.2 A). rBASIC wies sowohl mit der anti-Giantin-Färbung als auch mit der anti-EEA1-Färbung eine partielle Überlappung auf (Abb. 9.2 B-C).

Zusammenfassend zeigte die Immunfärbung eine Kolokalisation von rBASIC hauptsächlich mit dem endoplasmatischen Retikulum und nur eine partielle Kolokalisation mit dem Golgi-Apparat und den frühen Endosomen.

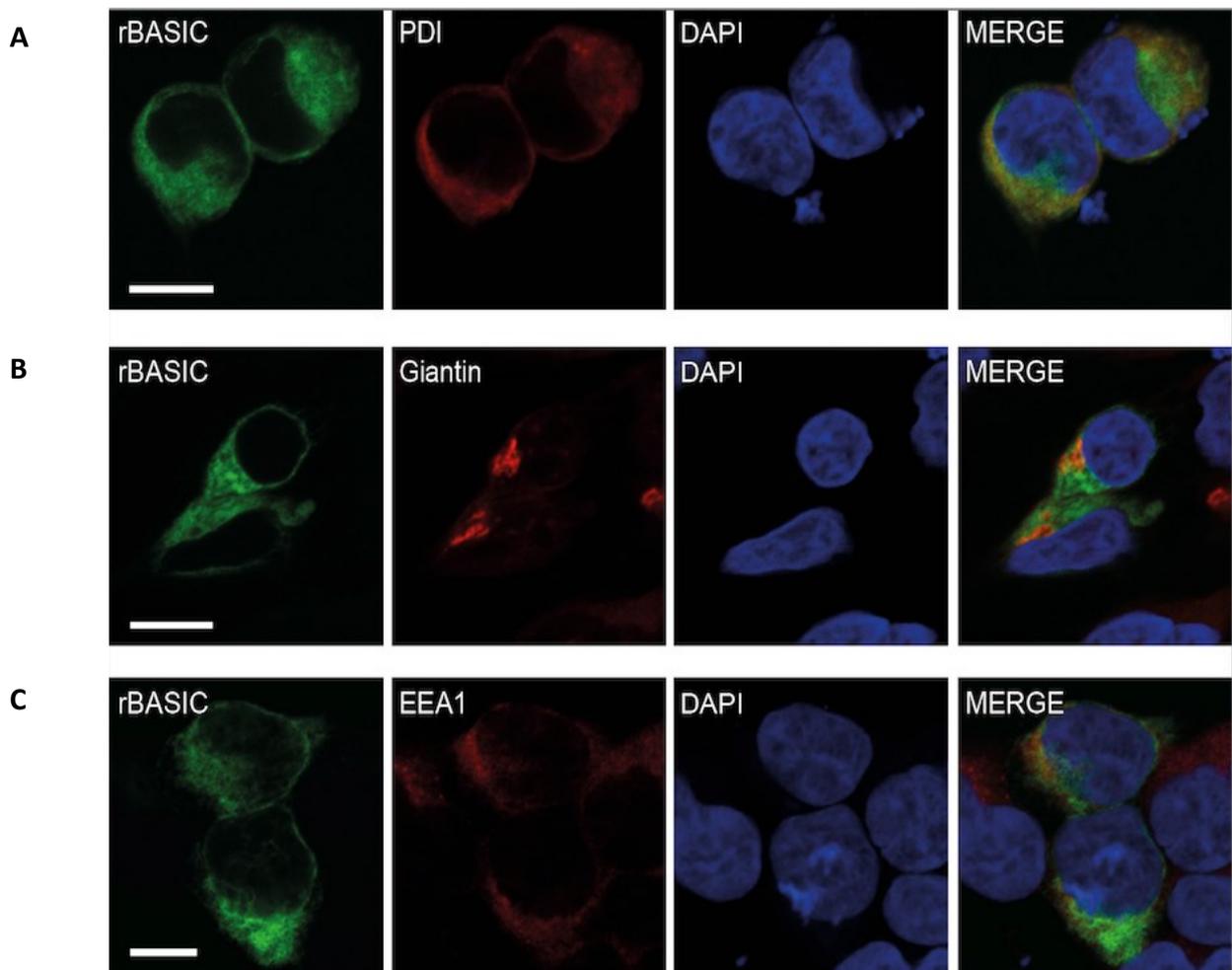


Abb. 9.1: Expressionsmuster von pEGFP-rBASIC und dem endoplasmatischen Retikulum, dem Golgi-Apparat und den frühen Endosomen in HEK 293-Zellen.

Links zeigt bei pEGFP-rBASIC in HEK 293-Zellen ein retikuläres Verteilungsmuster.

Die zweite Abbildung von links zeigt die rote Färbung des ER, des Golgi-Apparates und der

frühen Endosomen durch PDI, Giantin und EEA1. Die dritte Abbildung von links zeigt die blaue

Färbung des Zellkerns. Die Abbildung rechts zeigt bei A eine Überlappung des

endoplasmatischen Retikulums mit pEGFP-rBASIC und bei B und C, eine partielle Überlappung

des Golgi-Apparates und der frühen Endosomen mit pEGFP-rBASIC.
Maßstabsbalken: 10 μ m.

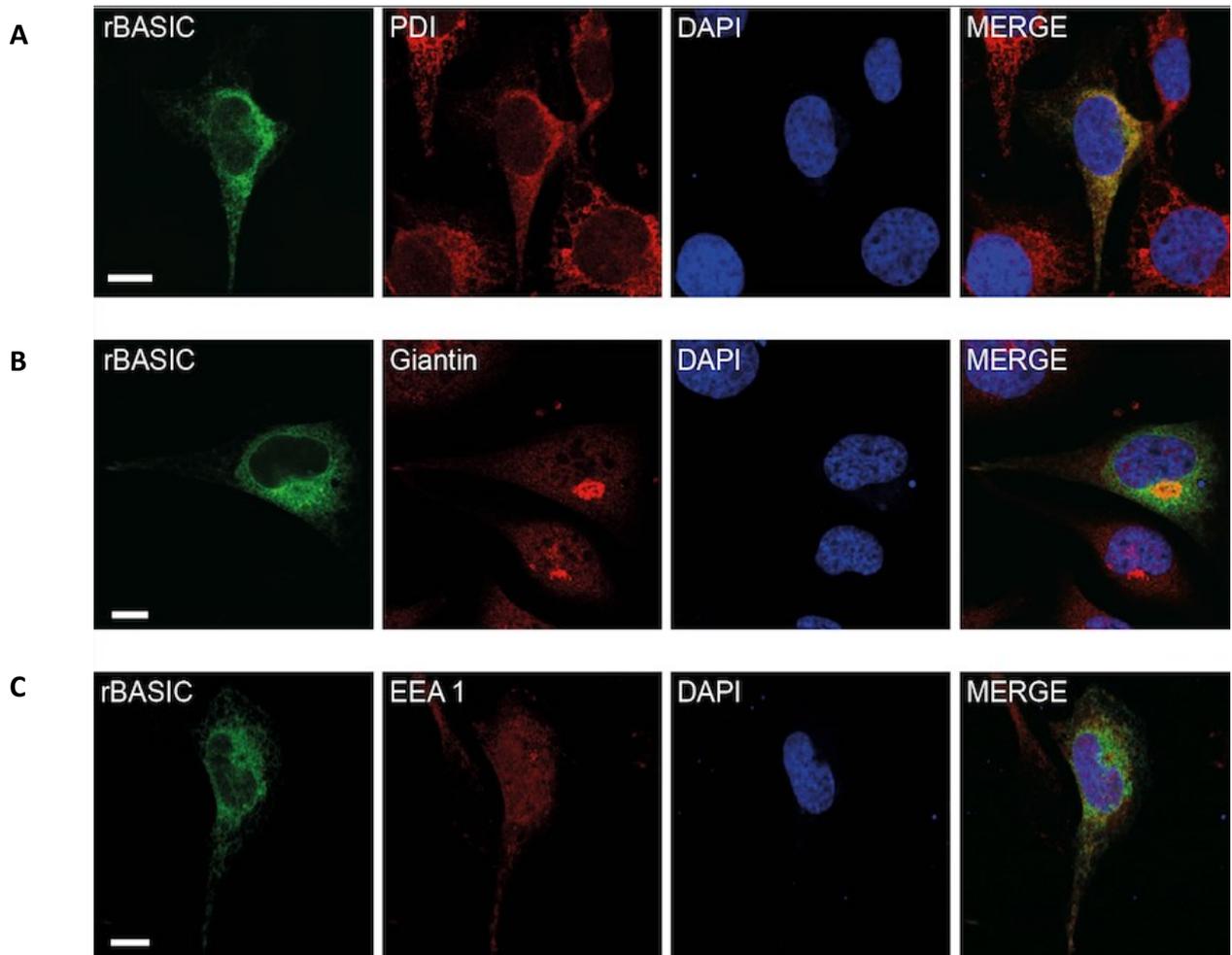


Abb. 9.2: Expressionsmuster von pEGFP-rBASIC und dem endoplasmatischen Retikulum, dem Golgi-Apparat und den frühen Endosomen in CHO-Zellen.

Links zeigt bei pEGFP-rBASIC in CHO-Zellen ein retikuläres Verteilungsmuster.

Die zweite Abbildung von links zeigt eine rote Färbung des ER, des Golgi-Apparates und der frühen Endosomen durch PDI, Giantin und EEA1. Die dritte Abbildung von links zeigt eine blaue Färbung des Zellkerns. Die Abbildung rechts zeigt bei A eine Überlappung des endoplasmatischen Retikulums mit pEGFP-rBASIC und bei B und C eine partielle Überlappung des Golgi-Apparates und der frühen Endosomen mit pEGFP-rBASIC.

Maßstabsbalken: 10 μm .

3.4 Expressionsmuster ASIC

Um die Methoden und die Ergebnisse der Kolo­kalisierung von rBASIC in HEK 293-Zellen und CHO-Zellen zu verifizieren, wurden analoge Kontrollexperimente mit ASIC1a durchgeföhrt und die Ergebnisse wurden verglichen.

Bisher ist bekannt, dass bei der Überexpression von ASIC1, ASIC2 und ASIC3 in heterologen Zellsystemen diese vorwiegend im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert sind. ASIC4 ist hauptsächlich in den frühen Endosomen lokalisiert (Schwartz et al., 2015).

Wie auch bei BASIC konnte man bei der Färbung von pEGFP-C3-ASIC1a in CHO-Zellen ein retikuläres Verteilungsmuster erkennen (Abb. 10.1). Die Organellmarker sind in roter Farbe dargestellt. pmRFP-C3-Rab5, pmRFP-C3-Rab7 und pmRFP-C3-Rab11 zeigten eine Akkumulation in Vakuolen-ähnlichen Strukturen in den frühen, späten und Recycling-Endosomen. pmRFP-C3-Lamp1 zeigt sich als gepunktete Struktur in den Lysosomen.

