

Aus der Universitätsklinik für Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
mit Poliklinik Tübingen

**Funktionsanalyse von GFP- und DsRed-Prestin-Isoform-
Fusionsproteinen an transfizierten HEK293A-Zellen mittels
patch-clamp, Fluoreszenzmikroskopie und
Rasterkraftmikroskopie**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Bader, Friedrich Roland

2020

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Knipper-Breer
2. Berichterstatter: Professor Dr. B. Hirt

Tag der Disputation: 17.12.2019



WIDMUNG
MEINEN ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungen.....	7
1. Einleitung.....	10
1.1 Fragestellung und Ziel der Arbeit.....	16
2. Material und Methoden.....	18
2.1 Zellkultur.....	18
2.1.1 Einfrieren/Auftauen von HEK-Zellen.....	18
2.2 Transfektion.....	19
2.2.1 Vorbereitung HEK-Zellen zur Transfektion.....	19
2.2.2 Transfektion mit Fugene.....	19
2.2.3 Transfektion mit Lipofectamine.....	20
2.3. Immunhistologie an transfizierten und untransfizierten HEK-Zellen.....	21
2.3.1 Fixierung mit Paraformaldehyd und einer Permeabilisierung.....	21
2.3.2 Fixierung mit Paraformaldehyd ohne Permeabilisierung.....	21
2.4 Mikroskopie.....	22
2.5 Rasterkraftmikroskopie (AFM).....	23
2.5.1 Versuchsaufbau AFM-Mikroskopie.....	23
2.5.2 Mechanischer Aufbau des AFM und Patch-Clamp.....	24
2.5.3 Technische Grundlagen des Rasterkraftmikroskops.....	26
2.5.4 Lichtzeigerdetektionsverfahren.....	27
2.5.5 AFM-Sensor.....	28
2.5.6 Kalibrierung des AFM-Sensors mithilfe einer Kraftabstandsgeraden.....	29

2.6	Patch-Clamp.....	29
2.6.1	Pipetten, Messelektrode, Lösungen.....	30
2.6.2	Spannungsprotokolle.....	30
2.6.3	Analyse der AFM-Daten mit Igor 4.0.....	31
3.	Ergebnisse	32
3.1	Das FL-Prestin-GFP-Fusionskonstrukt.....	32
3.1.1	Transfektion von GFP.....	32
3.1.2	Transfektion des FL-Prestin-GFP-Fusionskonstruktes.....	33
3.1.3	Transfektion des FL-Prestin in Versuchsansätzen mit unterschiedlichen Zellzahlen.....	34
3.2	Das 9b-Prestin-DsRed-Fusionskonstrukt.....	36
3.2.1	Transfektion von DsRed.....	36
3.2.2	Transfektion von 9b-Prestin-DsRed-Fusionskonstrukt.....	37
3.3	Transfektion von Rab10.....	37
3.3.1	Spezifitätsnachweis von Antikörperfärbungen in HEK-Zellen.....	38
3.3.2	Transfektion von Rab10, gefärbt mit anti-Rab Alexa Green.....	40
3.4	Transfektion von Calmodulin1.....	41
3.4.1	Spezifitätsnachweis anti-Calm Antikörper in HEK-Zellen.....	42
3.4.2	Transfektion von Calmodulin anti-Calm und Alexa Green.....	42
3.5	Kotransfektionen.....	44
3.5.1	Kotransfektion FL-Prestin-GFP mit dem 9b-Prestin-DsRed-Fusionskonstrukt.....	44
3.5.2	Kotransfektion FL-Prestin-GFP-Fusionskonstrukt mit Calmodulin1.....	46

3.6	Messung der Zellmembranauslenkung von untransfizierten und mit FL-Prestin transfizierten HEK-Zellen mittels AFM-Mikroskopie und Patch-Clamp.....	47
3.6.1	Zellmembranauslenkung durch schrittförmige Veränderung des Membranpotentials.....	48
3.6.2	Zellmembranauslenkung durch sinusförmige Membranpotentialänderung.....	50
3.6.3	Experimente mit untransfizierten und mit FL-Prestin transfizierten HEK-Zellen.....	53
4.	Diskussion.....	58
4.1	Expression und Lokalisation der Einzelkonstrukte.....	58
4.2	Expression und Lokalisation der Konstrukte bei Kotransfektion.....	62
4.3	Funktionelle Eigenschaften untransfizierter und mit FL-Prestin transfizierter HEK-Zellen.....	64
5.	Zusammenfassung.....	67
6.	Abbildungen und Tabellen.....	68
6.1	Abbildungsverzeichnis.....	68
6.2	Tabellenverzeichnis.....	69
7.	Literaturverzeichnis.....	70
8.	Danksagung.....	75
9.	Lebenslauf.....	76
10.	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	77

Abkürzungen

A	Ampere
Abb.	Abbildung
AFM/RFM	Atomic Force Microscopy / Rasterkraftmikroskopie
ÄHZ	Äußere Haarsinneszelle/ Haarsinneszellen
Alexa Green	grün leuchtendes Fluoreszenzprotein
anti-Rab	Primärantikörper gegen Rab10
AS	Aminosäure/Aminosäuren
bs	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin, Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calciumdichlorid
Calm	Gen des Proteins Calmodulin
CCD	optischer Sensor basierend auf der Charge-coupled Device Technologie
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cy3	Cyanine 3
DAPI	4'-6'-Diamidin-2- Phenylindol
dB	Dezibel
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DsRed	rot fluoreszierendes Protein aus <i>Discosoma rhodostoma</i>
EGTA	ethylen glycol tetraacetic acid
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	und andere

Ex-0	perilymphähnliche Lösung
F	Force, Kraft
FCS	fetal calf serum, fetales Kälberserum
FL	full length
h	Stunde/Stunden
HA	Hämagglutinin
HEK	human embryonal kidney
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hz	Hertz
GFP	green fluorescent protein
IHZ	Innere Haarsinneszelle/Haarsinneszellen
IZL	Intrazellulärlösung
K	Federkonstante
Kap.	Kapitel
KCL	Kaliumchlorid
KOH	Kaliumhydroxid
kV	Kilovolt
Merge	Überlagerung
min	Minute/Minuten
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumdichlorid
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
ms	Millisekunde/Millisekunden
mV	Millivolt
N	Newton
Na ₂ ATP	Dinatrium-Adenosintriphosphat, Puffer
NaCl	Natriumchlorid

NaOH	Natriumhydroxid
NaH ₂ PO ₄	Natriumphosphat
NLC	nicht-lineare Kapazitätsmessung
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerasekettenreaktion
pEGFP	plasmid enhanced green fluorescent protein
pGADT7	Vektor zum Transfizieren
PFA	Paraformaldehyd
Rab10	Ras-related protein Rab-10
rpm	rounds per minute / Umdrehung pro Sekunde
RNA	Ribonukleinsäure
rPrestin	Ratten Prestin
RT	Raumtemperatur, reverse Transkriptase
sec	Sekunde/ Sekunden
SLC	<u>S</u> olute <u>C</u> arrier <u>F</u> amily
sog.	sogenannt
Tab.	Tabelle
TMD	Transmembrandomäne
u.a.	und andere
UV	Ultraviolett
V	Volt
XYZ	Seiten-Tiefen-Höhenverstellbar
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
Ω	Ohm

1. Einleitung

Das Hörorgan

Das Gehör des Säugers besteht aus dem äußeren Ohr (Ohrmuschel, Gehörgang und Trommelfell), dem Mittelohr (Paukenhöhle mit den Gehörknöchelchen Hammer, Amboss und Steigbügel) und dem Innenohr, welches das Gleichgewichtsorgan und das Hörorgan, die sog. Hörschnecke (lat. Cochlea) enthält (Abb. 1). Die Funktion des Ohres besteht im Aufnehmen von mechanischen Schallwellen und deren Umwandlung in ein vom Gehirn verarbeitbares elektrisches Signal. Hierzu treffen die Schallwellen, die physikalisch gesehen Longitudinalwellen sind, zuerst auf die Ohrmuschel und werden hier auf den Gehörgang zentriert. Durch den Gehörgang wandernd treffen die Schallwellen auf das Trommelfell, das die Schallwellen mithilfe der Hebelwirkung der Gehörknöchelchen und der Druckverstärkung durch ein Flächenverhältnis von 17:1 zwischen Trommelfell und ovalem Fenster verlustarm von der Luft auf die Flüssigkeiten des Innenohres (Perilymphe) überträgt (Impedanzwandler) (Praxis der HNO-Heilkunde, Strutz/Mann 2017).

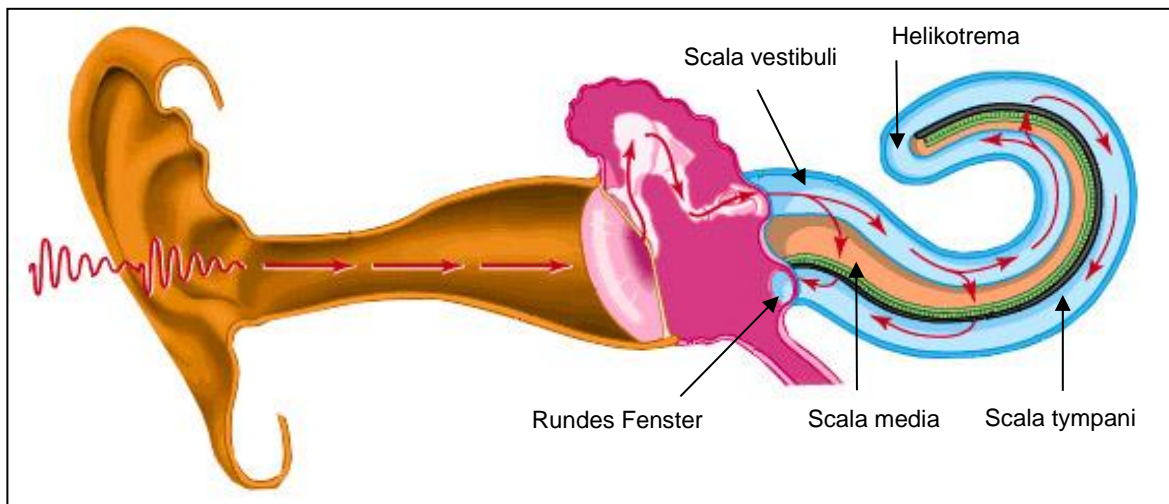


Abb. 1: Übersicht über die Schalleitung im Ohr: Außenohr (orange), Mittelohr mit Trommelfell und Gehörknöchelchen (rosa) und Innenohr. Die Cochlea ist schematisch abgerollt, dadurch sind die Scala vestibuli und die Scala tympani, die Perilymphe (hellblau) enthalten, und die Scala media, welche mit Endolymphe (hautfarben) gefüllt ist, ersichtlich. Die Basilarmembran ist in schwarz dargestellt, das Cortische Organ in grün. Verändert nach Encyclopaedia Britannica Online (2006).

Der Steigbügel, der als letzter Gehörknochen am ovalen Fenster zum Innenohr ansetzt, erzeugt durch Schwingungen Druckerhöhungen in der Perilymphe des Innenohres, die sich in der Scala tympani und Scala vestibuli (Abb. 1, 2) befindet. Die die Perilymphe umgebenden Wände, die Reissner-Membran und die Basilarmembran (Abb. 2), geben der Druckerhöhung nach und übertragen die Schwingung auf die Scala media (Endolymphschlauch) (Abb. 2). Je nach Frequenz der anregenden Schallschwingung bildet sich eine stehende Welle nahe dem ovalen Fenster (hohe Frequenz) oder nahe dem Helicotrema (tiefe Frequenz). Diese stehende Welle führt zu einer verstärkten Auslenkung der Basilarmembran gegenüber der Tektorialmembran (Abb. 2) am Ort der stehenden Welle (Gold, 1948; Praxis der HNO-Heilkunde, Strutz/Mann, 2017).