Die Koexpression von pEGFP-C3-ASIC1a mit dem Proteinmarker für Lysosomen (pmRFP-C3-Lamp1) in CHO-Zellen zeigte keine Kolo­kalisierung (Abb. 10.1 D rechts). Eine Kolo­kalisierung mit den Proteinmarkern für frühe Endosomen (pmRFP-C3-Rab5), späte Endosomen (pmRFP-C3-Rab7) und Recycling-Endosomen (pmRFP-C3-Rab11) konnte nicht beobachtet werden (Abb. 10.1 A-C rechts).

Die Überlappung der mit anti-PDI und anti-Giantin gefärbten Organellen mit pEGFP-C3-ASIC1a in CHO-Zellen wird in Abbildung 10.2 dargestellt. Das Verteilungsmuster von ASIC1a überlappt vollständig mit dem endoplasmatischen Retikulum, das mit dem Marker anti-PDI gefärbt wurde. Die vollständige Kolo­kalisierung mit dem endoplasmatischen Retikulum bei pEGFP-C3-ASIC1a wurde durch die Gelbfärbung sichtbar gemacht, die sich aus einer Überlagerung der Rotfärbung des ER und des grünen pEGFP-C3-ASIC1a ergab (Abb. 10.2 A rechts).

Mit dem Golgi-Apparat (anti-Giantin) zeigte pEGFP-C3-ASIC1a keine Kolo­kalisierung (Abb. 10.2 B).

Dieses Kontrollexperiment zeigte, wie bisher schon bekannt, dass ASIC 1a im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist. Dieses Resultat bestätigte somit die Richtigkeit der Methoden und Ergebnisse der Kolo­kalisierung von rBASIC in

HEK 293-Zellen und CHO-Zellen. Dieses Experiment konnte also Störfaktoren ausschließen und die in den Experimenten genutzte Methodik verifizieren.

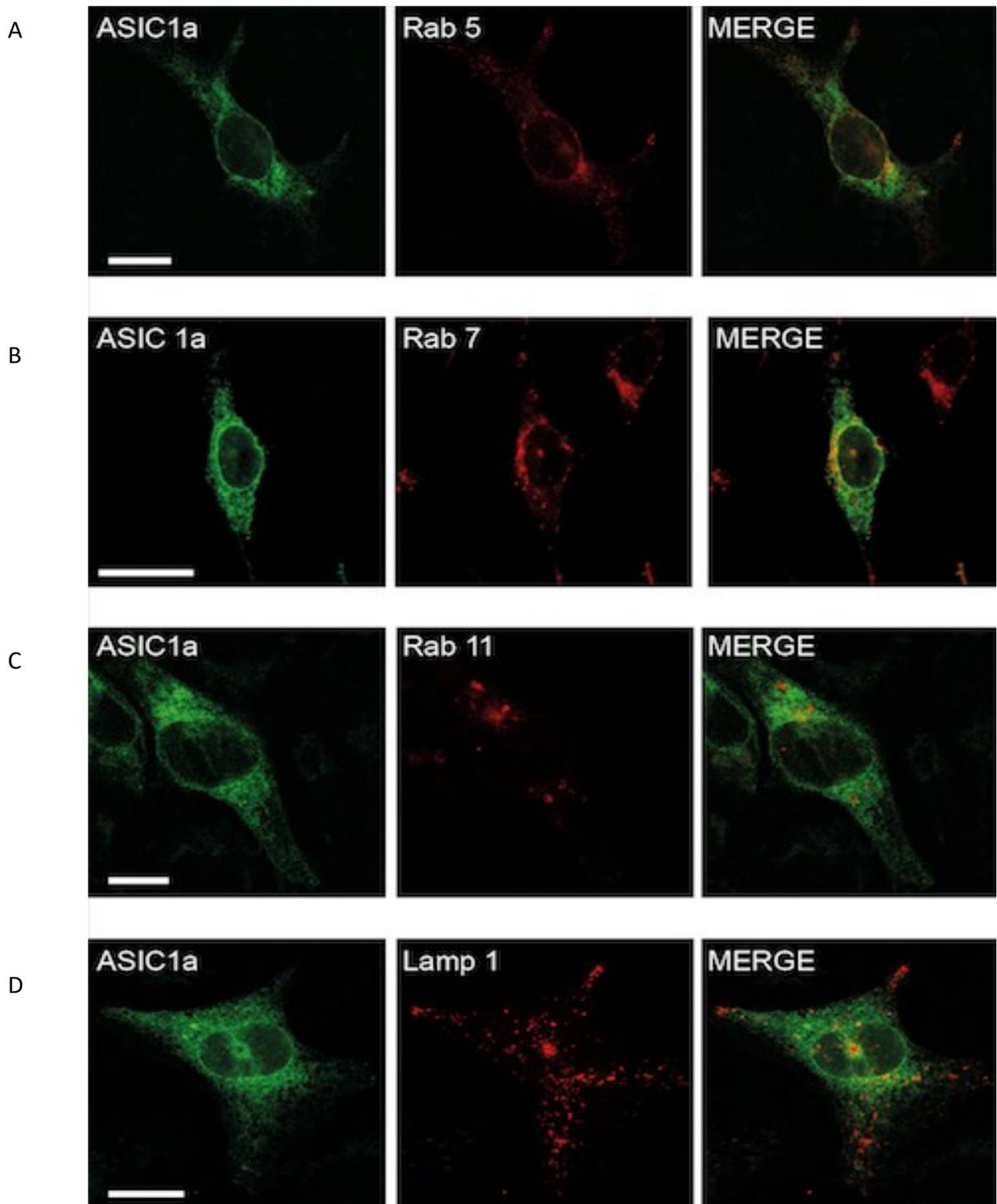


Abb. 10.1: Expressionsmuster von pEGFP-C3-ASIC1a und den frühen Endosomen, späten Endosomen, Recycling-Endosomen und den Lysosomen in CHO-Zellen.

Links zeigt bei pEGFP-C3-ASIC 1a in CHO-Zellen ein retikuläres Verteilungsmuster. In der Mitte zeigt sich eine rote Färbung der frühen Endosomen, späten Endosomen, Recycling-Endosomen und Lysosomen durch Rab 5, Rab 7, Rab 11 und Lamp 1. In der Abbildung rechts zeigt sich bei A-C keine Überlappung der Endosomen mit pEGFP-C3-ASIC 1a und bei D zeigt sich keine Überlappung der Lysosomen mit pEGFP-C3-ASIC 1a. Maßstabsbalken: 10 μ m.

A

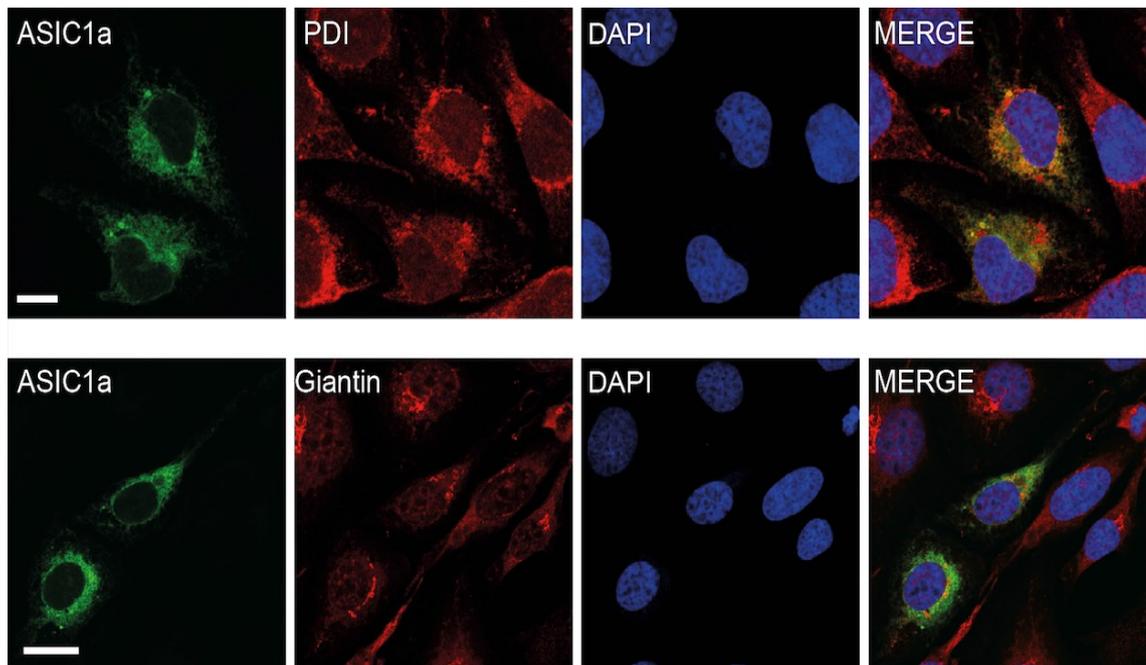


Abb. 10.2: Expressionsmuster von pEGFP-C3-ASIC1a und dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat in CHO-Zellen.

Links zeigt bei pEGFP-C3-ASIC 1a in CHO-Zellen ein retikuläres Verteilungsmuster. Die zweite Abbildung von links zeigt eine rote Färbung des endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates durch PDI und Giantin. Die dritte Abbildung von links zeigt eine blaue Färbung des Zellkerns. Die Abbildung rechts zeigt bei A eine Überlappung des endoplasmatischen Retikulums mit pEGFP-C3-ASIC 1a und bei B keine Überlappung des Golgi-Apparates mit pEGFP-ASIC.

Maßstabsbalken: 10 μ m.

3.5 Trunkationen

Eine Vielzahl an DEG/ENaC-Kanälen und anderen Membranproteinen werden in ihrer Funktion durch zytosolische Domänen reguliert (Kellenberger & Schild, 2015; Staub et al., 1996). Auch die Lokalisation innerhalb der Zelle kann durch zytosolische Domänen beeinflusst werden. Um die Rolle des zytoplasmatischen Amino- und Caroxy-Terminus auf die subzelluläre Lokalisation und das Trafficking von BASIC aufzuklären, wurden willkürliche Trunkationen des Proteins vorgenommen.

Im Gegensatz zur Transmembrandomäne und zur extrazellulären Domäne, bei denen es sich um hochkonservierte Strukturen innerhalb der DEG/ENaC-Kanalfamilie handelt, zeigt die zytosolische N-terminale Domäne ein hohes Maß an Variationen (Schmidt et al., 2016). Von den 65 zytosolischen Aminosäureresten von rBASIC sind nur wenige konservierte Strukturen bekannt, wie zum Beispiel das HG-Motiv, das in allen DEG/ENaC-Kanalfamilien vorkommt (Schmidt et al., 2016). Daher wurden eine Serie von N-terminalen Trunkationen ($\Delta N10$, $\Delta N20$, $\Delta N30$ und $\Delta N40$) und eine C-terminale Trunkation (ΔC) durchgeführt, um mögliche regulatorische Domänen zu identifizieren.

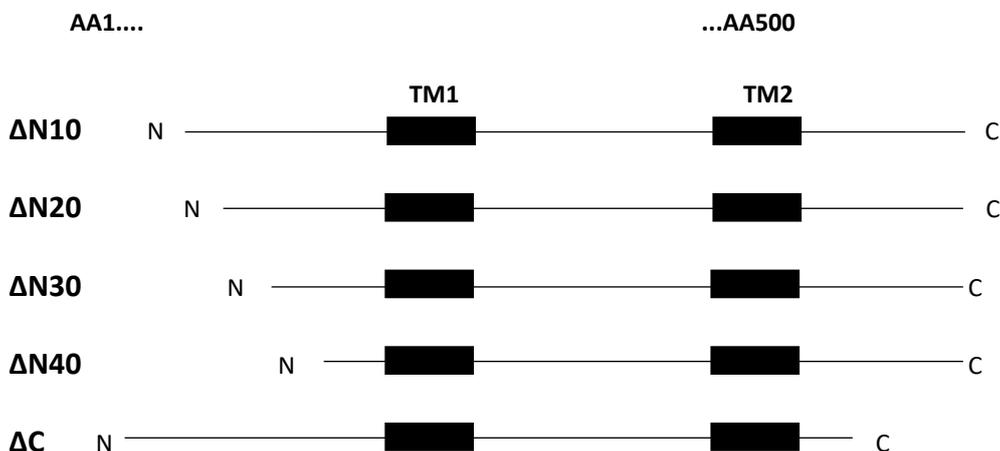


Abb. 11.: N-terminale Trunkationen ($\Delta N10$, $\Delta N20$, $\Delta N30$ und $\Delta N40$) und eine C-terminale Trunkation (ΔC) von BASIC, um regulatorische Bereiche des Proteins zu identifizieren.

Das in HEK 293-Zellen exprimierte pEGFP-rBASIC (grün) war als retikuläres Verteilungsmuster in der Zelle zu erkennen (Abb. 12.1 a) links). Die Trunkationen des N-Terminus ($\Delta N10$, $\Delta N20$, $\Delta N30$ und $\Delta N40$) und die Trunkation des C-Terminus (ΔC) haben nicht zu einer Variation dieses Verteilungsmusters (Abb. 12.1 b-f) links) geführt.

Das Expressionsmuster von pEGFP-mBASIC $\Delta N10$, $\Delta N20$, $\Delta N30$, $\Delta N40$ und ΔC in HEK 293-Zellen wies ebenfalls ein diffus retikuläres Muster auf (Abb. 12.2 b-f) links).

Auch die Expression von pEGFP-rBASIC $\Delta N10$, $\Delta N20$, $\Delta N30$, $\Delta N40$ und ΔC und pEGFP-mBASIC $\Delta N10$, $\Delta N20$, $\Delta N30$, $\Delta N40$ und ΔC in CHO-Zellen zeigte weiterhin eine retikuläre Struktur und somit keine Veränderungen im Expressionsmuster (Abb. 12.3 und 12.4).

Daraus lässt sich schließen, dass die verschiedenen Trunkationen keine Auswirkungen auf das Expressionsmuster von BASIC haben. Bei BASIC existiert also vermutlich keine regulatorische Domäne, die die subzelluläre Lokalisation oder das Targeting von BASIC beeinflusst.

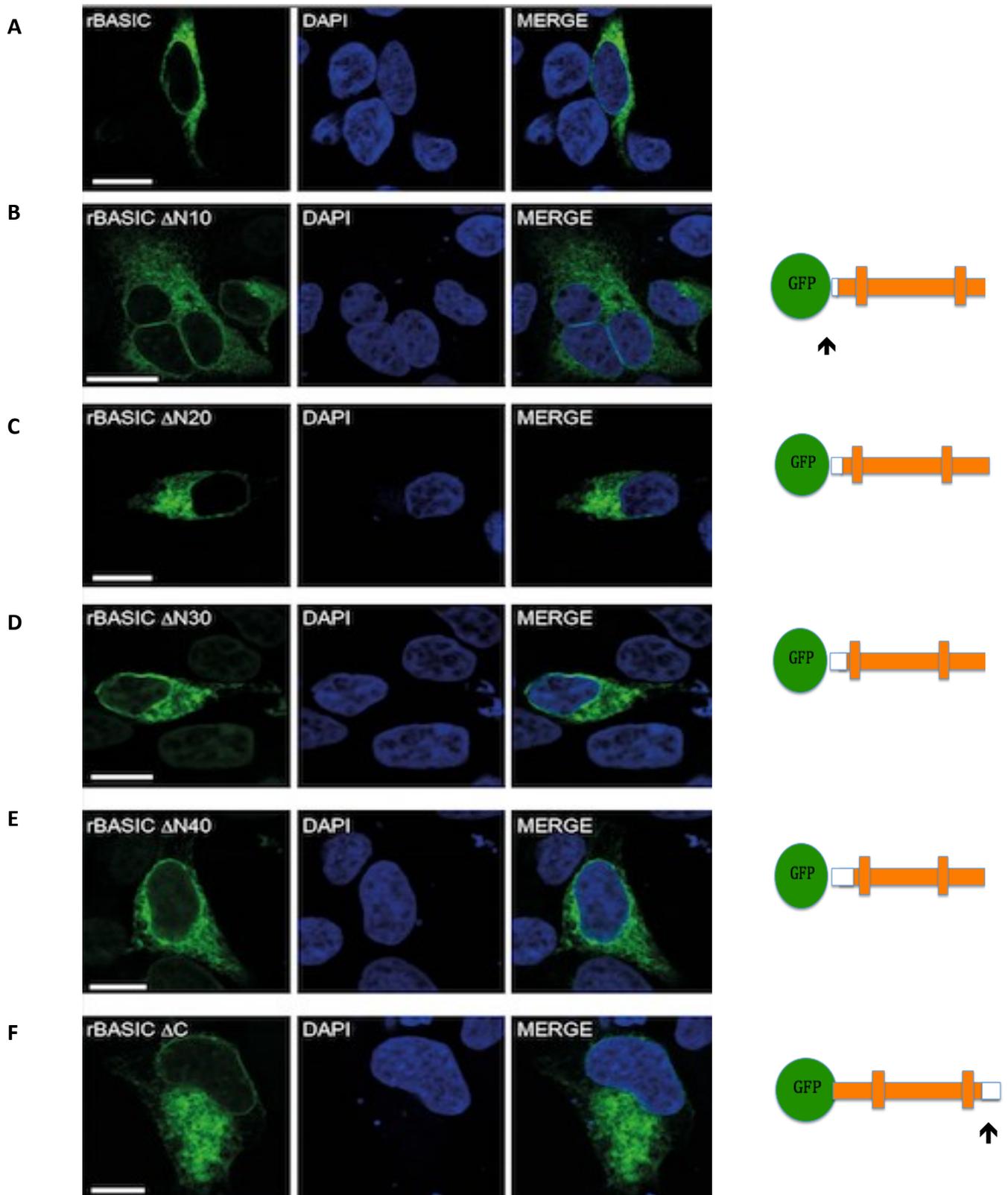


Abb. 12.1: Expressionsmuster des pEGFP-rBASIC und der Trunkationen Δ N10, Δ N20, Δ N30, Δ N40 und Δ C in HEK 293-Zellen.

Links zeigt eine grüne Färbung und ein retikuläres Verteilungsmuster von rBASIC Δ N10, Δ N20, Δ N30, Δ N40 und Δ C in HEK 293-Zellen. In der Mitte zeigt sich eine blaue Färbung des Zellkerns. In der Abbildung rechts zeigt sich eine Überlagerung der Expressionsmuster von rBASIC und des Zellkerns. Maßstabsbalken: 10 μ m.

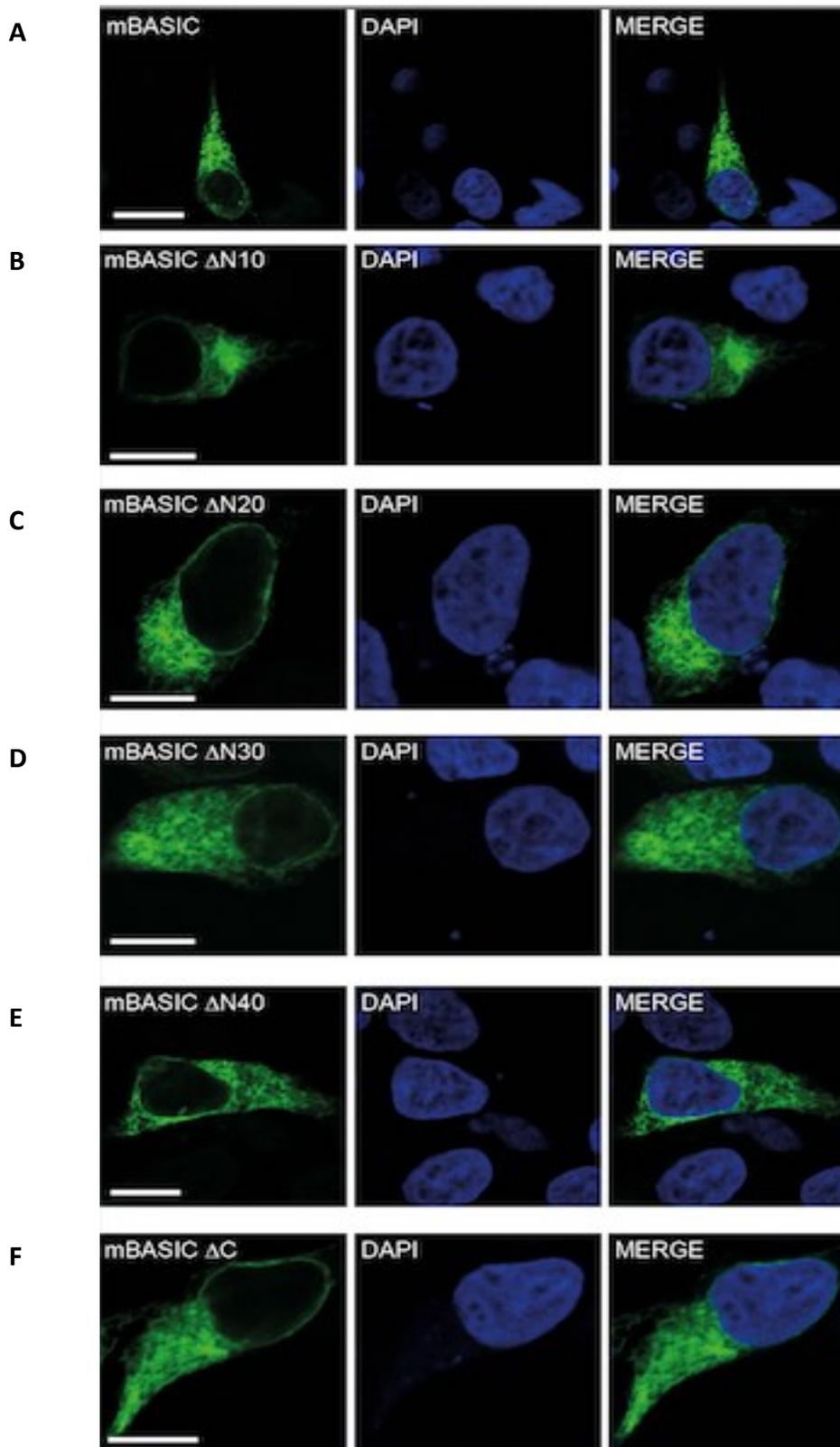


Abb. 12.2: Expressionsmuster des pEGFP-mBASIC und der Trunkationen Δ N10, Δ N20, Δ N30, Δ N40 und Δ C in HEK 293-Zellen.