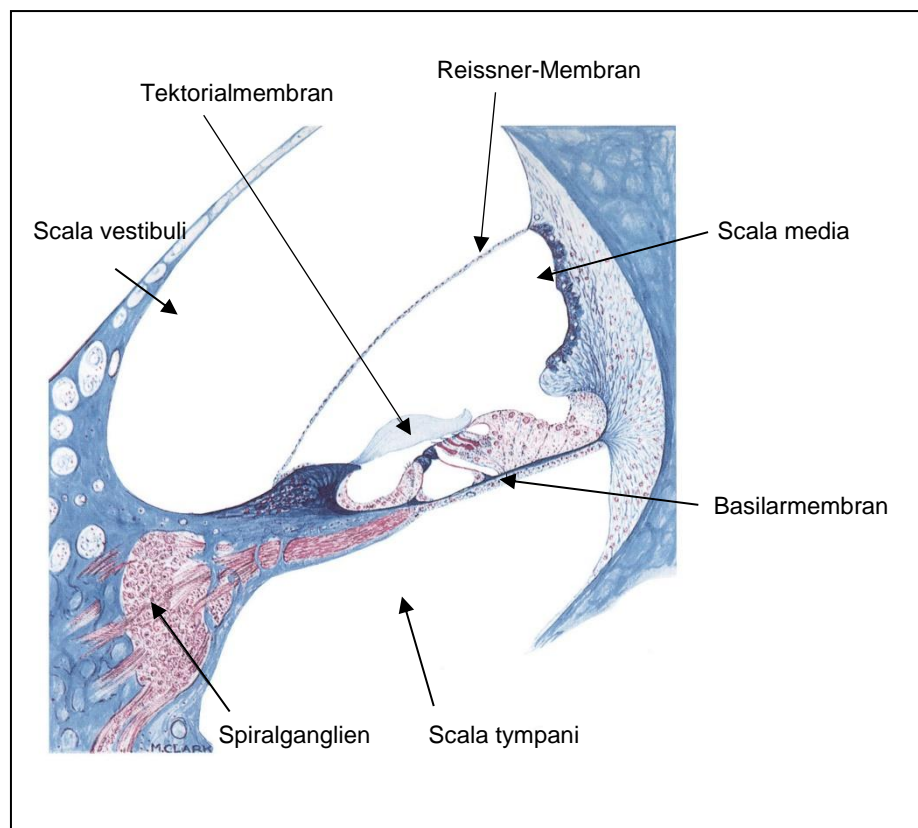


Abb. 2: Zeichnung eines Querschnitts durch eine Cochleawindung (Anillinblaufärbung). Orientierung: Medial links, lateral rechts. Verändert nach Standing (2005)

Dieser Ort ist für verschiedene Frequenzen unterschiedlich, so dass jede Frequenz des hörbaren Spektrums an einem anderen Ort entlang der Cochlea zu einer verstärkten Auslenkung der Basilarmembran gegenüber der Tektorialmembran führt. Die Frequenzselektivität der Wanderwelle ist jedoch zu gering, als dass sie die genauer auflösende frequenzspezifische Erregbarkeit einzelner Nervenfasern des N. cochlearis erklären würde (Robles & Ruggero, 2001).

Im Bereich des Cortischen Organs zeigen sich zwei Typen von Sensorrezeptorzellen. Zum einen eine Reihe von inneren Haarsinneszellen (IHZ), welche zu 95% afferent mit dem N. cochlearis verbunden sind (Typ I), zum anderen ihnen vorgelagert drei Reihen der äußeren Haarsinneszellen (ÄHZ), die über sogenannte afferente Typ II Fasern neuronal verknüpft sind. Die Entdeckung von otoakustischen Emissionen (OAE) sowie der Verlust der Frequenzselektivität bei Verlust der ÄHZ führten zur Entdeckung der Existenz eines mechanischen Verstärkerprozesses in der Cochlea, der als cochleärer Verstärker bezeichnet wird (Dallos, 2008; Ashmore, 2018).

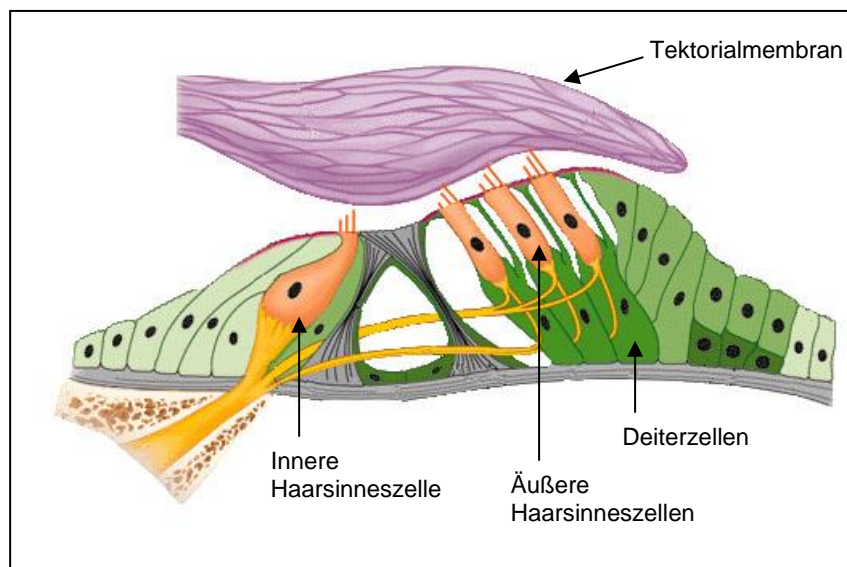


Abb. 3: Schematische Abbildung des Cortischen Organs: Tektorialmembran (lila), Haarsinneszellen (rosa) und Nervenfasern (orange). Verändert nach Encyclopaedia Britannica Online, 2000.

Der aktive cochleäre Verstärker

Die hohe Leistungsfähigkeit des Innenohres ist in besonderer Form von der aktiven Verstärkung der Wanderwelle in der Cochlea durch motile Zellantworten der ÄHZ abhängig (Dallos & Evans, 1995; Liberman et al. 2002; He et al., 2014). Bei der Signaltransduktion durch die ÄHZ wird ein mechanisches Signal (Wanderwelle) in ein weiteres mechanisches Signal (Kontraktilität) umgesetzt und diese Längenänderung über eine elektrische Reizweiterleitung kodiert. Man spricht hierbei von einer Vorwärts- und Rückwärts- Transduktion.

Eine weitere Erkenntnis besteht darin, dass das Membranpotential an der Zellmembran der ÄHZ durch Ionenströme raschen Änderungen unterliegt. Die Membranpotentialänderungen der ÄHZ werden in vivo durch die Auslenkung der Stereozilien der ÄHZ verursacht, welche bei Auslenkungen der Basilarmembran und der Tektorialmembran entsteht. Hierdurch kommt es zu einer Tip-links-gesteuerten Ionenkanalöffnung. Die ÄHZ reagieren auf diese Potentialschwankungen mit schnellen Längenänderungen (Kachar et al., 1986; Ashmore, 1987; Santos-Sacchi & Dilger, 1988; He et al., 2014). Für diesen Mechanismus wurde die Bezeichnung Elektromobilität geprägt (Zheng et al., 2003). Sie ist Teil des cochleären Verstärkers und funktioniert über eine mechanische Verstärkung von Vibrationen der Basilarmembran (Ashmore, 2018; Davis, 1983; Dallos, 1992).

Durch diese Verstärkung der cochleären Vibrationen durch die ÄHZ wird in hohem Maße die Sensitivität und Frequenzspezifität des menschlichen Hörorgans bestimmt (Dallos, 1992). Weiterhin wird die sensitive Hörschwelle um 40 dB, d.h. um das 100fache verstärkt (Gold, 1948; Dallos & Harris, 1978; Brown et al., 1983; Dallos et al., 1992; Santos-Sacchi & Zhao, 2003; He et al., 2014).

In Studien zeigte sich, dass ohne ÄHZ die Hörschwelle um 50 dB erhöht ist (Ryan & Dallos, 1975) und die Frequenzelektivität stark eingeschränkt oder nicht vorhanden ist (Dallos & Harris, 1978; He et al., 2014). Für diese zusätzlichen Vibrationen wurde das Protein Prestin verantwortlich gemacht (Dallos, 2008).

Prestin, das Motorprotein

Als Ursache für die kontraktile Zellantwort wurde schon früh die Existenz eines in der Zellmembran der ÄHZ lokalisierten Proteins vermutet (Forge et al., 1991). Im Jahre 2000 wurde das Protein identifiziert. Es erhielt den Namen Prestin, abgeleitet von dem musikalischen Tempobegriff *presto* (schnell) (Zheng et al., 2000 ; Dallos , 1996 ; Dallos & Fakler, 2002). Das Protein Prestin fügte sich als fünftes Mitglied in eine bekannte Genfamilie von Anionentransportern, der Genfamilie SLC26, ein, welche insgesamt aus elf Mitgliedern besteht (SLC26A1-SLC26A11) (Dallos & Fakler, 2002).

Das translatierte Prestinprotein zeigte ein auf die laterale Zellmembran begrenztes Expressionsmuster der ÄHZ in der Cochlea (Belyantseva et al., 2000; He et al., 2014), wie man es für das Motorprotein erwarten würde. Ein Merkmal von Prestin ist, dass es sich bei den kontraktile Längenänderungen der ÄHZ um einen nicht-enzymatischen Prozess handelt, sondern um eine direkte Umwandlung einer Konformationsänderung des Proteins die Membranspannungen in Kraft umzuwandeln (Dallos & Fakler, 2002; Song & Santos-Sacchi, 2010). Zytoplasmatische Anionen, insbesondere Chlorid, dienen hierbei über Interaktion mit einer Bindungsdomäne von Prestin als extrinsische Spannungssensoren, wodurch innerhalb von Mikrosekunden Spannungsänderungen in Konformationsänderungen des Prestinmoleküls und damit in Längenänderungen der ÄHZ transformiert werden (Oliver et al., 2001; Dallos & Fakler, 2002; Song & Santos-Sacchi, 2010).

Der momentane Stand der Forschung über den Aufbau von Prestin beschreibt einen hydrophoben Anteil, bestehend aus zehn bzw. zwölf Transmembrandomänen (TMD) und einem jeweils zytoplasmatisch liegenden N-terminalen und C-terminalen Anteil (He et al., 2014). Das Prestinprotein besteht aus 744 AS mit einem Molekulargewicht von 81.4 kDa, das sich als tetramäre Struktur aus vier Prestinproteinen in die Membran einfügt (He et al., 2010).

Der genaue Mechanismus, welcher bei der Längenveränderung der ÄHZ vor sich geht, ist zum Zeitpunkt der vorliegenden Studie noch unklar. Detaillierte Strukturinformationen des Proteins sind von entscheidender Wichtigkeit, um zu verstehen, wie es über Konformationsänderungen des Prestinproteins zu elektromechanischen Verstärkung der Basalmembran und damit zu elektromotiler Aktivität kommt.

Mithilfe von Strukturinformationen des Prestinproteins lässt sich Information gewinnen, welche einzelnen AS für die Ausprägung elektromotiler Eigenschaften des Proteins verantwortlich sind. Dafür ist es hilfreich, modifiziertes Prestin, bei dem einige AS ausgetauscht werden, in Zellsysteme *in vitro* zu transfizieren und dort ihre Funktion zu messen. Solche modifizierten Prestinproteine können dann über *in vitro* Studien auf ihre motilen Eigenschaften hin studiert werden. Hierbei werden sogenannte nicht-lineare Kapazitätsmessungen (NLC) eingesetzt, welche über Flächenänderungen von Membranen und das Ladeverhalten von Membranen gemessen werden können. (Ashmore, 1990; Oliver & Fakler, 1999; He et al., 2014). Mittels Atomarer Kraftmikroskopie (AFM, atomic force microscopy) kann darüber hinaus geprüft werden, ob Konformationsänderungen des Prestinproteins auch tatsächlich in zelluläre Längenänderungen (Kraft) übertragen werden (Gummer & Meyer, 2002).

1.1 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Ihre Form erhalten die ÄHZ durch ein spezialisiertes Zytoskelett, das der lateralen Plasmamembran angelagert ist. Diese spezialisierte Zellwand der ÄHZ besteht aus drei Komponenten: (1) der Plasmamembran, (2) dem kortikalen Netzwerk („cortical lattice“), das aus Aktin- und Spektrin-Filamenten der Haarsinneszellen besteht, und (3) den so genannten Pillar-Strukturen und den lateralen Zisternen („subsurface cisternae“) (Holley & Ashmore, 1990; Holley et al., 1992).

Es ist noch weitgehend unklar, wie die motilen Eigenschaften von Prestin auf die Basilarmembran übertragen werden. Es wird angenommen, dass das kortikale Netzwerk die Konformationsänderungen von Prestin, in die longitudinale Achse der ÄHZ überträgt und damit zu deren Motilität führt. Putativ könnte Prestin über eine Aufhängung am Zytoskelett eine Steifheit erzeugen, die die Schwingung auf die Basilarmembran überträgt. Ob Prestin dabei direkt am Zytoskelett verankert oder ob es zum Beispiel über andere Transmembranproteine indirekt mit dem Zytoskelett verbunden ist, sollte in der vorliegenden Studie geklärt werden. Dabei sollte explizit geprüft werden, ob mögliche Interaktionspartner die von der AG Knipper (Universität Tübingen, Deutschland) mit Hilfe des Yeast-two-Hybrid-Verfahren bzw. mittels der Massenspektroskopie identifiziert wurden (Heiydrich et al., 2008; Cimerman et al., 2013) (i), mit Prestin co-lokalisiert sind und (ii) ggf. die motilen Eigenschaften von Prestin verändern. So wurden als putative Interaktionspartner die Kandidatengene ras-related protein 10 (Rab10) sowie das Protein Calmodulin 1 und die trunkierte Isoform von Prestin, 9b-Prestin, identifiziert.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, in transfizierten Säugerzellen (HEK-Zellen) den Effekt einer Co-Transfektion des Full-length Proteins Prestin (FL-Prestin) mit definierten Interaktionspartnern mittels Kombination von whole-cell Patch-Clamp-Technik und AFM-Technik auf die Zelle zu prüfen.

Hierzu sollen folgende Fragen geklärt werden:

1. In welchen zellulären Kompartimenten werden die zu transfizierten Proteine i) FL-Prestin, ii) 9b-Prestin, iii) Calmodulin und iii) Rab10 exprimiert, wenn sie als singuläres Protein in HEK-Zellen transfiziert werden?
2. Tritt bei der Co-Transfektion der Proteine i) FL-Prestin und 9b-Prestin bzw ii) FL-Prestin und Calmodulin eine Kolokalisation der Fluoreszenzanfärbungen der Proteine auf?
3. Lässt sich die Zellmembran untransfizierter HEK-Zellen durch Membranpotentialänderung auslenken?
4. Lässt sich die Zellmembran von mit FL-Prestin transfizierten HEK-Zellen durch Membranpotentialänderungen auslenken und gibt es Unterschiede zur Auslenkung von untransfizierten HEK-Zellen bei Membranpotentialänderung?

2. Material und Methoden

2.1. Zellkultur

HEK-293 (human embryonal kidney) Zellen wurden in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen, Karlsruhe) mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) (Invitrogen, Karlsruhe) und 5%igem Penicillin und Streptomycin (Gibco, Invitrogen, Karlsruhe) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Haben die Zellen eine Konfluenz von 70-80% erreicht, werden sie nach folgendem Protokoll suspendiert. Das in Kultur befindliche Medium wird abgesaugt und die Zellen 1x mit 5 ml 10% phosphatgepufferter Salzlösung (PBS-Lösung) gewaschen. Die PBS-Lösung wird abgesaugt und den Zellen 1x 1 ml Trypsin-Lösung zugegeben. Sind die Zellen abgelöst, wird 5 ml DMEM zugegeben und die Zellsuspension in ein spezielles Plastikröhrchen (Falcon-Tube) überführt. Die Zellen werden nun für 5 min bei 700 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 1 ml DMEM resuspendiert. Nun erfolgt je nach weiterer Verwendung, z.B. für Transfektionen, die Zellzählung, oder beim Splitten, das Abfüllen der Suspension in große Falcon-Flaschen. Beim Splitten richtet sich die ausgesetzte Menge an Zellsuspension nach der Nachfrage an Zellen und der gewünschten Kultivierungsdauer.

2.1.1 Einfrieren/Auftauen von HEK-293 Zellen

Um Zellen einzufrieren, werden kultivierte Zellen wie in Kap. 2.1 beschrieben vom Boden der Falcon-Flasche abgespült, abtrypsiniert, abzentrifugiert und die Zellzahl und Zellvitalität mittels Zählkammer bestimmt. Die entstandene Zellsuspension wird nun für 2-5 min bei 1000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird mit dem Einfriermedium auf die gewünschte Zelldichte von $1-2 \cdot 10^6$ Zellen pro ml resuspendiert. Das Einfriermedium besteht aus 70% DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, Invitrogen GmbH, Darmstadt, Germany), 20% fetales Kälberserum (FCS, Gibco, Invitrogen GmbH) und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO). Die Suspension wird in 1 ml Aliquots in Kryoröhrchen überführt, auf -80°C über 12 h abgekühlt und dann in flüssigem Stickstoff gelagert. Nach 2 Wochen wird ein

Aliquot ausplattiert, um die Lebensfähigkeit der Zellen zu bestätigen. Zum Auftauen werden die tiefgefrorenen Zellen im 37°C-Wasserbad aufgetaut und mit 10 ml DMEM versetzt. Die Suspension wird für 3 min bei 800 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wird mit 2 ml frischem DMEM-Medium resuspendiert und in einer mit 10 ml DMEM versehenen Falcon-Flasche kultiviert. Innerhalb der nächsten 6-12 h erfolgt ein einmaliger Mediumwechsel, um Reste des Einfriermediums zu entfernen.

2.2 Transfektion

2.2.1 Vorbereitung der HEK-Zellen zur Transfektion

Um die HEK-Zellen zuerst transfizieren und nachfolgend entweder mittels der Fluoreszenzmikroskopie oder der AFM-Mikroskopie untersuchen zu können, werden die HEK-Zellen auf durchsichtigen Glasdeckplättchen ausplattiert. Hierzu werden die Deckgläschen zuerst in eine 24-kammrige Zellkulturschale (24-Multiwell Platte) überführt und zur besseren Anhaftung der Zellen mit 200 µl Poly-L-Lysin (Biochrom AG, Freiburg) beschichtet. Dann werden sie für 30 min bei RT inkubiert und zweimal mit PBS gewaschen. Nun werden 500 µl DMEM in die benutzten 24-Well-Platten gefüllt. Zur Zellzahlbestimmung werden die kultivierten Zellen mittels Trypsin (Gibco, Invitrogen, Karlsruhe) aus den Kulturflaschen gelöst, 5 min bei 700 rpm abzentrifugiert und die resuspendierten Zellen in einer 1% igen PBS-Lösung in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Zellen werden in folgenden Konzentrationen ausgesät: $0,5-2,0 \cdot 10^5$ Zellen pro Multiwell. 12 bis 24 h nach dem Aussäen der Zellen wurden diese unter dem Lichtmikroskop hinsichtlich ihrer Konfluenz beurteilt. Die erwünschte Konfluenz sollte 60-80% sein. Diese so vorbereiteten Deckgläser kommen bei der Transfektion mittels Fugene und Lipofectamine zum Einsatz.

2.2.2 Transfektion mit Fugene

Für die kombinierten AFM/Patch-Clamp-Experimente wurden die HEK-293 Zellen mit Fugene (Roche, Indianapolis) transfiziert. Diese Methode wurde gewählt, da man

zur Transfektion mit Fugene eine niedrigere Konfluenz der Zellen, etwa 60%, als bei der Transfektion mit Lipofectamine (Invitrogen, Karlsruhe) benötigt. Sie hat für Patch-Clamp Experimente den Vorteil, dass der Prozentsatz an Zellen, die noch keine Gap Junctions zu ihren Nachbarzellen ausgebildet haben, höher ist. Dies ist erforderlich, da in den folgenden Versuchen die Zellmembranauslenkung einzelner HEK-Zellen mittels der whole-cell Patch-Clamp-Technik und der AFM-Mikroskopie gemessen werden soll und nicht die Zellmembranauslenkung von mehreren Zellen. Für den Transfektionsansatz wurden zunächst 94 µl DMEM-Medium ohne FCS, Penicillin (Gibco, Invitrogen, Karlsruhe) und Streptomycin (Gibco, Invitrogen, Karlsruhe) mit 6 µl Fugene (Roche, Indianapolis) in einem Polystyrolröhrchen miteinander vermischt. Wegen der starken Adhäsion von Fugene zu glatten Oberflächen muss das Fugene in der Mitte der DMEM-Lösung unter stetigen Rühren verteilt werden, da sonst ein Film am Mischungsgefäß entsteht und keine optimale Mischung von Fugene und DMEM-Medium mehr erzielt werden kann. Als nächstes werden 2,5 µg DNA zugefügt und der Ansatz 15 min bei RT inkubiert. Bei den zur Transfektion vorgesehenen Zellen, die wie unter Kap. 2.2.1 vorbereitet wurden, wird nun das gebrauchte Medium abgesaugt und die Zellen mit 1x PBS-Lösung oder DMEM-Medium ohne FCS gewaschen. Der Trafokomplex wird auf die gewaschenen Zellen geträufelt und für 2 min inkubiert. Nun wird 3 ml neues DMEM hinzugegeben, wobei die Pipettenöffnung gegen den Petridish-Gefäßrand gehalten wird und das neue Medium sehr langsam abgelassen wird, um keine Zellen von der Deckglasoberfläche zu spülen. Der Ansatz wird nun für 12-18 h inkubiert und dann auf die Transfektionsrate überprüft.

2.2.3 Transfektion mit Lipofectamine 2000

Die Transfektion mit Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Karlsruhe) wurde nach dem für HEK-293 Zellen optimierten Herstellerprotokoll wie folgt durchgeführt. Der Transfektionsansatz besteht aus 2 Teilen. Für den ersten Teil werden 50 µl DMEM-Medium mit 0,8 µg, der verwendeten DNA, die transfiziert wird, vermischt, für den zweiten Teil 2 µl Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Karlsruhe) 50 µl DMEM-Medium,

ohne FCS, zugefügt. Beides wird für 5 min bei RT inkubiert. Nun werden die zwei Teile zusammengeführt, leicht gemischt und für 20 min inkubiert, um danach je 100 µl des Transfektionsansatzes auf die, wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, vorbereiteten Zellen zu geben. Nach einem einmaligen Mediumwechsel 4-6 h nach dem Hinzufügen des Transfektionsreagenzes werden die Zellen bis zur Immunhistochemie je nach Plasmid-DNA für 18-48 h bei 5% CO₂-Atmosphäre und 37°C inkubiert.

2.3 Immunhistochemie an transfizierten und untransfizierten HEK-Zellen

2.3.1 Fixierung mit Paraformaldehyd und einer Permeabilisierung

Zur Überprüfung der Proteinexpression von Rab10 und Calmodulin in transfizierten HEK-Zellen wurden diese mit PBS gewaschen, anschließend mit 2% oder 4%igem Paraformaldehyd 30 min auf Eis fixiert, mit PBS gewaschen mit 0,1% TritonX-100 (Sigma, Steinheim) in PBS für 3 min bei RT inkubiert und danach wieder in PBS gewaschen. Unspezifische Antigen-Bindungsstellen wurden mit 1%igem Rinderserumalbumin (BSA) in PBS für 30 min bei RT blockiert. Die Primärantikörper wurden in 0,5%igem BSA verdünnt und über Nacht mit den Zellen bei 4°C inkubiert. Die eingesetzten Primärantikörper mit ihren jeweiligen Verdünnungen sind in der Tab. 1 ersichtlich. Am nächsten Tag wurde erneut mit PBS gewaschen und daraufhin wurden die Sekundärantikörper in 0,5%igem BSA verdünnt für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Abschließend wurden die Zellen in 3 µl Vectashield DAPI (4'-6'-Diamidin-2-Phenylindol) eingedeckelt.

2.3.2 Fixierung mit Paraformaldehyd ohne Permeabilisierung

Diese Fixierungstechnik wurde analog wie unter Kap. 2.3.1 beschrieben, jedoch mit folgenden Änderungen durchgeführt: Zum einen wurde von dem Permeabilisierungsschritt mit TritonX-100 (Sigma, Steinheim) abgesehen und zum anderen nach der Fixierung und einem Waschschrift mit Rinderserumalbumin blockiert.

Tabelle 1: Verwendung von Primärantikörpern

Protein	Antikörper	Verdünnung, Hersteller	Spezies
Calmodulin	anti-Calm	1:400 (Santa Cruz Biotechnology, USA)	Maus
Rab 10	anti-Rab	1:750, 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology, USA)	Ziege
Rab10-HA- Fusionskonstrukt Calmodulin-HA- Fusionskonstrukt	anti-HA	1:1500 (Santa Cruz Biotechnology, USA)	Kaninchen

Tabelle 2: Verwendung von Sekundärantikörpern

Sekundärantikörper	Verdünnung, Hersteller	Spezies
Cy3-konjugiert - anti-Kaninchen - anti-Maus	1:1500, (Jackson Immuno Research Laboratories, USA)	Ziege
AlexaGreen-konjugiert - anti-Maus	1:1500, (Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe)	Ziege
Cy3-konjugiert - anti-Ziege	1:1500, (Jackson Immuno Research Laboratories, USA)	Kaninchen
AlexaGreen-konjugiert - anti-Ziege	1:1500, (Jackson Immuno Research Laboratories, USA)	Kaninchen

2.4 Mikroskopie

Für die Auswertung der mit fluoreszenzmarkierten Expressionsvektoren transfizierten Zellen stand ein aufrechtes Epifluoreszenzmikroskop der Firma Olympus vom Typ AX 70 (Olympus Optical GmbH, Hamburg, Germany) zur Verfügung. Die Bilder wurden mit der integrierten CCD und dem Computerprogramm

analySIS (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Deutschland) aufgenommen. Die verwendeten Fluoreszenzfilter und Fluoreszenzproteine, sowie die Anregungs- und Emissionswellenlängen sind in Tabelle 3 dargestellt. Anschließend wurden die Bilder mit Adobe Photoshop 6.0 nachbearbeitet und mit CoreIDRAW 12 arrangiert.