Links zeigt eine grüne Färbung und ein retikuläres Verteilungsmuster von mBASIC Δ N10, Δ N20, Δ N30, Δ N40 und Δ C in HEK 293-Zellen. In der Mitte zeigt sich die blaue Färbung des Zellkerns. In der Abbildung rechts zeigt sich die Überlagerung der Expressionsmuster von mBASIC und des Zellkerns. Maßstabsbalken: 10 μ m.

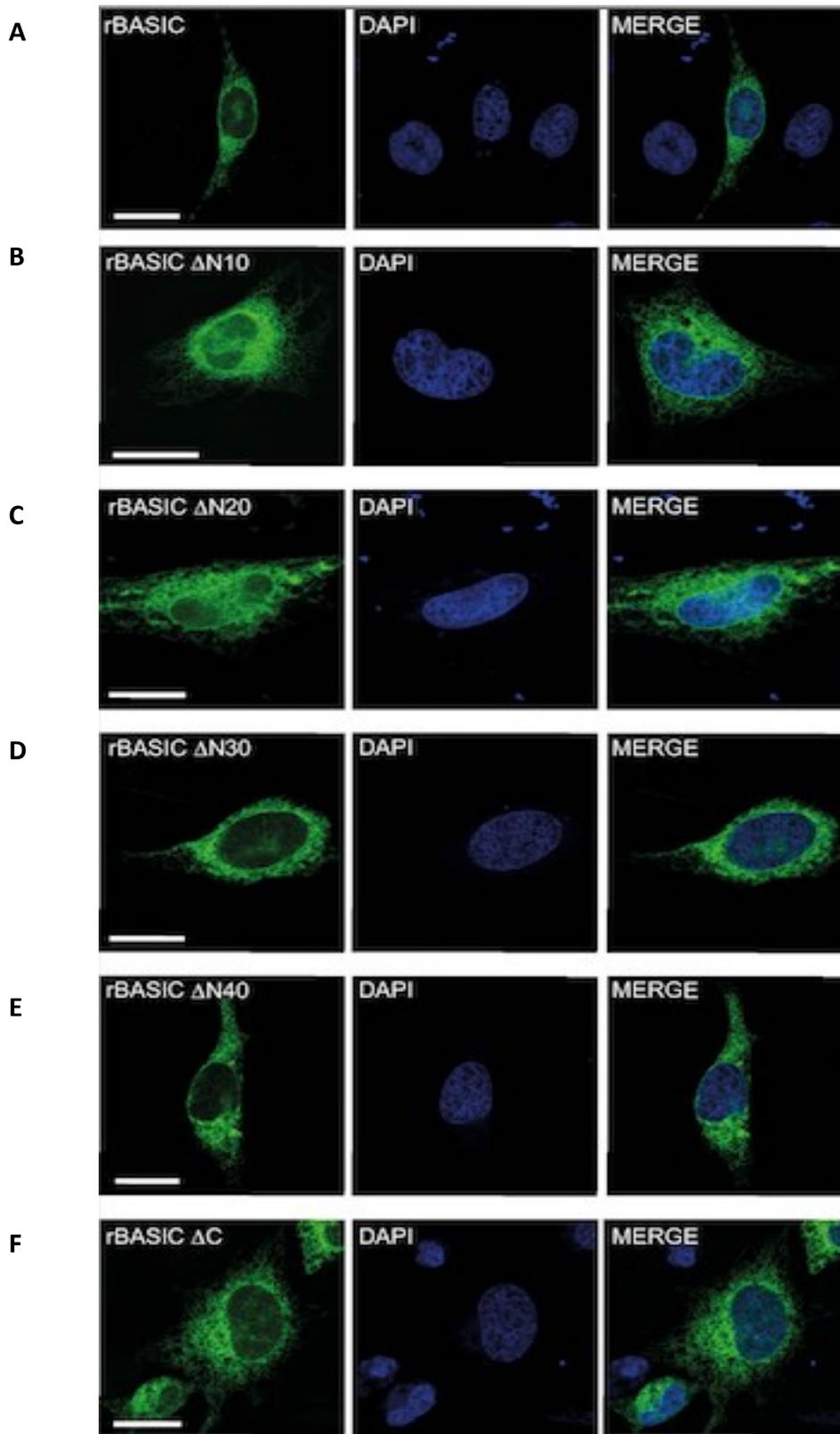


Abb. 12.3: Expressionsmuster des pEGFP-rBASIC und der Trunkationen $\Delta N10$, $\Delta N20$, $\Delta N30$, $\Delta N40$ und ΔC in CHO-Zellen. a-f) Links zeigt eine grüne Färbung und ein retikuläres Verteilungsmuster von rBASIC $\Delta N10$, $\Delta N20$, $\Delta N30$, $\Delta N40$ und ΔC in CHO-Zellen. In der Mitte zeigt sich die blaue Färbung des Zellkerns. In der Abbildung rechts zeigt sich die Überlagerung der Expressionsmuster von rBASIC und des Zellkerns. Maßstabsbalken: 10 μm .

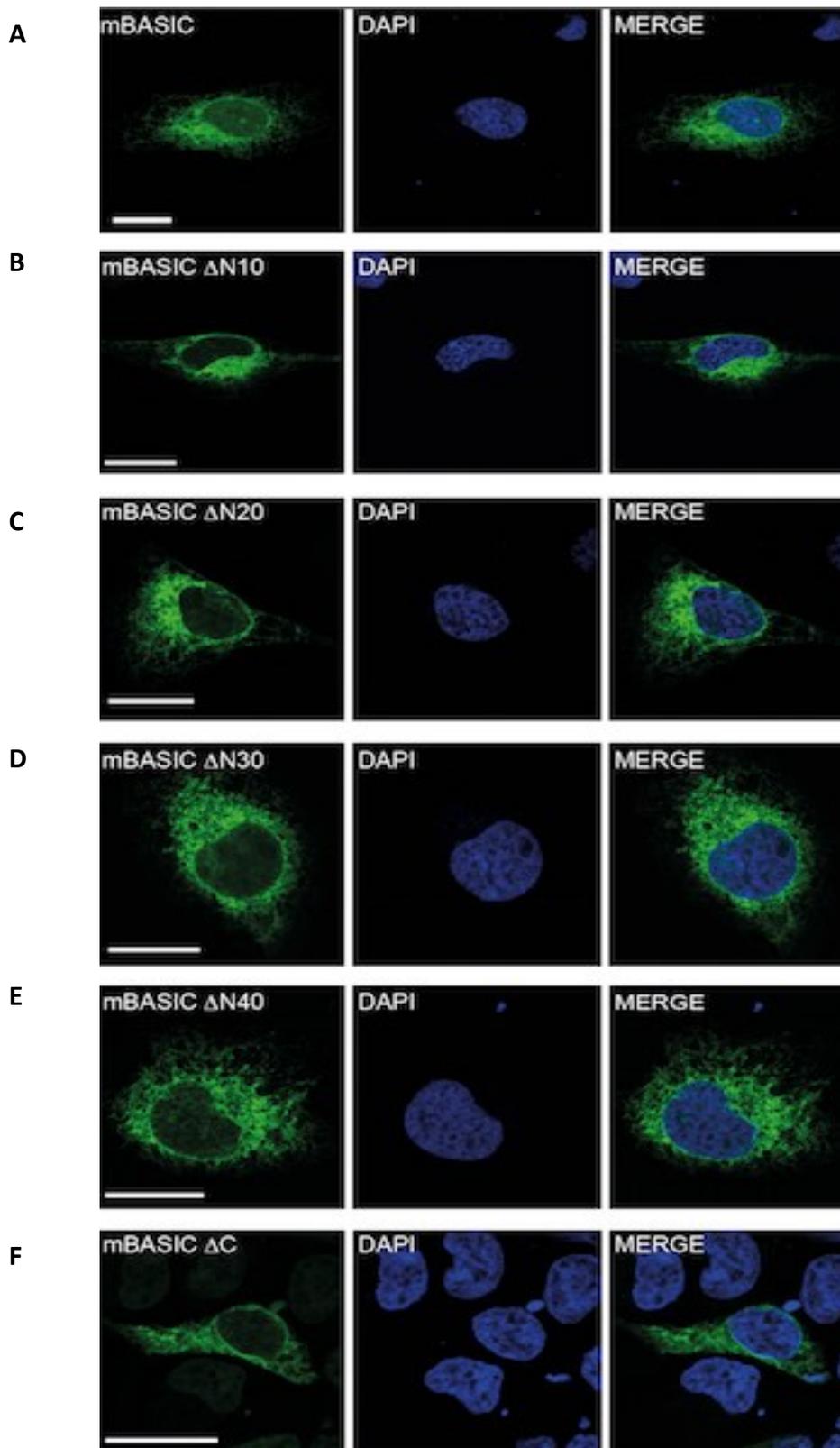


Abb. 12.4.: Expressionsmuster des pEGFP-mBASIC und der Trunkationen $\Delta N10$, $\Delta N20$, $\Delta N30$, $\Delta N40$ und ΔC in CHO-Zellen.