Tabelle 3: Verwendete Fluoreszenzproteine, Spektren und Fluoreszenzfilter

Fluoreszenzprotein	Excitation in nm	Emission in nm	Verwendete Filter
GFP	488	507	U-MWIB2 U-MWIBA2
DsRed	558	583	U-MWIG2 U-MWIY2
Cy3	552	565	U-MWIG2
Alexa Fluor 488 (Alexa Green)	495	519	U-MWIB2 U-MWIBA2

Verwendete Filter	Excitation Filter in nm	Emission Filter in nm	Verwendbare Fluoreszenzproteine
U-MWIB2	460-490	510	eGFP, AlexaGreen
U-MWIBA2	460-490	510-550	eGFP, AlexaGreen
U-MWIG2	520-550	580	DsRed, Cy3
U-MWIY2	545-580	610	DsRed

2.5 Rasterkraftmikroskopie (Atomic Force Mikroskopie, AFM)

2.5.1 Versuchsaufbau der AFM Mikroskopie

Die durchgeführten Experimente erforderten einen Versuchsaufbau, der es ermöglicht, gleichzeitig Zellmembranauslenkungen im Nanometerbereich zu messen, Zellen in einer Badlösung elektrisch zu stimulieren sowie diese und die

Messgeräte unter Sicht durch das Lichtmikroskop zu bedienen und zu kontrollieren. Die elektrische Stimulation der Zellen erfolgt mittels der Patch-Clamp Technik. Die Rasterkraftmikroskopie wurde zum Messen der an der Zelloberfläche auftretenden Kräfte verwendet. Da der verwendete Versuchsaufbau zum Teil eine Eigenkonstruktion der AG Prof. Lehmann-Horn/Langer (Angewandte Physiologie, Universität Ulm, Deutschland) ist, wird der Aufbau des AFM folgend etwas genauer beschrieben.

2.5.2 Mechanischer Aufbau des AFM und Patch-Clamp

Das verwendete Setup besteht aus drei Hauptteilen und ist in Abb. 4 abgebildet. Es verwendet ein inverses Lichtmikroskop, ein Rasterkraftmikroskop und die Patch-Clamp Elektronik. Das Setup ist auf einem schwingungs isolierten Tisch (Physikinstrumente GmbH, Karlsruhe, Deutschland) montiert, der die Beeinträchtigung der Messung durch Schwingungen im Bereich von 15 bis 100 Hz minimiert. Zur optischen Kontrolle der Experimente ist ein aufrechtes Lichtmikroskop (Axioskop FS, Zeiss, Deutschland), dargestellt in Abb. 4D, auf einem speziell angefertigten XY-Verschiebetisch aufgebaut und mittels zweier Mikrometerschrauben horizontal verschiebbar. Hierdurch kann das Mikroskop unabhängig vom AFM-Kraftsensor und der Patchpipette positioniert werden. Für Versuche ist das Mikroskop magnetisch mit dem Versuchstisch gekoppelt und kann entkoppelt werden, um das Mikroskop aus dem Probenkammerbereich herauszufahren. Nun sind die Probenkammer und der AFM-Sensor frei zugänglich. Zur Abbildung der Präparate wird ein 40x/0,75 Wasserimmersionsobjektiv (Achroplan, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) verwendet (Abb. 4 A, B, C). Die Außenseite des Wasserimmersionsobjektivs ist mit einem Polymerfilm beschichtet, der einen elektrischen Kontakt von Badlösung und dem geerdeten Metalltubus des Objektivs verhindert. Objekte werden entweder über ein Okular (10x Vergrößerung) oder eine CCD-Kamera (Hamamatsu C2400, Japan) beobachtet, welche zur Erhöhung der mechanischen Stabilität des Detektionssystems vom Mikroskopgehäuse entkoppelt sind. Der Patch-Clamp Vorverstärker, der

Probenkammermanipulator und das RKM sind auf einer Stahlplatte über der Grundplatte des Tisches montiert. In Abb. 4 A ist die Anordnung skizziert. Biologische Präparate werden in einer speziell konstruierten runden Flüssigkeitskammer (liquid chamber in Abb. 4 B, C) untersucht. Sie besteht aus einem Polyoximethylen-Copolymerwerkstoff, der sich leicht bearbeiten lässt und innerhalb eines großen Temperaturbereiches stabil ist. In der Mitte befindet sich eine kreisförmige Aussparung für ein Deckglas (Abb. 4 B, C), welches mit niedrigschmelzendem Wachs an der Kammer befestigt wird. Die Kammer selbst findet durch drei Magnete auf der Deckplatte eines in zwei Achsen verschiebbaren Probenmanipulators (Stage M-461-XY-M, Newport Inc., Irvine, California, USA) Platz. Der Probenmanipulator ist auf einem kleinen, piezoelektrischen Stapel (Marco Systemanalyse und Entwicklung GmbH, Dachau, Deutschland) montiert (piezoelectric scan table in Abb. 4 A). Er und die auf ihm gelagerten Proben können somit an die AFM-Spitze vertikal herangefahren werden. Der AFM-Sensor selbst ist auf einem 2-Achsenverschiebtisch (Newport Inc., Irvine, California, USA) montiert (schematisch als AFM-Head in Abb. 4 A). Dieser besteht wie dargestellt aus einer XY-Verschiebvorrichtung und einer darauf gelagerten, um 27° gekippten, Verschiebvorrichtung, die es ermöglicht, den AFM-Sensor punktgenau über dem Präparat zu positionieren. Neben dem AFM-Verschiebetisch ist der Patch-Clamp Vorverstärker (MM3-nanomanipulator in Abb. Abb. 4 A, B), mit einer Halterung für die Patch-Clamp Pipette befestigt. Diese und der Vorverstärker sind in einem Bauelement zusammengefasst (Abb. 4 A, B; MM3-nanomanipulator). Der Aufbau der Vorverstärker-Patchpipetteneinheit ermöglicht über einen XYZ-verschiebblichen Manipulator und eine darauf montierte 30° gekippte Schiene das Heranführen der Patch-Pipette von schräg oben an die Zelle.

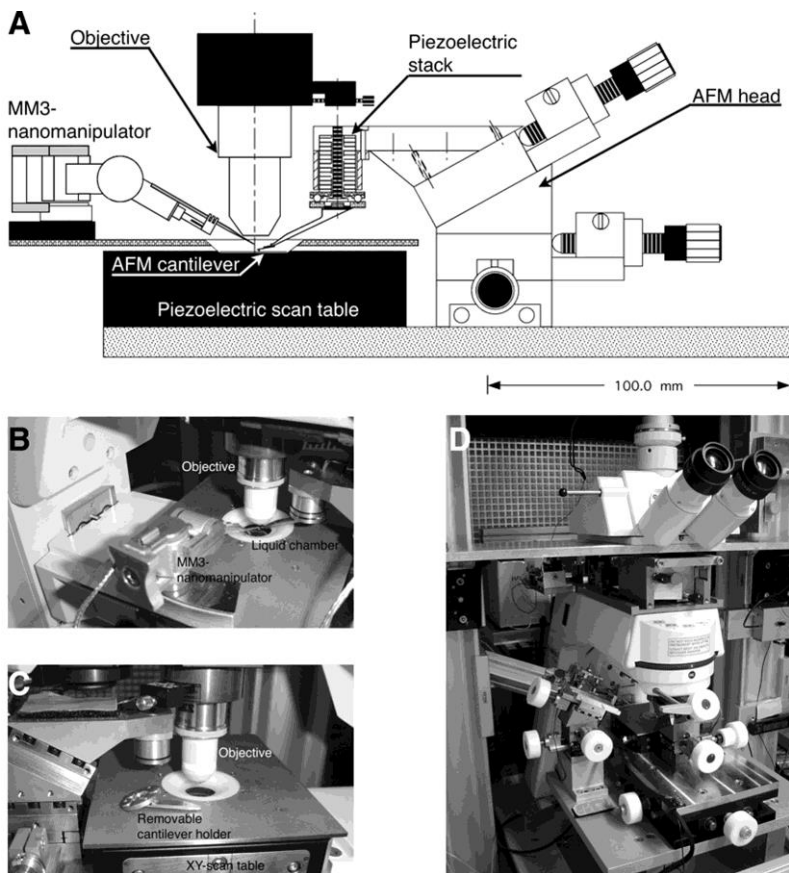


Abb. 4 Schematischer Aufbau der kombinierten AFM- und Patch-Clamp-Versuchseinrichtung. **A.** Räumliche Anordnung des Patch-Clamp-Vorverstärkers, Immersionsobjektiv, AFM-Halterung und piezoelektrischer Tisch, welcher die Flüssigkeitskammer mit den zu untersuchenden Zellen trägt. **B.** Detailansicht der Anordnung Immersionsobjektiv, Flüssigkeitskammer und Patch-Clamp-Vorverstärker (MM3-Nanomanipulator während einer Messung). **C.** Untersuchungsstellung zur Zellenuntersuchung ohne in Messstellung befindlichen AFM-Sensor und Patch-Clamp-Vorverstärker. **D.** Gesamtansicht.

2.5.3 Technische Grundlagen des Rasterkraftmikroskops (AFM)

Zur Erfassung, der durch Membranpotentialänderung induzierten Zellmembranauslenkung, wird ein Rasterkraftmikroskop verwendet. Das Rasterkraftmikroskop, erlaubt die Abbildung elektrisch isolierter Oberflächen durch die Messung kleiner Höhenunterschiede benachbarter Punkte einer Oberfläche und die Messung und Applikation kleiner Kräfte ($> 10^{-11}$ N). Die Funktion des RKM beruht darauf, dass ein freischwebender Balken der Federkonstante k von einer lokal wirkenden Kraft ausgelenkt wird und dies zu einer veränderten Reflexion eines auf den Balken projizierten Lasers führt. Die Federkonstante der verwendeten AFM-

Sensoren betrug 10^{-2} N/m. Diese wird detektiert und ergibt die Auslenkung Δz des Balkens. Nach dem Hookschen Gesetz $F = \Delta z \cdot k$ kann man nun die auf den Sensor wirkende Kraft berechnen.

2.5.4. Lichtzeigerdetektionsverfahren

Durch die Auslenkung der Zellmembran nach oben oder unten wird auf den AFM-Sensor in dieser Richtung eine Kraft ausgeübt. Dies führt dazu, dass der Sensor in der vertikalen Richtung nach oben oder unten gedrückt und somit ausgelenkt wird. Durch die Auslenkung des Sensors wird der Winkel des Balkens des AFM-Sensors zum Laserstrahl, der zur Detektion eingesetzt wird, verändert. Durch die Veränderung des Reflexionswinkels verändert sich die Abbildungsposition des Lasers auf einer 4-Sektor-Photodiode mit vier gleichgroßen, quadratisch angeordneten Detektionsflächen. Aus dem Detektionsunterschied zwischen den beiden oberen Flächen und der Gesamtintensität wurde die Änderung der Winkels α und damit die Änderung der Kraft errechnet.

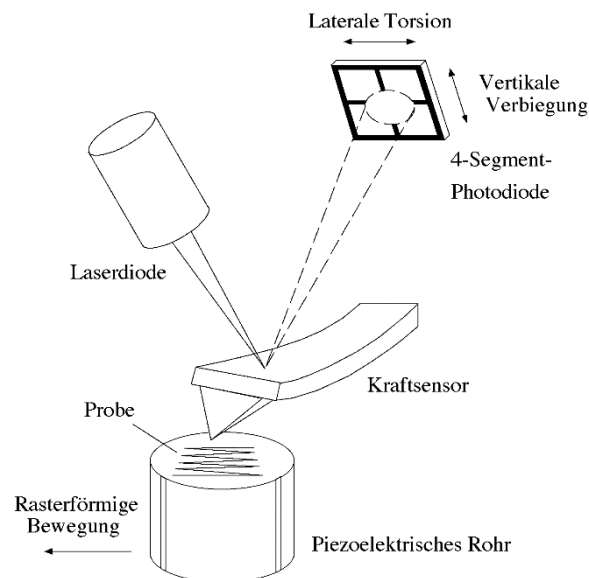


Abb. 5 Schema Lichtzeigerdetektionsverfahren. Die Laserdiode strahlt monochromatisches Licht auf den AFM-Sensor. Die Intensität des reflektierten Laserstrahls wird von einer 4-feldrigen Photodiode gemessen. Auslenkungen führen zu Änderungen des Reflexionswinkels und zu abweichenden gemessene Intensitäten zwischen den oberen beiden Segmenten und den unteren beiden Segmenten. Hieraus wird die Auslenkung in nm bestimmt.

2.5.5 AFM-Sensor

Die hier verwendeten Kraftsensoren (Microlever, Park Scientific Instruments, Sunnyvale, CA, USA) bestehen aus Siliziumdioxid. Für die folgenden Versuche wurden Kraftsensoren mit einer pyramidenförmigen Spitze verwendet. Diese bestehen aus zwei Einfachbalken (Balkendicke: ca. $0,6 \mu\text{m}$), die ausgehend von einem Halterungselement, welches als Verbindung zum XYZ-Manipulator dient, konvergent verlaufen. Somit bilden beide Balken einen Kraftsensor mit Dreiecksgeometrie, an dessen freischwingendem Ende sich wiederum eine pyramidenförmige Spitze befindet. Die Oberfläche ist zur Verbesserung der Reflexion des Laserstrahls mit Gold bedampft (Schichtdicke zwischen 2 und 5 nm). Am gemeinsamen Endpunkt der beiden Balken befindet sich eine Pyramide mit einer Grundfläche von $4 \times 4 \mu\text{m}$ und einer Höhe von $3 \mu\text{m}$. Der Öffnungswinkel der Pyramidenspitze beträgt 70° , bei einem Spitzenkrümmungsradius von ca. 50 nm . Bei den gezeigten Untersuchungen kam nur der längste V-förmige Sensor (Abb. 6) mit einer Federkonstanten von $k = 0,01 \pm 0,0045 \text{ [N/m]}$ (Angabe des Herstellers) zum Einsatz.

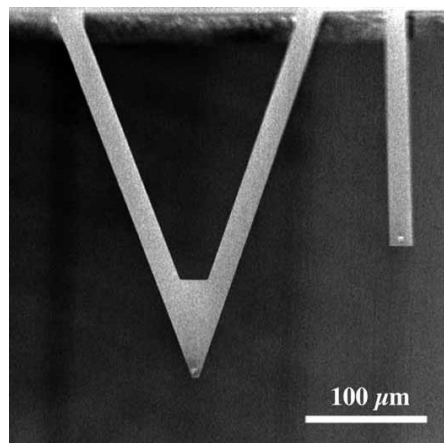


Abb. 6 AFM-Sensoren. Rechts ist ein balkenförmiger AFM-Sensor dargestellt. Für die folgenden Versuche wurde ausschließlich der V-förmige Sensor (links) verwendet. Der Laserpunkt wurde auf der Fläche an der Spitze des V plziert.

2.5.6 Kalibrierung des AFM-Sensors mithilfe einer Kraftabstandsgeraden

Um die Abhängigkeit der Sensorauslenkung von der auf ihn einwirkenden Kraft zu bestimmen, wird der vertikal piezoelektrisch verschiebbliche Tisch mit konstanter Geschwindigkeit gegen den Sensor gefahren. Da der zurückgelegte Weg des Tisches bekannt ist, kann nun die Intensitätsdifferenz von den oberen und unteren Segmenten der Photodiode im Verhältnis zur Gesamtintensität in eine Auslenkung des Sensors in nm umgerechnet werden. Durch Multiplikation der Federkonstanten mit dem Weg kann die auf den Sensor wirkende Kraft berechnet werden.

2.6 Patch-Clamp

Zur Kontrolle des Membranpotentials der Versuchszellen wird die sogenannte Patch-Clamp Technik (Hamill et al., 1981) verwendet. Diese ist eine elektrophysiologische Methode zur Ableitung von Transmembranströmen und Transmembranpotentialen. Mithilfe einer Glaspipette, die mit intrazellulärer Lösung gefüllt ist, wird an die ausgewählte Zelle herangefahren und ein Unterdruck angelegt sowie ein kleines Stück Zellmembran in die Pipette eingesaugt. Durch Van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen, Ca^{2+} und Salzbrücken (Opsahl & Webb, 1994) kommt es dann zu einer Verbindung zwischen Zellmembran und Pipette. Die Verbindung (*Seal*) ist idealerweise sehr hoch und hat einen Widerstand von 10^9 Ohm. Es fließt somit beim Anlegen einer Spannung fast kein Strom (ionisierte Ladungsträger) durch nicht abgedichtete Stellen zwischen eingesaugter Zellmembran und Pipettenwand. In diesem Fall spricht man von einem Gigaseal. Der mit der Pipettenöffnung angesaugte Membranfleck (Patch) wird durch Aufbringen eines stärkeren Unterdruckes durchbrochen, ohne den hochohmigen Abschluss zwischen Pipettenöffnung und Zellmembran zu verlieren. Diese Konfiguration bezeichnet man als Whole-Cell. Nun kann mithilfe der Pipette das Membranpotential konstant (voltage clamp) gehalten und so die Transmembranströme (im Bereich von 10^{-12} A) gemessen werden. Dazu wird ein Patch-Clamp Verstärker verwendet, der sinusförmige sowie schrittförmige

Änderungen des Membranpotentials zwischen -80 und + 20 mV an der Zellmembran anlegt.

2.6.1 Pipetten, Messelektrode und Lösungen

Für die Patch-Clamp Messungen wurden Quarzglas kapillaren (Außendurchmesser [A.D.] 1 mm; Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland) auf einen Spitzendurchmesser von ca. 1 μm ohne weitere Nachbearbeitung (Polieren oder Beschichten) ausgezogen. Das Ausziehen der Pipetten geschah mit Hilfe eines Laser-Pullers (P-2000, Sutter Instrument Company, Novato, CA, USA) sowie eines DMZ Universal Pullers (Dagan Corp., Minneapolis, Minnesota, USA). Die Messkapillaren wurden mit Intrazellulärlösung (siehe unten) gefüllt, in die ein chlorierter Silberdraht als Elektrode hineinragte. Die Chloridionen vermitteln durch ihren Übergang zwischen wässriger Lösung und Silberdraht den Ionenstrom. Der Pipettenwiderstand in der extrazellulären Badlösung betrug 2-4 M Ω . Die perilymphähnliche Extrazellulärlösung (Ex-0) in der Probenkammer des Mikroskops bestand aus (Angaben in [mM]): KCl 5,8; NaCl 144; MgCl₂ 0,9; CaCl₂ 1,3; NaH₂PO₄ 0,7; D-Glucose 5,6; HEPES-Puffer 10,0; NaOH (für pH 7,4) 3,0 - 5,0 (Kros et al., 1992). Des Weiteren wurde für die Patch-Clamp Ableitung eine Intrazellulärlösung (IZL) eingesetzt, die (Angaben in [mM]): KCl 135; MgCl₂ 3,5; CaCl₂ 0,1; Na₂ATP 2,5; EGTA 5,0; HEPES-Puffer 5,0; KOH (für pH 7,4) 3,0 – 5,0 (Kros et al., 1992, modifiziert) enthielt. Beide Lösungen wurden steril filtriert (Sterivex-GSTM 0,22 μm Filterunit with filling bell, Millipore, Bedford, MA, USA und Minisart RC4, Porengröße: 0,2 μm , Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) und nach ihrer Herstellung kühl gelagert (Ex-0 bei +3°C und IZL bei -80°C).

2.6.2 Spannungsprotokolle

Beim Heranführen der Patch-Pipette an die HEK-Zelle wird an der Pipette eine Spannungsänderung von 0 mV auf 80 mV für 100 ms angelegt. Um das Seal herzustellen, wird mithilfe von Unterdruck die Zellmembran an die Pipettenspitze gesaugt. Wenn die Zellmembran die Pipettenspitze abschließt, sinkt der der

angelegten Spannung von 80 mV folgende Strom. Der noch fließende Reststrom wird zur Bestimmung des Seals verwendet. Nach dem Herstellen eines Seals wird zur Bestimmung des Sealswiderstandes das Membranpotential in 10 mV-Schritten von -80 bis +20 mV erhöht und ein eventuell fließender Strom über die Membran oder ein Leck zwischen Membran und Pipette gemessen. Hieraus wird mittels $R=U/I$ der Widerstand des Seals bestimmt. Beträgt der Seal zwischen 3-5 Gigaohm, können die Versuche erfolgen. Eine detaillierte Beschreibung des Aufbaus der Spannungsprotokolle erfolgt ab 3.6 im Ergebnissteil der Arbeit.

Die gewonnenen Daten werden in der Messsoftware Scanclamp (Sensory Biophysics Group, Applied Physiology Ulm, Germany; THRC, Tübingen, Germany) auf einer Zeitachse aufgetragen. Die aufgenommenen Daten werden als IGOR Dateiformate (IGOR 4.0, WaveMetrics Inc., Lake Oswego, Oregon, USA) exportiert und weiterverarbeitet.

2.6.3 Analyse der AFM-Daten mit Igor 4.0

Die AFM-Rohdaten werden zusammen mit der ebenfalls aufgezeichneten über Patch-Clamp applizierten Spannung zur Änderung des Membranpotentials in das Programm IGOR (Wavemetrics Inc., Lake Oswego, Oregon, USA) importiert. Hier werden die gemessenen AFM-Daten dem entsprechenden Membranpotential zugeordnet, bei welchem die AFM-Daten gemessen wurden. Mithilfe des bestimmten Kalibrierungsfaktors kann die relative Auslenkung des AFM-Sensors in nm für einen Wert der Membranpotentialänderung berechnet werden. Für Protokolle wie die sinusförmige Stimulation, bei welcher eine Membranpotentialänderung 10 mal hintereinander durchgeführt wurde, werden die Mittelwerte für die Auslenkung für einen Wert der Membranpotentialänderung (-80 bis +20 mV) für eine Zelle berechnet. Dies erfolgt für jede einzelne gemessene Zelle. Anschließend wurden aus den einzelnen Auslenkungen der gemessenen Zellen die Mittelwerte für mehrere Zellen bei dem jeweils bei der Messung vorliegenden Setpoint, also der Kraft, mit welcher der Sensor auf die Zellmembran drückte, gebildet. Die zugehörigen Ergebnisse sind in ab Kap.3.1 dargestellt.

3. Ergebnisse

Um mögliche Interaktionspartner von Prestin) zu identifizieren wurde in einem ersten Ansatz die Transfektion mit GFP gekoppeltem Full-Length-Prestin (FL-Prestin)-Protein in einem in vitro Zellsystem etabliert (3.1.), dieses mit der Transfektion einer gekoppelten trunkierten Prestin Isoform verglichen (3.2), die Transfektion der putativen Interaktionspartner Rab10 (3.3) und Calmodulin 1 (3.4) etabliert und schließlich die Cotransfektion von FL-Prestin mit Bindungspartnern (3.5) untersucht. Weiterhin wurde ein System etabliert, um die funktionelle Beeinflussung in Form der Zellmembranauslenkung von HEK-Zellen durch Transfektion von Prestin mit Hilfe der whole-cell Patch-Clamp-Technik und der Rasterkraftmikroskopie zu messen.

3.1 Das FL-Prestin-GFP-Fusionskonstrukt

3.1.1. Transfektion von green fluorescent protein (GFP)

Für die Expressionsversuche zur Membranständigkeit und subzellulären Lokalisation von Prestin und seinen putativen Interaktionspartnern musste in einem ersten Versuchsansatz überprüft werden, ob GFP, das in späteren Versuchen als FL-Prestin-GFP-Fusionskonstrukt zum Nachweis der Expression von FL-Prestin benutzt werden soll, unabhängig von FL-Prestin in die Membran transportiert wird. Dazu wurden in Kultur befindliche HEK-Zellen mit GFP alleine transfiziert und die Transfektionsrate nach 48 h - 60 h mittels Fluoreszenzmikroskopie kontrolliert.

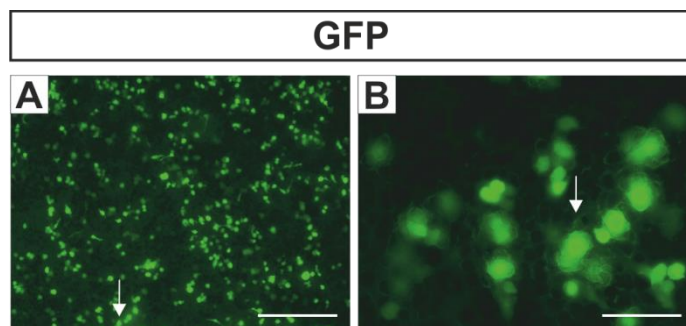


Abb. 7: Fluoreszenzbilder von HEK-Zellen transfiziert mit GFP. Maßstab in A 200 µm, in B 50 µm.

GFP wurde bei einer Emissionswellenlänge von 509 nm visualisiert. In Abb. 7 sind exemplarisch in zwei verschiedenen Vergrößerungen mit GFP transfizierte HEK-Zellen (Zelldichte: $0,5 \times 10^5$ Zellen) dargestellt. Die vergleichsweise hohe Transfektionsrate des GFP Konstrukts (Abb. 7 A) machte eine genaue Quantifizierung der Transfektionsrate überflüssig. Es zeigte sich erwartungsgemäß eine dominante cytoplasmatische Expression (Abb. 7 B).