Links zeigt eine grüne Färbung und ein retikuläres Verteilungsmuster von mBASIC $\Delta N10$, $\Delta N20$, $\Delta N30$, $\Delta N40$ und ΔC in CHO-Zellen. In der Mitte zeigt sich die blaue Färbung des Zellkerns. In der Abbildung rechts zeigt sich eine Überlagerung der Expressionsmuster von mBASIC und des Zellkerns. Maßstabsbalken: 10 μm .

3.6 Dynamin/ Dynasore Ergebnisse

Der intrazelluläre Transport von neu synthetisierten Proteinen über den Golgi-Apparat zu ihren Zielkompartimenten erfolgt über Transportvesikel. Diese Vesikel folgen dabei dem Zytoskelett entweder auf anterogradem Weg vom ER zur Plasmamembran mit einer Abzweigung vom Golgi-Apparat und zu den Endosomen oder sie werden retrograd von der Plasmamembran über Endosomen zu Lysosomen transportiert.

Der Vesikeltransport wird streng kontrolliert. Die Transportvesikel werden hierfür mit spezifischen Erkennungsmerkmalen, den sog. *coated vesicles*, beschichtet. Die Zielkompartimente geben sich durch ihre spezifische Protein- und Lipid-Zusammensetzung zu erkennen. Zur Fusion mit der Zielmembran wird die Beschichtung wieder zurückgebildet.

Für den anterograden Transport zum Golgi-Apparat und für die rezeptorvermittelte Endozytose auf der Plasmamembran werden die Vesikel vor allem mit Clathrin beschichtet. Bei der rezeptorvermittelten Endozytose binden Moleküle an spezifische Rezeptoren in der Zellmembran. Die Ligand-Rezeptor-Komplexe bilden eine Vertiefung, an deren Innenseite sich ein Gitter aus Clathrinmolekülen anlagert (*clathrin coated vesicle*). Dynamin legt sich um das Vesikel und führt unter GTP-Hydrolyse die Ablösung des Vesikels von der Zellmembran durch.

Um das Vorkommen von BASIC auf dem endozytotischen Weg zu überprüfen, wurden Experimente mit Dynamin wt, Dynamin Mutanten und Dynasore durchgeführt.

Dynamin ist ein Enzym, das zur Proteinsuperfamilie der GTPasen gehört. Die durch Dynamin ausgelöste GTP-Hydrolyse-Reaktion bildet den Schlüsselfaktor für die Ablösung des Vesikels von der Zellmembran. Dabei wird das Dynamin zunächst unbeladen oder mit GDP beladen am *Clathrin-coated pit* angesammelt, wobei es dann unter Beladung mit GTP die Spirale um den Vesikelhals bildet und unter GTP-Hydrolyse die Vesikelablösung bewirkt. Dynamin Mutanten erhöhen die endozytotische Aufnahme. Die Mutation stabilisiert die GTP-gebundene Form des Proteins, wodurch die aktive Form des Proteins bei der Regulation zur Vesikelablösung länger wirksam ist. Dynasore inhibiert die GTPase-Aktivität von Dynamin und würde die Vesikelabspaltung verhindern. Die Ko-Transfektion von BASIC und Dynasore

könnte daher zu einer Lokalisation von BASIC in einem anderen Kompartiment führen, wie zum Beispiel der Plasmamembran.

Weder die Zugabe von Dynamin wt noch die Zugabe von Dynamin Mutanten hatten einen Einfluss auf das retikuläre Verteilungsmuster von BASIC (Abb. 13 a-b).

Auch die Zugabe von Dynasore bewirkte keine Veränderung im Expressionsmuster von BASIC (Abb. 13.c-d). Daraus kann gefolgert werden, dass BASIC nicht am endozytotischen Transport teilnimmt, sondern im ER verbleibt.

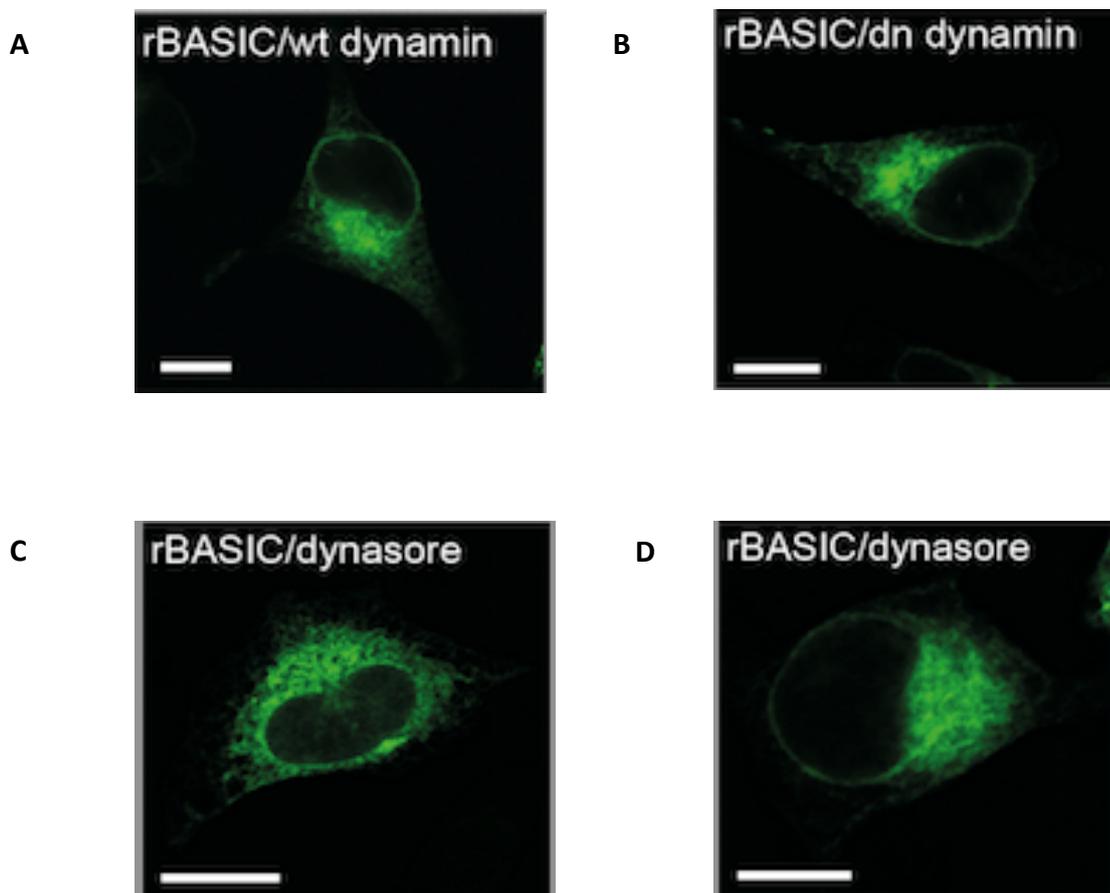


Abb.13: Expressionsmuster des pEGFP-rBASIC und Dynamin wt, Dynamin Mutanten bzw. Dynasore in CHO-Zellen.

Bei A und B zeigt die grüne Färbung ein retikuläres Verteilungsmuster von rBASIC mit Dynamin wt bzw. Dynamin Mutante in CHO-Zellen.

Bei C und D zeigt die grüne Färbung zeigt retikuläres Verteilungsmuster von rBASIC mit Dynasore in CHO-Zellen.

Maßstabsbalken: 10 μ m.

Diese Ergebnisse verdeutlichen also, dass BASIC im ER lokalisiert ist.

4 Diskussion

4.1 Ist BASIC im ER lokalisiert?

Das zentrale Ergebnis dieser Dissertation besteht darin, dass sowohl mBASIC als auch rBASIC ein retikuläres Expressionsmuster aufweisen. Dieses retikuläre Expressionsmuster, das in zwei verschiedenen Zellsystemen und sowohl bei N-terminaler als auch bei C-terminaler GFP-Fusionierung zu beobachten war, ist charakteristisch für das endoplasmatische Retikulum. Kolokalisations-Experimente mit anti-PDI, einem Antikörper gegen die Proteindisulfid-Isomerase im ER, ergaben eine starke Übereinstimmung der Signale. Allerdings ist auf den Bildern der Fluoreszenzmikroskopie das komplette endoplasmatische Retikulum gefärbt. Es ist nicht auszuschließen, dass die Akkumulation im ER durch die starke Überexpression von BASIC bedingt war. Daher wäre es notwendig, endogenes BASIC-Protein mit einem Antikörper gegenüber von BASIC in seinen nativen Zellen nachzuweisen, die den Kanal endogen exprimieren. So könnte ausgeschlossen werden, dass BASIC in den heterologen Zelllinien HEK 293 und CHO artifiziell im ER akkumuliert wird oder dass sich der Ionenkanal in nativen Zellen in einem Kompartiment befindet, da in den in dieser Arbeit genutzten heterologen Zellen nicht vorkommt. In so einem Fall wäre das ER eine Art Surrogat für ein anderes Kompartiment. In dieser Arbeit konnten keine Motive identifiziert werden, die für das Targeting von BASIC nach einer transienten Transfektion in heterologen Zelllinien verantwortlich sind. Denn trotz verschiedener Trunkationen am Amino- und Carboxyterminus waren keine Veränderungen am retikulären Expressionsmuster zu beobachten, das charakteristisch für das ER ist. Auch die Zugabe von Dynamin und Dynasore führte zu keiner Veränderung des Expressionsmusters. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein Teil der BASIC-Proteine in der Plasmamembran lokalisiert ist und die Akkumulation im ER durch die starke Überexpression von BASIC bedingt ist. Lenzig et al. (2018) konnten mit Hilfe der Patch-Clamp Technik nachweisen, dass in HEK 293-Zellen BASIC aktiv ist und insofern auch zur Membran gelangen kann. Die Sensitivität der Immunfluoreszenz ist begrenzt und daher ist es möglich, dass ein Großteil der BASIC Proteinmenge am ER lokalisiert ist,

während ein kleiner, unter der Nachweisgrenze der Immunfluoreszenz liegender Teil zur Membran gelangt.

Viele DEG/ENaC-Kanäle beinhalten regulatorische Domänen und Sequenzmotive innerhalb der zytosolischen Domäne. Studien haben gezeigt, dass die zytosolischen Domänen als Ziel für regulatorische Prozesse der DEG/ENaC-Kanäle dienen (Kellenberger & Schild, 2015). Beispielsweise enthält ENaC ein konserviertes PY-Motiv in der C-terminalen Domäne, das als Bindungsstelle für Mitglieder der Nedd4-Familie der Ubiquitin-Ligasen dient (Staub et al., 1996). So wird die Oberflächenexpression durch die Nedd4-vermittelte Ubiquitinierung kontrolliert. Das Liddle-Syndrom, eine vererbte Form des Bluthochdrucks, wird durch eine Mutation innerhalb der Nedd4-Bindungsstelle von ENaC verursacht, die die Ubiquitinierung und folglich die Oberflächenexpression verändert (Staub et al., 1996; Shimkets et al., 1994; Staub et al., 1997).