3.1.2. Transfektion des FL-Prestin-GFP-Fusionskonstruktes

Im nächsten Ansatz wurde die Transfektion mit einem FL-Prestin-GFP-Fusionskonstrukt in HEK Zellen versucht. Die Zellen wurden, wie unter Material und Methoden beschrieben, für 6 h mit dem DNA-Plasmid transfiziert und für weitere 48h-60 h inkubiert. Danach wurden die Ansätze fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

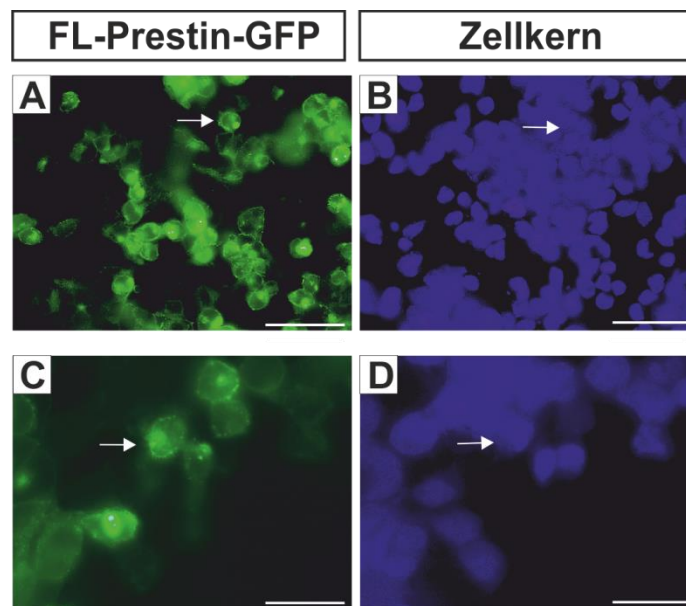


Abb. 8: Fluoreszenzbilder von HEK-Zellen transfiziert mit dem FL-Prestin-GFP-Fusionskonstrukt. Beispiel A, B sind in 40 facher, Beispiel C, D in 100 facher Vergrößerung dargestellt. A, C Nachweis des FL-Prestin-GFP-Fusionskonstrukts, B, D Zellkernfärbung mittels DAPI. Maßstab in A, B 50 μm , in C, D 20 μm .

In Abb. 8 sind exemplarisch mit Prestin-FL transfizierte HEK Zellen in zwei unterschiedlichen Vergrößerungen dargestellt (Abb. 8 A, C) die zur Identifizierung der Gesamtzellzahl mit einer DAPI Kernfärbung gegengefärbt wurden (Abb. 8 B, D). Das GFP-positive Fusionskonstrukt war ca. 20-25% der DAPI gefärbten Zellen nachweisbar (Abb. 8 A). Es zeigte sich jetzt, anders als im GFP Reporterkonstrukt, jetzt sowohl GFP Färbung im Zytoplasma, als auch in der Membran (Abb. 8 C, siehe geschlossener Pfeil).

Dies zeigt, dass die Transfektion des FL-Prestin in HEK-Zellen gelingt und das Konstrukt nach Translation in die Membran der Zelle transportiert wird.

3.1.3 Transfektion von FL-Prestin in Versuchsansätzen mit unterschiedlichen Zellzahlen

In einem nächsten Schritt wurde versucht, die Transfektionseffizienz über eine Konzentrationsreihe des Fusionsproduktes zu optimieren. Dazu wurde das FL-Prestin-GFP-Fusionskonstrukt in verschiedenen Versuchsansätzen mit unterschiedlicher Zelldichte von 0,5, 1,0 und 2,0 x 10⁵ Zellen transfiziert.

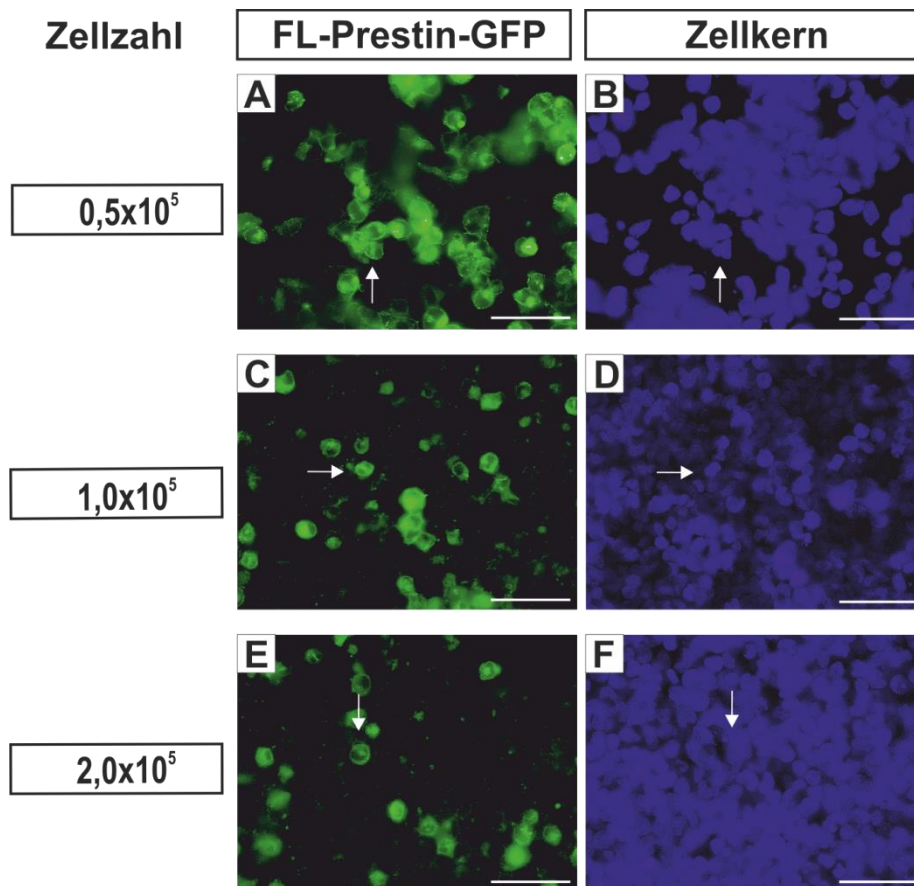


Abb. 9: Fluoreszenzbilder von HEK-Zellen, transfiziert mit dem FL-Prestin-GFP-Fusionskonstrukt. A, C, E Nachweis des FL-Prestin-GFP-Fusionskonstruktes. B, D, F Zellkernfärbung mittels DAPI. Maßstab in A-F, 50 μm .

In der Abbildung 9 ist exemplarisch dargestellt, dass bei transfizierten Versuchsansätzen mit $0,5-1,0 \times 10^5$ Zellen die Anzahl der mit FL-Prestin-GFP transfizierten Zellen mit $0,5 \times 10^5$ oder 1×10^5 Zellen höher war als mit 2×10^5 Zellen (Abb. 9). Aus diesem Grunde wurde in weiteren Versuchen jeweils $1,0 \times 10^5$ Zellen pro Transfektionsansatz verwendet.

3.2. Das 9b-Prestin-DsRed-Fusionskonstrukt

3.2.1. Transfektion von red fluorescent protein (DsRed)

Schließlich wurde die Transfektion der trunkierten Prestin-Isoform Prestin-9b in HEK-Zellen optimiert. Das Prestin-9b Konstrukt wurde mit DsRed kloniert, um es später von GFP Prestin-FL mit Hilfe der Fluoreszenz Mikroskopie differenzieren zu können. Auch hier wurde das DsRed-Fusionskonstrukt zuvor alleine in HEK-Zellen exprimiert, um die subzelluläre Expression zu validieren.

Die Transfektion und Präparation erfolgte wie in Material und Methoden (Kapitel 2.2.3) beschrieben. Die Visualisierung der DsRed-Fluoreszenz erfolgte mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie wie beschrieben. Das DsRed-Fusionskonstrukt zeigte eine hohe Transfektionsrate in HEK-Zellen. In Abb. 10 sind exemplarisch mit DsRed-transfizierte HEK-Zellen dargestellt. Die hohe Transfektionsrate machte auch hier eine Quantifizierung überflüssig. Wie zu erwarten zeigte sich DsRed im Zytoplasma (Abb. 10 A, B; Pfeil).

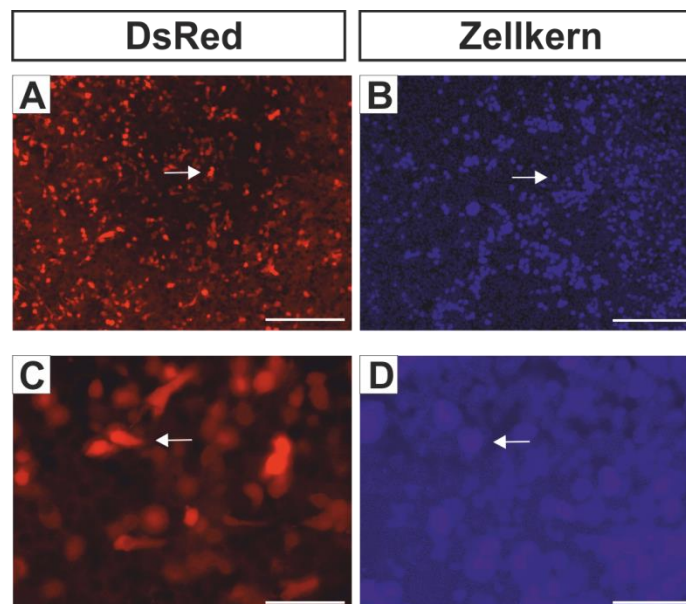


Abb. 10: A, B Fluoreszenzbilder von HEK-Zellen transfiziert mit DsRed. B, D Zellkernfärbung mittels DAPI. Die Darstellung erfolgt mit 10-facher (A, B) und 40-facher Vergrößerung (C, D). Maßstab in A, B 200 μm , in C, D 50 μm .

3.2.2. Transfektion des 9b-Prestin-DsRed-Fusionskonstruktes

In einem nächsten Versuchsansatz wurde nun die DsRed-gekoppelte Splicevariante 9b-Prestin in HEK-Zellen transfiziert und im Hinblick auf ihre subzelluläre Lokalisation überprüft. Wie in Abb. 11 dargestellt, sieht man die DsRed-Fluoreszenz des 9b-Prestin Fusionsproduktes im Zytoplasma. Es zeigte sich eine kaum nachweisbare sehr geringe Membranständige Fluoreszenz (Abb. 11 A, C; Pfeil).

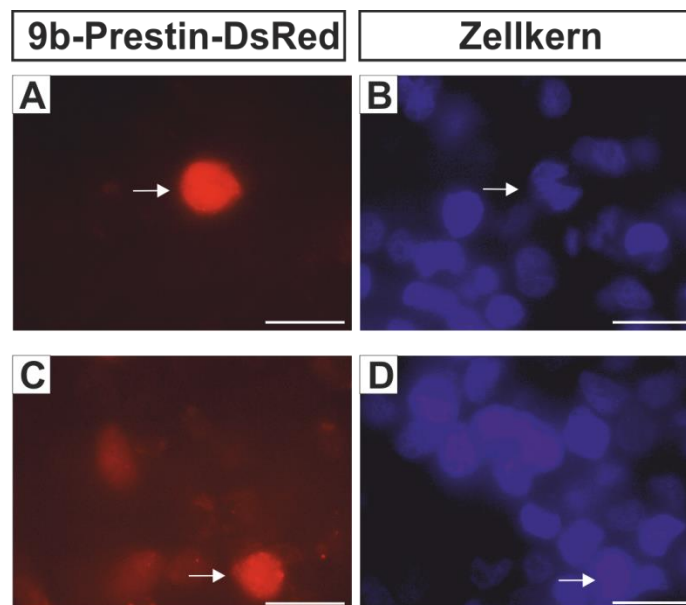


Abb. 11: Fluoreszenzbilder von HEK-Zellen transfiziert mit dem 9b-Prestin-DsRed-Fusionskonstrukt. Die Darstellung erfolgte in 100-facher Vergrößerung (A-D). A, C Nachweis des 9b-Prestin-DsRed-Fusionskonstruktes. B, D Zellkernfärbung mittels DAPI. Maßstab in A-D 20 μ m.

3.3. Transfektion von Rab10

Wie schon für die Fusionskonstrukte FL-Prestin-GFP (Kap. 3.1) und 9b-Prestin-DsRed (Kap. 3.2) wurde in einem nächsten Schritt nun das Transfektionsverhalten des putativen Prestininteraktionspartners Rab10 untersucht. Rab10 lag als Fusionskonstrukt kloniert im pGADT7-Vektor vor. Dieser Vektor kodiert nicht die Fluoreszenzfarbstoffe GFP oder DsRed, sondern kodiert ein HA-Epitop. Deswegen kann ein Nachweis nur über eine immunhistochemische Antikörperfärbung (Material und Methoden Kapitel 2.3) erfolgen. Um ein spezifisches Anfärbungsverhalten der

immunhistochemischen Färbung, die den Eindruck der später durchgeführten Anfärbung der mit Rab10 transfizierten HEK-Zellen beeinträchtigen könnte, auszuschließen, wurden in einem ersten Schritt untransfizierte HEK-Zellen immunhistochemisch mit dem Primärantikörper anti-HA und dem Sekundärantikörper Cy3 gefärbt.

3.3.1 Spezifitätsnachweis von Antikörperfärbungen in HEK-Zellen

Die Fluoreszenzanfärbung von untransfizierten HEK-Zellen mit anti-HA und dem Sekundärantikörper Cy3 ist für zwei verschiedene Vergrößerungen als singuläres Cy3 Bild (Abb 12 A, D), als DAPI-Färbung (Abb 12 B, E) und als überlagertes Bild (Abb 12 C, F) exemplarisch dargestellt.