Mehrere ASICs enthalten ein PDZ-Motiv an der C-terminalen Domäne, das als Interaktionsstelle für verschiedene regulatorische Proteine dient (Kellenberger & Schild, 2015). ASIC4 kommt vor allem im frühen Endosom vor, ein Prozess, der hauptsächlich durch ein Sequenzmotiv in der N-terminalen Domäne des Ionenkanals kontrolliert wird (Schwartz et al., 2015). Bei ASIC2 und ASIC3 wird die Selektivität bei monovalenten Kationen durch die zytosolische N-terminale Domäne beeinflusst (Coscoy et al., 1999). Bei ASIC1 wird die Permeabilität für Ca^{2+} durch die analoge Domäne beeinflusst (Bäsler et al., 2001). Dies verdeutlicht, dass die zytosolischen Domänen die physikalischen Poreneigenschaften affektieren können. In dieser Arbeit konnten keine Domänen identifiziert werden, die das Targeting von BASIC beeinflussen. In Studien von Wiemuth & Gründer et al. (2016) konnte nachgewiesen werden, dass die zytosolische N-terminale Sequenz von BASIC ein spezifisches regulatorisches Motiv beinhaltet.

Es wurde herausgefunden, dass die Aminosäuresequenz 15-25 eine 3,6 gängige α -Helix bildet, die durch eine amphiphile Verteilung der polaren und apolaren Reste charakterisiert ist. Diese Domäne inhibiert BASIC durch die Bindung an die Plasmamembran und stabilisiert so den geschlossenen Zustand des Ionenkanals. Trunkationen dieser Domäne machen den Kanal hyperaktiv.

Es gibt also eine zytoplasmatische Domäne bei BASIC, die die Kanalaktivität durch Membraninteraktion kontrolliert (Schmidt et al., 2016). Diese Feststellungen heben die Membransensitivität von BASIC hervor und verdeutlichen, dass die Plasmamembran für die Aktivität von BASIC eine Rolle spielt. Außerdem wurde nachgewiesen, dass bei HEK 293-Zellen die N-terminale Domäne in der Plasmamembran lokalisiert und dass die α -Helix entscheidend für diese Lokalisation ist.

In dieser Arbeit wurde die Expression von BASIC durch die Trunkationen nicht beeinflusst, weshalb vermutlich weder ein erhöhtes 'forward trafficking' noch ein reduziertes 'turnover' für die Verstärkung der Kanalaktivität verantwortlich war. Dies lässt vermuten, dass eine Sequenz innerhalb der Position 15-25 eine intrinsische inhibitorische Domäne beinhaltet, die die Kanalaktivität direkt affektiert.

4.2 Sind aktive Mechanismen für die Retention von BASIC im ER verantwortlich?

Der Transport von Proteinen innerhalb der Zelle wird, beginnend im endoplasmatischen Retikulum, durch die molekulare Erkennung von Signalsequenzen gesteuert. Es handelt sich dabei um kurze Bereiche von Aminosäuren, die sich an verschiedenen Stellen der Primärstruktur befinden können. Am Transport innerhalb des ER und aus dem ER heraus sind die folgenden Signale beteiligt: Erstens Retentionssignale, die den Transport aus dem ER verhindern, zweitens Rückholssignale, die für den Rücktransport entkommener Proteine im ER sorgen und drittens Exportsignale, die den Export aus dem ER lenken.

Die primäre Lokalisation von BASIC im ER lässt vermuten, dass ein aktiver Mechanismus an seiner Retention beteiligt ist. Es wäre interessant herauszufinden, ob das BASIC-Protein Sequenzmotive für die Retention im ER enthält. Di-Arginin-Motive sind in der Lage Membranprotein im ER zurückzuhalten (Michelsen et al., 2005). Dabei werden die Di-Arginin-Motive von COPI erkannt und der weitere Transport wird verhindert. In der Studie von Schwartz et al., 2015 konnte ein Carboxy-terminales Di-Arginin-Motiv als wichtig für das Targeting von ASIC4 identifiziert werden. Dieses Di-Arginin-Motiv verhinderte den weiteren Transport von ASIC4 zu späten Endosomen

und Lysosomen und es schien ASIC4 in den frühen Endosomen zurückzuhalten. Es wäre interessant herauszufinden, ob auch BASIC ein Di-Arginin-Motiv enthält, das für die Retention von BASIC im ER verantwortlich ist.

4.3 Was ist die physiologische Funktion von BASIC?

Die physiologische Funktion von BASIC ist bisher unbekannt. Seine Expression im Gallengang und seine Aktivierung durch Gallensäuren deuten auf eine Rolle beim epithelialen Transport und im Gallengang und evtl. im Darm hin. In *Xenopus* Oozyten zeigen rBASIC und mBASIC unterschiedliche elektrophysiologische Eigenschaften. Als rBASIC und mBASIC in HEK 293-Zellen exprimiert wurden, konnte beobachtet werden, dass mBASIC sich elektrophysiologisch und pharmakologisch ähnlich wie rBASIC verhält (Lenzig et al., 2018). Daraus lässt sich ableiten, dass das Expressionssystem die wesentlichen Eigenschaften von BASIC affektiert und man kann vermuten, dass die Membranzusammensetzung für diese Unterschiede verantwortlich ist (Lenzig et al., 2018). Da BASIC in unterschiedlichen Organen und Geweben wie Cholangiozyten in der Leber und UBC-Zellen (*unipolar brush cells*) im Zerebellum vorkommt, kann es sein, dass unterschiedliche Zelltypen unterschiedliche Kanaleigenschaften hervorrufen und somit auch unterschiedliche physiologische Funktionen besitzen. Daher wäre es interessant, BASIC sowohl in anderen heterologen Expressionssystemen als auch in Cholangiozyten und UBC-Zellen zu exprimieren, die BASIC endogen produzieren.

4.4 Aussicht

In Zukunft sollten weitere Versuche, insbesondere elektrophysiologische Messungen, gemacht werden, um mehr über die physiologische Funktion von BASIC zu erfahren.

Man sollte versuchen, herauszufinden, ob die neu identifizierte α -Helix noch andere mögliche Aufgaben besitzt. Denn bisher wurde bei den Mitgliedern der DEG/ENaC-Kanalfamilie nachgewiesen, dass solche Motive als Interaktionsstellen für regulatorische Prozesse dienen und wichtig für die

korrekte Funktion des Ionenkanals sind. Die inhibitorische Domäne von BASIC, die den geschlossenen Zustand stabilisiert, könnte als Zielscheibe für eine Bandbreite von regulatorischen Prozessen dienen.

Auch sollten weitere Experimente durchgeführt werden, um die mechanische Basis für den inhibitorischen Effekt der N-terminalen Domäne identifizieren zu können. Bisher wurde vermutet, dass die Bewegung der Transmembrandomänen, um den Kanal zu öffnen, allosterisch durch die in der Membran verankerte N-terminale Domäne verhindert wird.

Phosphorylierung oder jede andere Art von posttranslationaler Modifizierung innerhalb der α -Helix könnte in ihre Fähigkeit eingreifen, die Membran zu binden, was zu einer gesteigerten Aktivität von BASIC führen würde. ENaC ist auch ein Target für verschiedene posttranslationale Modifikationen, einschließlich der proteolytischen Spaltung in der extrazellulären Domäne, wodurch die Aktivität erhöht wird. Ähnlich zu diesem Aktivierungsmechanismus wäre es interessant herauszufinden, ob intrazelluläre Proteasen den N-terminalen Teil von BASIC während der Reifung spalten können.

Zusammenfassend verdeutlichen diese Ergebnisse, dass in heterologen Expressionssystemen BASIC im ER lokalisiert ist. Obwohl viele Fragen bezüglich seiner physiologischen Funktion und Lokalisation in nativen Zellen offen sind, kann behauptet werden, dass BASIC ein residenter Ionenkanal eines intrazellulären Kompartiments ist.

5 Zusammenfassung

Der *Bile acid-sensitive ion channel* (BASIC) ist ein Mitglied der DEG/ENac-Kanalfamilie. Die mRNA von BASIC wird vor allem im Gehirn, in der Leber und im Intestinaltrakt exprimiert. In der Leber ist die Expression auf die Cholangiozyten begrenzt und im Gehirn auf die UBC-Zellen. Wie der Name *bile acid-sensitive ion channel* andeutet, sind Gallensäuren natürliche Aktivatoren von BASIC. Die Funktion des Kanals ist bisher unklar.

In dieser Arbeit wurde die subzelluläre Lokalisation von BASIC untersucht. Nach transienter Transfektion von BASIC in den heterologen Zelllinien HEK 293 und CHO ließ sich ein retikuläres Verteilungsmuster beobachten. Zur Identifizierung dieses retikulären Verteilungsmusters wurden die Zellen mit fluoreszierenden Organellmarkern oder Antikörpern gefärbt und mittels konfokaler Laserscanning-Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Dabei konnte eine Kolo-kalisation von BASIC und anti-PDI, einem Antikörper gegen das endoplasmatische Retikulum, beobachtet werden.

In Folge wurde BASIC auf zytosolische Domänen untersucht, die für die subzelluläre Verteilung des Ionenkanals verantwortlich sein könnten. BASIC besteht aus zwei Transmembrandomänen, einer extrazellulären Schleife und kurzen intrazellulären Amino- und Carboxy-Termini. Es wurden Trunkationen am Amino- und Carboxyterminus durchgeführt, die keine Veränderung am Expressionsmuster von BASIC verursachten. Daher konnte kein Motiv im N- oder C-Terminus festgestellt werden, das sich als wichtig für das Targeting von BASIC herausstellt. Auch eine Membranfärbung war nicht zu erkennen.

Zusammenfassend konnte in dieser Dissertation eine Lokalisation von BASIC im endoplasmatischen Retikulum beobachtet werden und man kann annehmen, dass BASIC eine Rolle in diesem intrazellulären Kompartiment hat.

Summary

The bile acid-sensitive ion channel (BASIC) is a member of the degenerin/epithelial Na⁺ channel (Deg/ENaC) gene family. It is expressed mainly in brain, liver and intestine. In the liver the expression is limited on the cholangiocytes and in the brain on unipolar brush cells. As it's name bile acid-sensitive ion channel implies, BASIC is activated by bile acids. The physiological function of BASIC is yet unknown.