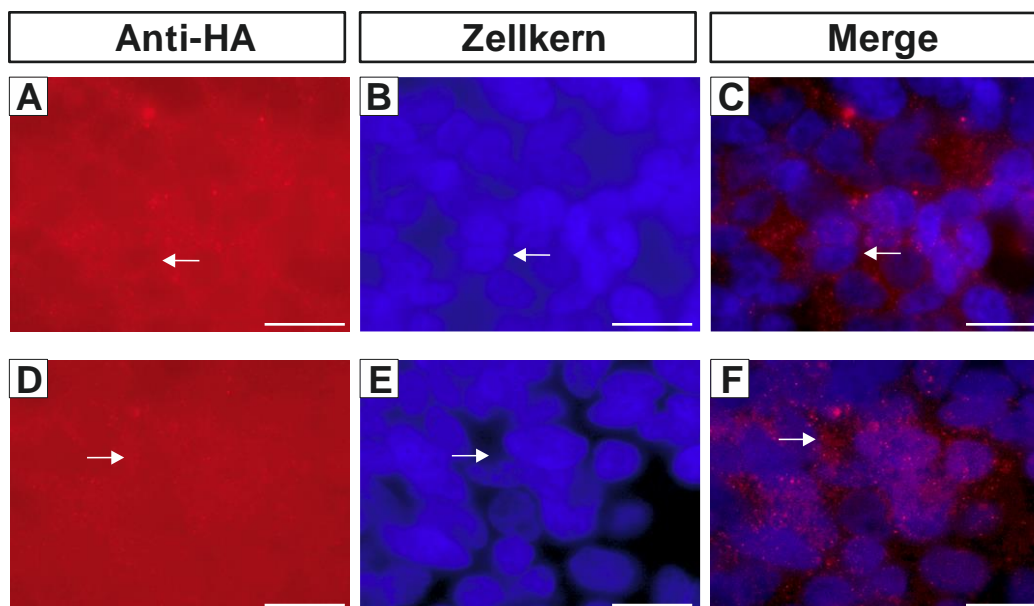


Abb. 12: Fluoreszenzbilder von nicht transfizierten HEK-Zellen (A, D) angefärbt mit anti-HA und Cy3. B, E Zellkernfärbung mittels DAPI. C stellt die Überlagerung A und B, F die von D und E dar. Die Darstellung erfolgte mit 100-facher Vergrößerung (A-F). Maßstab A-F 20 μm .

Im Fluoreszenzbild in Abb. 12 ist nur ein unspezifischer schwacher Hintergrund für die anti-HA-Färbung zu erkennen. In der Überlagerung heben sich nur einzelne Präzipitate gegen das Helligkeitsniveau der DAPI-Gegenfärbung ab. Das bedeutet,

dass sowohl der anti-HA Antikörper als auch der Cy3-gekoppelte Zweitantikörper untransfizierte HEK-Zellen nicht spezifisch anfärben.

Es wurde geprüft, ob der pGADT7-Vektor ohne inserierten Rab10 transfizierten HEK-Zellen nach immunhistochemischer Färbung mit anti-HA und Cy3 eine Fluoreszenzfärbung zeigt. Die Transfektion von pGADT7 in HEK-Zellen ist in Abb. 13 exemplarisch dargestellt.

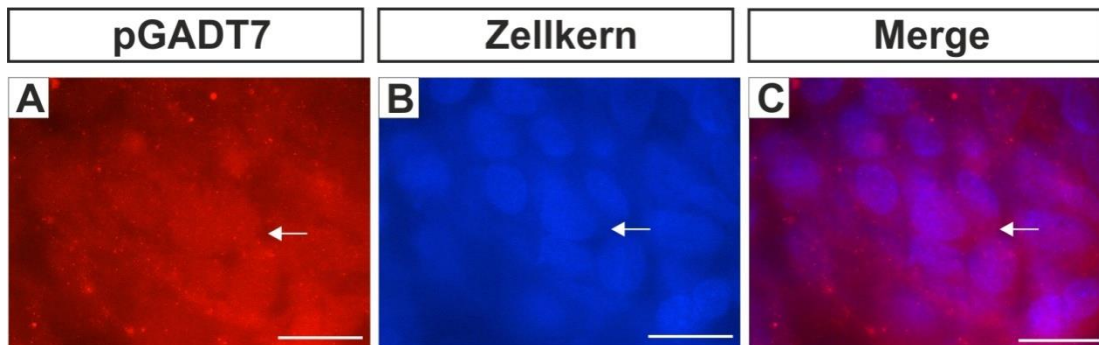


Abb. 13: Fluoreszenzbilder von HEK-Zellen transfiziert mit pGADT7. Die Fluoreszenzanfärbung erfolgte mit A anti-HA und Cy3-Antikörpern. B Zellkernfärbung mittels DAPI. C zeigt die Überlagerung von A und B. Die Darstellung erfolgt mit 100-facher Vergrößerung (A-C). Maßstab in A - C 20 µm.

Es zeigte sich, dass die Transfektion mit dem pGADT7-Vektor alleine zu keiner spezifischen Färbung mit dem anti-HA Antikörper führt.

Es zeigte sich jedoch, dass der Anti-HA Antikörper unspezifisch mit dem FL-Prestin GFP kreuzreagiert, weshalb ein alternativer Antikörper gegen Rab10 der mit dem Sekundär-Antikörper zuerst an nicht transfizierten HEK-Zellen getestet (Abb. 14).

Dabei wurden 3 Tage in Kultur befindliche untransfizierte HEK-Zellen immunhistochemisch (wie in Material und Methoden 2.3 beschrieben) gefärbt und auf ihre Fluoreszenz hin mikroskopisch untersucht. Die immunhistochemische Färbung erfolgte mit dem Rab10-spezifischen Primärantikörper anti-Rab und dem Sekundärantikörper Alexa Green (Abb. 14). Es zeigte sich keine spezifische Färbung der HEK-Zellen

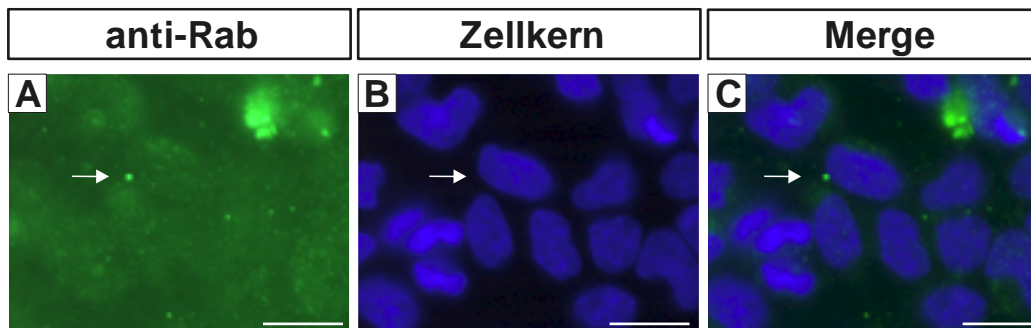


Abb. 14 : Fluoreszenzbilder von untransfizierten HEK-Zellen. Die Fluoreszenzfärbung erfolgte mit anti-Rab und Alexa Green-Antikörpern (A). B Zellkernfärbung mittels DAPI. C stellt die Überlagerung von A und B dar. Die Darstellung erfolgte in 100 – facher Vergrößerung (A-C). Maßstab A-C 20 μm .

3.3.2 Transfektion von Rab10, gefärbt mit anti-Rab Alexa Green

In Folge konnte nun geprüft werden, ob der mit Alexa Green Fluoreszenz nachweisbare anti-Rab Antikörper das Rab10 Protein nach Transfektion von HEK-Zellen mit dem Fusionskonstrukt kloniert im pGADT7-Vektor spezifisch erkennen kann. Wie in den bisherigen Ansätzen wurden für 24 h auf Deckgläsern kultivierte HEK-Zellen mit dem Rab10 Fusionskonstrukt für 6 h transfiziert und für weitere 48 h kultiviert. Danach wurden die Ansätze nach Fluoreszenzfärbung mit anti-Rab und Alexa Green Antikörpern fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

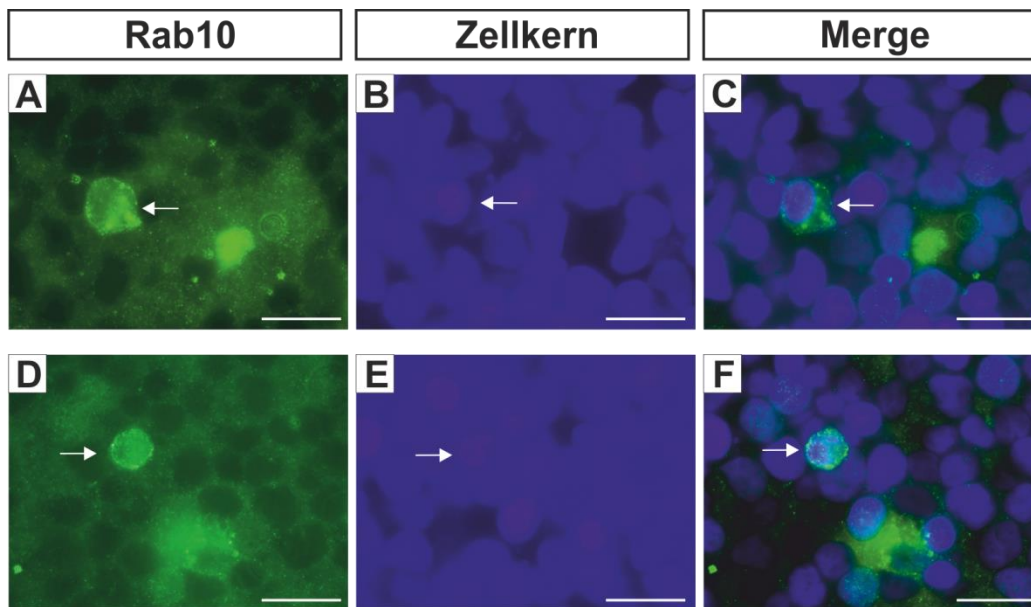


Abb. 15: Fluoreszenzbilder von HEK-Zellen transfiziert mit Rab10. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte mit anti-Rab und Alexa Green Antikörpern (A, D). Die Darstellung erfolgte mit 100-facher Vergrößerung (A-C). B, E Zellkernfärbung mittels DAPI. C, F zeigen die Überlagerung von A und B. Maßstab in A-C 20 μ m.

Rab10 war im Zytoplasma, aber auch in der Membran der Zelle nachweisbar, wie in Abb. 15 A, D (Pfeil) dargestellt ist. In der Überlagerung zeigt sich eine partikuläre Färbung mit dem anti-HA Antikörper der eine für Rab10 erwartete (English et al. 2013) kompartimentierte Färbung in der Zellmembran und assoziierten endoplasmatischem Retikulum darstellen könnte.

3.4 Transfektion von Calmodulin1

Schließlich wurde die Spezifität eines Nachweises von Calmodulin1 (Calm1) nach Transfektion mit dem Fusionskonstrukt im pGADT7-Vektor geprüft. Hierzu wurde, wie zuvor beschrieben, die immunhistochemische Färbung mit dem spezifischen Calmodulinantikörper anti-Calm auf unspezifische Interaktionen in nicht-transfizierten HEK Zellen validiert.

3.4.1 Spezifitätsnachweis von anti-Calm Antikörpern in HEK-Zellen

Dazu wurden untransfizierte HEK-Zellen mit Antikörpern gegen Calmodulin gefärbt. Die Anfärbung in Abb. 16 zeigt einen einheitlichen Fluoreszenzhintergrund mit einer leichten Anfärbung des Zytoplasmas der HEK-Zellen. Dieses Färbeprofil lässt sich auf endogen in HEK-Zellen exprimiertes Calmodulin zurückführen.

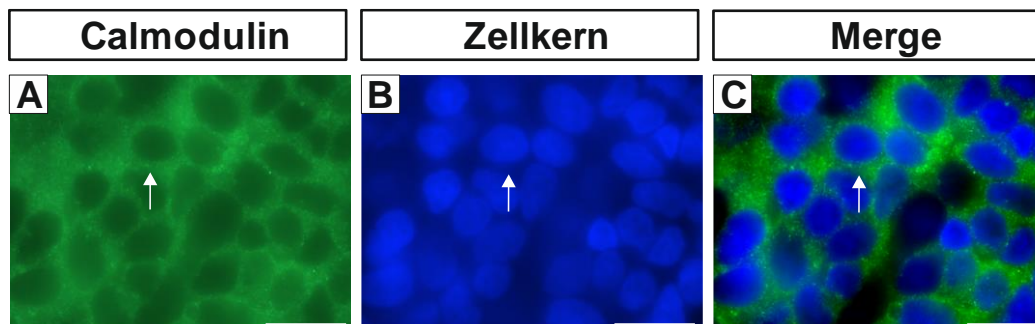


Abb. 16: Fluoreszenzbilder von untransfizierten HEK-Zellen. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte mit anti-Calm und Alexa Green Antikörpern (A). B Zellkernfärbung mittels DAPI. C zeigt die Überlagerung von A und B. Die Darstellung erfolgt mit 100-facher Vergrößerung (A-C). Maßstab A-C 20 µm.