In this study the subcellular localisation of BASIC was examined. After transient transfection of BASIC in heterologous cell lines HEK293 and CHO, a reticular distribution pattern has been observed. To identify this reticular distribution pattern, cells were stained with fluorescent organelle markers or antibodies and were examined with confocal microscopy. In the process, a colocalisation of BASIC and anti-PDI, an antibody against endoplasmic reticulum, has been found.

In order, the protein sequence was analysed to identify motives that could be the reason for the distribution pattern of BASIC in the cell. BASIC consists of two transmembrane domains, an extracellular loop and short intracellular amino- and carboxy-termini. Some truncations on the amino- and carboxy-terminus were made, which did not cause any differences in the reticular distribution pattern of BASIC. Therefore no motive could be determined as important for the targeting of BASIC. A staining of the plasma membrane was also not detected.

In summary, this study could identify a localisation of BASIC in endoplasmic reticulum. So it can be suggested that BASIC plays a role in this intracellular compartment.

6 Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

6.1. Literaturverzeichnis:

Akopian A.N., Chen C.C., Ding Y., Cesare P., Wood J.N.: A new member of the acid-sensing ion channel family. (2000)

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K., Walter P.: Molekularbiologie der Zelle (2017) Wiley-VCH

Anzai N., Deval E., Schaefer L., Friend V., Lazdunski M., Lingueglia E.: The multivalent PDZ domain-containing protein CIPP is a partner of acid-sensing ion channel 3 in sensory neurons. (2002)

Appenzeller-Herzog C., Hauri H.: The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC) in search of its identity and function. (2006)

Assmann M., Kuhn A., Dürrnagel S., Holstein T.W., Gründer S.: The comprehensive analysis of DEG/ENaC subunits in Hydra reveals a large variety of peptide-gated channels, potentially involved in neuromuscular transmission. (2014)

Bässler E.L., Ngo-Anh T.J., Geisler H.S., Ruppertsberg J.P., Gründer S.: Molecular and functional characterization of acid-sensing ion channel (ASIC) 1b. (2001)

Benos D.J.: Amiloride: a molecular probe of sodium transport in tissues and cells. (1982)

Biagini G., Babinski K., Avoli M., Marcinkiewicz M., Séguéla P.: Regional and subunit-specific downregulation of acid-sensing ion channels in the pilocarpine model of epilepsy. (2001)

Boiko N., Kucher V., Wang B., Stockand J.D.: Restrictive expression of acid-sensing ion channel 5 (ASIC5) in unipolar brush cells of the vestibulocerebellum

Brodsky J.L.: Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. (1998)

Butterworth M.B.: Regulation of the epithelial sodium channel (ENaC) by membrane trafficking (2010)

Canessa C.M., Horisberger J.D., Rossier B.C.: Epithelial sodium channel related to proteins involved in neurodegeneration. (1993)

Canessa C.M., Schild L., Buell G., Thorens B., Gautschi I., Horisberger J.D., Rossier B.C.: Amiloride-sensitive epithelial Na⁺-channel is made of three homologous subunits. (1994)

Chen X., Qiu L., Li M., Dürrnagel S., Orser B.A., Xiong Z.G., MacDonald J.F.: Diarylamidines: high potency inhibitors of acid-sensing ion channels. (2010)

Coscoy S., de Weille J.R., Lingueglia E., Lazdunski M.: The pre-transmembrane domain of acid-sensing ion channels participates in the ion pore. (1999)

Coscoy S., Lingueglia E., Lazdunski M., Barbry P.: The Phe-Met-Arg-Phe-amide-activated sodium channel is a tetramer. (1998)

Duggan A., Garcia-Anoveros J., Corey D.P.: The PDZ domain protein PICK1 and the sodium channel BNaC1 interact and localize at mechanosensory terminals of dorsal root ganglion neurons and dendrites of central neurons. (2002)

Emtage L., Gu G., Hartwig E., Chalfie M.: Extracellular proteins organize the mechanosensory channel in *C. elegans* touch receptor neurons. (2004)

- Firsov D., Gautschi I., Merillat A.M., Rossier B.C., Schild L.: The heterotetrameric architecture of the epithelial sodium channel. (1998)
- Fisher M.M., Yousef I.M.: Sex differences in the bile acid composition of human bile: studies in patients with and without gallstones. (1973)
- Fukushige T., Siddiqui Z.K., Chou M., Culotti J.G., Gogonea C.B., Siddiqui S.S., Hamelin M.: Mec-12, an alpha-tubulin required for touch sensitivity in *C. elegans*. (1999)
- Garty H., Palmer L.G.: Epithelial sodium channels: function, structure and regulation. (1997)
- Gilmore R., Blobel G.: Transient involvement of signal recognition particle and its receptor in the microsomal membrane prior to protein translocation. (1983)
- Goldstein B.J., Kulaga H.M., Reed R.R.: Cloning and characterization of SLP3: a novel member of the stomatin family expressed by olfactory receptor neurons. (2003)
- Golubovic A., Kuhn A., Williamson M., Kalbacher H., Holstein T.W., Grimmelikhuijzen C.J., Gründer S.: A peptide-gated ion channel from the freshwater polyp *Hydra*. (2007)
- Görlich D., Prehn S., Hartmann E., Kalies K.U., Rapoport T.A.: A mammalian homolog of SEC61p and SECYp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation. (1992)
- Gründer S., Geissler H.S., Bassler E.L., Ruppertsberg J.P.: A new member of acid-sensing ion channels from pituitary gland. (2000)
- Gu G., Caldwell G.A., Chalfie M.: Genetic interactions affecting touch sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. (1996)

Hansson J.H., Nelson-Williams C., Suzuki H., Schild L., Shimkets R., Lu Y., Canessa C., Iwasaki T., Rossier B., Lifton R.P.: Hypertension caused by a truncated epithelial sodium channel gamma subunit: genetic heterogeneity of Liddle syndrome. (1995)

Haslewood G.A., Tökes L.: A new type of bile salt. (1971)

Hofmann A.: Bile acids: chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology and therapeutics. (2008)

Hofmann A.: Bile acids: trying to understand their chemistry and biology with the hope of helping patients. (2009)

Hruska-Hageman A., Benson C., Leonard A., Price M., Welsh M.: PSD-95 and Lin-7b interact with acid-sensing ion channel-3 and have opposite effects on H⁺-gated current. (2004)

Hruska-Hageman A.M., Wemmie J.A., Price M.P., Welsh M.J.: Interaction of the synaptic protein PICK1 (protein interacting with C kinase 1) with the non-voltage gated sodium channels BNC1 (brain Na⁺ channel 1) and ASIC (acid-sensing ion channel). (2002)

Huang L.S., Gu G., Ferguson E.L., Chalfie M.: A stomatin-like protein necessary for mechanosensation in *C. elegans*. (1995)

Jasti J., Furukawa H., Gonzales E.B., Gouaux E.: Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH. (2007)

Kellenberger S., Schild L.: Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. (2002)

Kellenberger S., Schild L.: International Union of BASIC and Clinical Pharmacology. XCI. Structure, function, and pharmacology of acid-sensing ion channels and the epithelial Na⁺ channel. (2015)

Kosari F., Sheng S., Li J., Mak D.O., Foskett J.K., Kleyman T.R.: Subunit stoichiometry of the epithelial sodium channel. (1998)

Kurschner C., Mermelstein P.G., Holden W.T., Surmeier D.J.: CIPP, a novel multivalent PDZ domain protein, selectively interacts with Kir4.0 family members, NMDA receptor subunits, neurexins, and neuroligins. (1998)

Lapatsina L., Jira J.A., Smith E.S., Poole K., Kozlenkov A., Bilbao D., Lewin G.R., Heppenstall P.A.: Regulation of ASIC channels by a stomatin/STOML3 complex located in a mobile vesicle pool in sensory neurons. (2012)

Lefèvre C.M., Diakov A., Haerteis S., Korbmacher C., Gründer S., Wiemuth, D.: Pharmacological and electrophysiological characterization of the human bile acid-sensitive ion channel (hBASIC). (2014)

Lenzig P., Wirtz M., Wiemuth D.: Comparative electrophysiological analysis of the bile acid-sensitive ion channel (BASIC) from different species suggests similar physiological functions. (2018)

Lifton R.P.: Genetic determinants of human hypertension. (1995)

Michelsen K., Yuan H., Schwappach B.: Hide and run. Arginine-based endoplasmic-reticulum-sorting motifs in the assembly of heteromultimeric membrane proteins. (2005)

Palmer L.G.: Ion selectivity of the apical membrane Na channel in the toad urinary bladder. (1982)

Price M.P., Thompson R.J., Eshcol J.O., Wemmie J.A., Benson C.J.: Stomatin modulates gating of acid-sensitive ion channels. (2004)

Qiao X., Ye M., Liu C.F., Yang W.Z., Miao W.J., Dong J., Guo D.A.: A tandem mass spectrometric study of bile acids: interpretation of fragmentation pathways and differentiation of steroid isomers. (2011)

Reeh P.W., Steen K.H.: Tissue acidosis in nociception and pain. (1996)

Sakai H., Lingueglia E., Champigny G., Mattei M.G., Lazdunski M.: Cloning and functional expression of a novel degenerin-like Na⁺ channel gene in mammals. (1999)

Sakakura H., Suzuki M., Kimura N., Takeda H., Nagata S., Maeda M.: Simultaneous determination of bile acids in rat bile and serum by high-performance liquid chromatography. (1993)

Savage C., Hamelin M., Culotti J.G., Coulson A., Albertson D.G., Chalfie M.: Mec-7 is a beta-tubulin gene required for the production of 15-protofilament microtubules in *Caenorhabditis elegans*. (1989)

Schaefer L., Sakai H., Mattei M., Lazdunski M., Lingueglia E.: Molecular cloning, functional expression and chromosomal localization of an amiloride-sensitive Na⁺ channel from human small intestine. (2000)

Schild L., Canessa C.M., Shimkets R.A., Gautschi I., Lifton R.P., Rossier B.C.: A mutation in the epithelial sodium channel causing Liddle disease increases channel activity in the *Xenopus laevis* oocyte expression system. (1995)

Schmidt A., Lenzig P., Oslender-Bujotzek A., Kusch J., Lucas S.D., Gründer S., Wiemuth, D.: The bile acid-sensitive ion channel (BASIC) is activated by alterations of its membrane environment. (2014)

Schmidt A., Löhner D., Alsop R.J., Lenzig P., Oslender-Bujotzek A., Wirtz M., Rheinstädter M.C., Gründer S., Wiemuth D.: A cytosolic amphiphilic α -Helix controls the activity of the bile acid-sensitive ion channel (BASIC). (2016)

Schwartz V., Friedrich K., Polleichtner G., Gründer S.: Acid-sensing ion channel (ASIC) 4 predominantly localizes to an early endosome-related organelle upon heterologous expression. (2015)

Setchell K.D., Rodrigues C.M., Clerici C., Solinas A., Morelli A., Gartung C., Boyer J.: Bile acid concentrations in human and rat liver tissue and in hepatocyte nuclei. (1997)

Shimkets R.A., Warnock D.G., Bositis C.M., Nelson-Williams C., Hanson J.H., Schambelan M., Gill J.R., Jr, Ulick S., Milora R.V., Findling J.W.: Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the β subunit of the epithelial sodium channel. (1994)

Staub O., Dho S., Henry P., Correa, J., Ishikawa T., McGlade J., Rotin, D.: WW domains of Nedd4 bind to the proline-rich PY motifs in the epithelial Na⁺ channel deleted in Liddle's syndrome. (1996)

Staub O., Gautschi I., Ishikawa T., Breitschopf K., Ciechanover A., Schil L., Rotin D.: Regulation of stability and function of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) by ubiquitination. (1997)

Tavernarakis N., Driscoll M.: Molecular modeling of mechanotransduction in the nematode *Caenorhabditis elegans*. (1997)

Tavernarakis N., Shreffler W., Wang S., Driscoll M.: Unc-8, a DEG/ENaC family member, encodes a subunit of a candidate mechanically gated channel that modulates *C. elegans* locomotion. (1997)

Varming, T.: Proton-gated ion channels in cultured mouse cortical neurons. (1999)

Voilley N., de Weille J., Mamet J., Lazdunski M.: Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors. (2001)

Waldmann R., Champigny G., Bassilana F., Heurteaux C., Lazdunski M.: A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. (1997)

Waldmann R., Champigny G., Lingueglia E., De Weille J.R., Heurteaux C., Lazdunski M.: H⁺-gated cation channels. (1999)

Waldmann R., Lazdunski M.: H⁺-gated cation channels: neuronal acid sensors in the ENaC/DEG family of ion channels. (1998)

Walter P., Blobel G.: Translocation of proteins across the endoplasmatic reticulum. II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes of in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. (1981)

Walter P., Blobel G.: Translocation of proteins across the endoplasmatic reticulum. III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes. (1981)

Wetzel C., Hu J., Riethmacher D., Benckendorff A., Harder L., Eilers A., Moshourab R., Kozlenkov A., Labuz D., Caspani O., Erdmann B., Machelska H., Heppenstall P.A., Lewin G.R.: A stomatin-domain protein essential for touch sensation in the mouse. (2007)

Wiemuth D., Assann M., Gründer S.: The bile acid-sensitive ion channel (BASIC), the ignored cousin of ASICs and ENaC. (2014)

Wiemuth D., Gründer S.: A single amino acid tunes Ca²⁺ inhibition of brain liver intestine Na⁺channel (BLINaC). (2010)

Wiemuth D., Gründer S.: The pharmacological profile of brain liver intestine Na⁺ channel: inhibition by diarylamidines and activation by fenamates. (2011)

Wiemuth D., Lefèvre C.M., Heidtmann H., Gründer, S.: Bile acids increase the activity of the epithelial Na⁺ channel. (2014)

Wiemuth D., Sahin H., Falkenburger B.H., Lefèvre C.M., Wasmuth H.E., Gründer S.: A single amino acid tunes Ca²⁺ inhibition of brain liver intestine Na⁺ channel (BLINaC). (2012)

Wiemuth D., Sahin H., Falkenburger B.H., Lefèvre C.M., Wasmuth H.E., Gründer, S.: BASIC- a bile acid-sensitive ion channel highly expressed in bile ducts. (2012)

Wiemuth D., Sahin H., Lefèvre C.M., Wasmuth H.E., Gründer, S.: Strong activation of bile acid-sensitive ion channel (BASIC) by ursodeoxycholic acid. (2013)

Xiang-ming Zha: Acid-sensing ion channel: trafficking and synaptic function. (2013)

Yermolaieva O., Leonard A.S., Schnizler M.K., Abboud F.M. Welsh M.J.: Extracellular acidosis increases neuronal cell calcium by activating acid-sensing ion channel 1a. (2004)

Yokoyama H.: Three-dimensional structure of membrane protein stomatin and function of stomatin-specific protease. (2010)

Zeng W.Z., Liu D.S., Xu T.L.: Acid-sensing ion channels: trafficking and pathophysiology. (2014)

Zha X.M.: Acid-sensing ion channels: trafficking and synaptic function. (2013)

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: BASIC stellt eine Subgruppe der DEG/ ENaC- Genfamilie dar

Abbildung 2: Schematische Darstellung einer DEG/ ENaC- Untereinheit

Abbildung 3: Schematische Darstellung des intrazellulären Transports von Membranproteinen („sekretorischer Weg“)

Abbildung 4: Schematische Darstellung der Vektoren pEGFP-C1 und pEGFP-N1

Abbildung 5: Fluoreszenzspektrum

Abbildung 6: Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops

Abbildung 7.1.: Expressionsmuster von pEGFP-rBASIC und pEGFP-mBASIC in HEK293-Zellen

Abbildung 7.2.: Expressionsmuster von pEGFP-rBASIC und pEGFP-mBASIC in CHO-Zellen

Abbildung 8.1.: Expressionsmuster von pEGFP-rBASIC und den frühen Endosomen, späten Endosomen, Recycling-Endosomen und Lysosomen in HEK293-Zellen

Abbildung 8.2.: Expressionsmuster von pEGFP-rBASIC und den frühen Endosomen, späten Endosomen, Recycling-Endosomen und Lysosomen in CHO-Zellen

Abbildung 9.1.: Expressionsmuster von pEGFP-rBASIC und dem endoplasmatischen Retikulum, dem Golgi-Apparat und den frühen Endosomen in HEK293-Zellen

Abbildung 9.2.: Expressionsmuster von pEGFP-rBASIC und dem endoplasmatischen Retikulum, dem Golgi-Apparat und den frühen Endosomen in CHO-Zellen

Abbildung 10.1.: Expressionsmuster von pEGFP-C3-ASIC1a und den frühen Endosomen, späten Endosomen, Recycling-Endosomen und Lysosomen in CHO-Zellen

Abbildung 10.2: Expressionsmuster von pEGFP-C3-ASIC1a und dem endoplasmatischen Retikulum, dem Golgi-Apparat und den frühen Endosomen in CHO-Zellen

Abbildung 11: N-terminale Trunkationen ($\Delta N10$, $\Delta N20$, $\Delta N30$ und $\Delta N40$) und eine C-terminale Trunkation (ΔC) von BASIC

Abbildung 12.1.: Expressionsmuster des pEGFP-rBASIC und der Trunkationen $\Delta N10$, $\Delta N20$, $\Delta N30$, $\Delta N40$ und ΔC in HEK293-Zellen

Abbildung 12.2.: Expressionsmuster des pEGFP-mBASIC und der Trunkationen $\Delta N10$, $\Delta N20$, $\Delta N30$, $\Delta N40$ und ΔC in HEK293-Zellen

Abbildung 12.3.: Expressionsmuster des pEGFP-rBASIC und der Trunkationen $\Delta N10$, $\Delta N20$, $\Delta N30$, $\Delta N40$ und ΔC in CHO-Zellen

Abbildung 12.4.: Expressionsmuster des pEGFP-mBASIC und der Trunkationen $\Delta N10$, $\Delta N20$, $\Delta N30$, $\Delta N40$ und ΔC in CHO-Zellen

Abbildung 13: Expressionsmuster des pEGFP-rBASIC und Dynamin wt, Dynamin Mutante bzw. Dynasore in CHO-Zellen

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Informationen über die Vektoren pEGFPC1 und pEGFP-N1

Tabelle 2: Liste aller in der Arbeit verwendeten Primer

Tabelle 3: Liste der in den Versuchen verwendeten Organellmarker mit RFP-Tag

Tabelle 4: Liste der in den Versuchen verwendeten Antikörper

Tabelle 5: PCR-Protokoll

7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Dominik Wiemuth für die großartige Betreuung und Unterstützung, für die Geduld bei meiner Einarbeitung und für die zahlreichen konstruktiven Ideen und Gespräche.

Bei Prof. Dr. Gründer möchte ich mich herzlichst für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung aller technischen und finanziellen Mitteln bedanken.

Ganz besonders danke ich Adrienne Oslender-Bujotzek und Monika Wirtz für die Hilfe und Geduld bei meiner Einarbeitung.

8 Erklärung zur Datenaufbewahrung

Erklärung § 5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten

- bei mir, ***Nirosha Sivagnanam, Bruckersche Straße 158C, 47839 Krefeld***

und

- im ***Institut für Physiologie*** des Universitätsklinikums Aachen

hinterlegt sind.

9 Erklärung über den Eigenanteil

Eidesstattliche Erklärung gemäß § 5 Abs. (1) und § 11 Abs. (3) 12. der Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich, **Frau Nirosha Sivagnanam**, an Eides statt, dass ich folgende in der von mir selbstständig erstellten Dissertation „**Subzelluläre Lokalisation von BASIC (bile acid-sensitive ion channel)**“ dargestellten Ergebnisse erhoben habe:

	Doktorandin Nirosha Sivagnanam	Doktorvater PD Dr.Dominik Wiemuth	Prof. Dr. rer. nat. Stefan Gründer	Summe (%)
Studienüberwachung		100		100
Studiendesign/Konzeption	30	70		100
Datenauswertung	100			100
Durchführung der Experimente	100			100
Bereitstellung von Materialien			100	100
Interpretation der Datenauswertung	70	30		100

Unterschrift der Doktorandin/des Doktoranden

Als Betreuer der obigen Dissertation bestätige ich die Angaben von Nirosha Sivagnanam

Unterschrift des Doktorvaters

10 Lebenslauf

Nirosha Sivagnanam

geboren am 23.09.1988 in Düsseldorf

Schulbildung

1995-1999	St. Mauritius-Schule, Meerbusch
1999-2001	Realschule Osterath, Meerbusch
2001-2008	Städtisches Meerbusch-Gymnasium, Meerbusch

Hochschulbildung

10/2008 - 12/2013	Studium der Zahnmedizin an der RWTH Aachen
-------------------	--

Berufserfahrung

08/2014 - 07/2016	Assistenz Zahnärztin bei „Die Pluszahnärzte“, Düsseldorf
09/2016 – 08/2018	Weiterbildungsassistentin für Kieferorthopädie bei „Dr. Folker Kieser & Partner“, Wuppertal
seit 09/2018	Angestellte Zahnärztin bei „360 Grad Zahnspange“, Düsseldorf

Sprachkenntnisse

Deutsch	
Englisch	verhandlungssicher
Französisch	Grundkenntnisse
Tamil	Muttersprache