3.4.2 Transfektion von Calmodulin anti-Calm und Alexa Green

In diesem Versuch wurde Calmodulin1 nach der Transfektion mithilfe des spezifischen Primärantikörpers anti-Calm immunhistochemisch sichtbar gemacht. Die Durchführung der Transfektion und immunhistochemischen Färbung unterschieden sich nicht von den vorangegangenen Versuchsansätzen. In Abb. 17 sind die Ergebnisse beispielhaft für zwei typische Beispiele als Anti-Calmodulin in Calmodulin-transfizierten Zellen (Abb 17 A, D), nach DAPI Färbung (Abb 17 B, E) und als überlagertes Merge Bild (Abb 17 C, F) dargestellt.

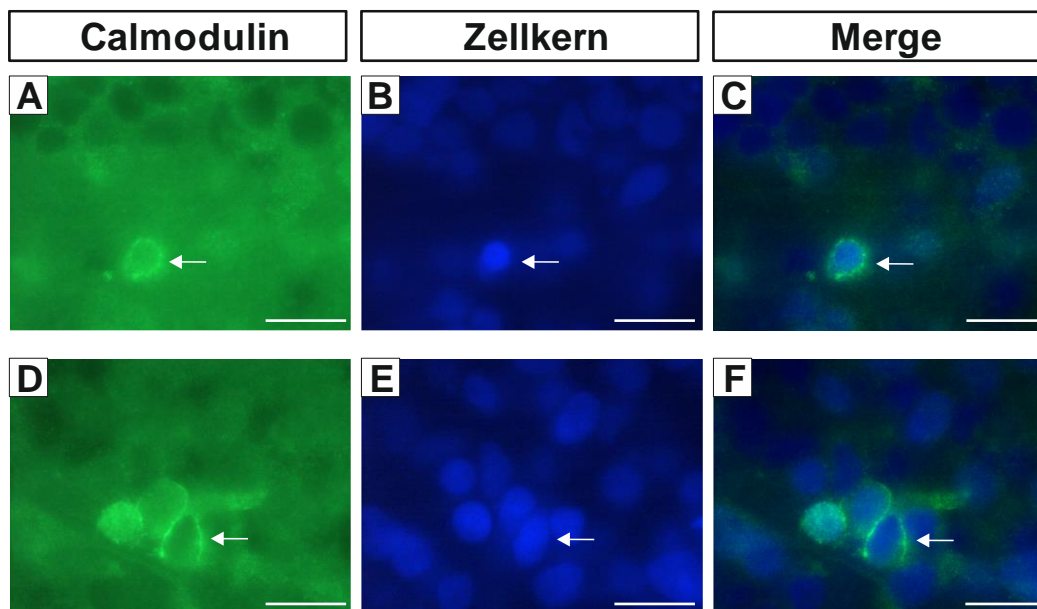


Abb. 17: Fluoreszenzbilder von HEK-Zellen transfiziert mit Calmodulin1. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte mit anti-Calm und Alexa Green Antikörpern (A, D). Die Darstellung erfolgt mit 100-facher Vergrößerung (A-F). B Zellkernfärbung mittels DAPI. C und F zeigt die Überlagerung von A und B. Maßstab A-C 20 µm.

Es zeigt sich, dass mit Calmodulin transfizierte HEK-Zellen in wenigen Zellen positiv mit dem Anti-Calmodulin, nachgewiesen über Alexa Green Fluoreszenz, reagieren (Abb. 17 C, F; Merge). Es zeigt sich eine spezifische subzelluläre Lokalisation von Calmodulin1 im Zytoplasma sowie in der Zellmembran. (Abb. 19 C, F; Merge).

Wird im vergleichbaren Experiment HEK-Zellen mit Calmodulin transfiziert und mit dem Calmodulin1-spezifischen Antikörper anti-Calm und dem rotfluoreszierenden Sekundärantikörper Cy3 angefärbt zeigt sich ebenfalls eine Calmodulin-Färbung, die jedoch schwächer und weniger kontrastreich erscheint. Dennoch lässt sich in vereinzelt Zellen eine Calmodulinfärbung im Cytoplasma und in der Membran von HEK-Zellen nachweisen (Abb 18 A und C; Pfeil)

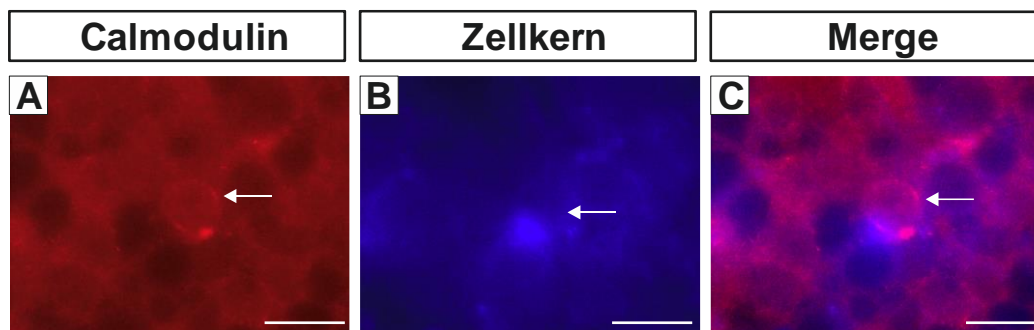


Abb. 18: Fluoreszenzbilder von HEK-Zellen transfiziert mit Calmodulin1. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte mit anti-Calm und Cy3 Antikörpern (A). Die Darstellung erfolgt mit 100- facher Vergrößerung (A-C). B Zellkernfärbung mittels DAPI. C zeigt die Überlagerung von A und B. Maßstab in A-C 20 μm .

Es zeigt sich also ein deutlicher Unterschied der Calmodulin-Färbung mit Anti-Calmodulin zwischen transfizierten und nicht transfizierten HEK-Zellen, die die Identifizierung von positiv mit Calmodulin transfizierten Zellen in den geplanten Co-Transfektionsexperimenten erlauben.

3.5. Kotransfektionen von Prestin mit Interaktionspartnern

3.5.1. Kotransfektion FL-Prestin-GFP-Fusionskonstrukt mit dem 9b-Prestin-DsRed-Fusionskonstrukt

In nächsten Ansatz konnten jetzt in Folge Co-Transfektionsexperimente gestartet werden. Dazu wurden das FL-Prestin-GFP-Fusionskonstrukt und seine DsRed-getaggte Splicevariante 9b-Prestin in HEK-Zellen transfiziert. Ein erstes Ziel war es, Abweichungen in der subzellulären Lokalisation beider Translationsprodukte im Vergleich zur singulären Expression eines Translationsproduktes zu überprüfen. Besonders interessant war, wie sich die Zellmembranfärbung bei der Kotransfektion verhält. Es galt primär zu prüfen, ob eine subzellulär auftretende Überlagerung der beiden Fluoreszenzfärbungen von FL-Prestin-GFP und 9b-Prestin-DsRed nachweisbar sein würde. Der Versuchsansatz wurde vergleichbar zu den Transfektionen mit einzelnen Konstrukten durchgeführt (Material und Methoden Kap. 2.2). Es wurden jedoch auf Grund der doppelten DNA-Menge mit zwei Plasmiden, die zweifache Menge an Lipofectamin eingesetzt (siehe Kap. 2.2).

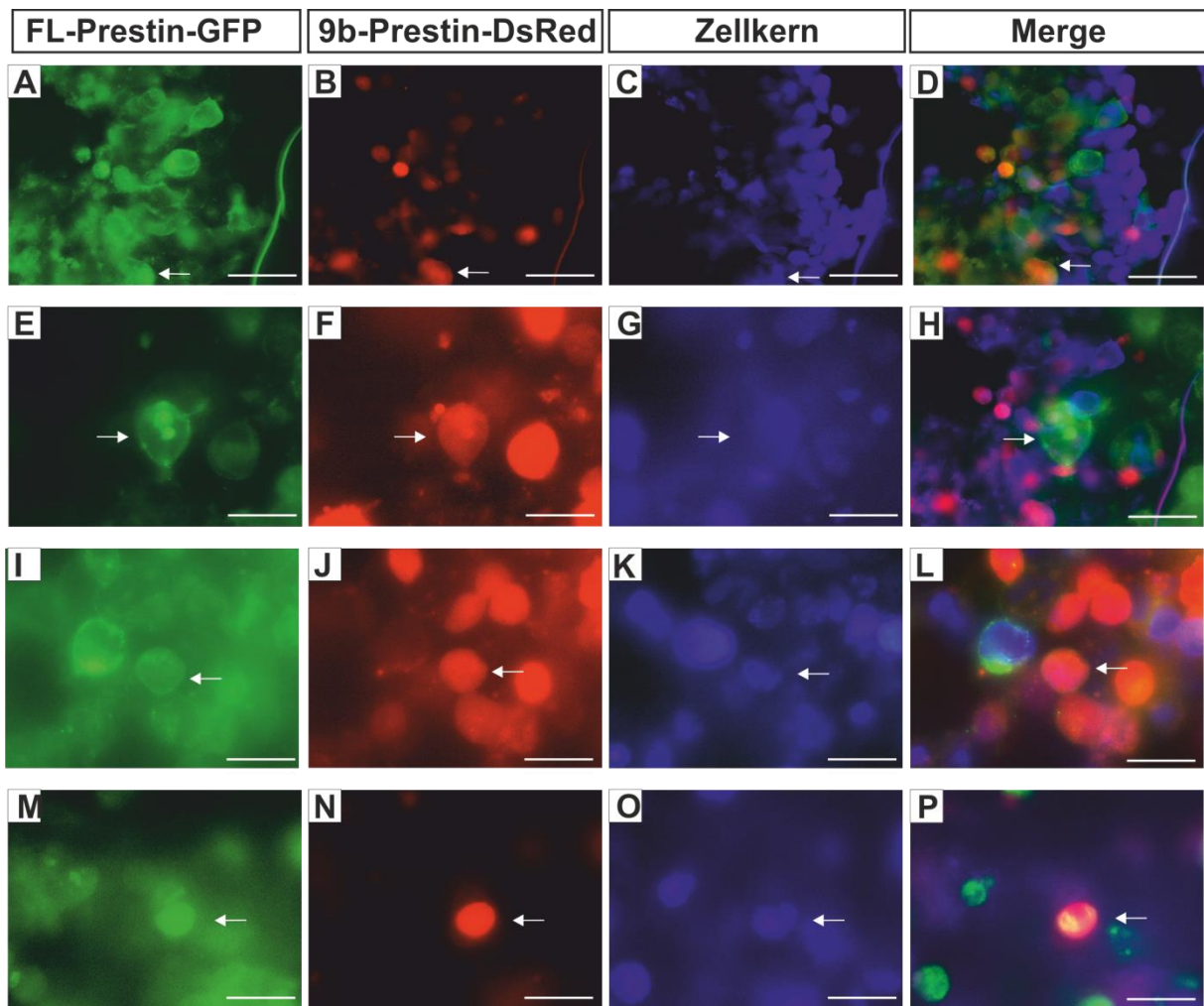


Abb. 19: Fluoreszenzbilder von HEK-Zellen cotransfiziert mit dem FL-Prestin-GFP-Fusionskonstrukt (Abb. A, E, I, M) und dem 9b-Prestin-dsRed-Fusionskonstrukt (Abb. B, F, J, N). Die Darstellung erfolgt mit 40- facher (A-D) und 100- facher Vergrößerung (E-P). C, G, K, O Zellkernfärbung mittels DAPI. D, H, L, P zeigen die Überlagerung der GFP und DsRed- Fluoreszenzaufnahmen. Maßstab A-D 50 μm , E-P 20 μm .

Abb. 19 zeigt exemplarisch für vier verschiedenen Transfektionsansätze (Abb 19 A, E, I, M) die Fluoreszenz für GFP-getaggetes FL-Prestin (Abb 19 A, E, I, M), für DsRed-getaggetes 9b-Prestin (Abb 19 B, F, J, N), für die Zellkernfärbung mit DAPI (Abb 19 C, G, K, O) und deren Ko-Lokalisation (Abb 19 D, H, L, P). Es zeigt sich überraschenderweise, dass FL-Prestin-GFP und 9b-Prestin-DsRed in unterschiedlichen Zellen exprimiert werden. Dennoch zeigt sich in einzelnen Zellen nach Kotransfektion eine Überlagerung (Merge) der Fluoreszenzen, wobei FL-

Prestin-GFP vorwiegend membranständig und die Splicevariante 9b-Prestin vorwiegend cytoplasmatisch lokalisiert bleibt (Abb 19 D, H, L, P; Pfeil).

3.5.2 Kotransfektion FL-Prestin-GFP-Fusionskonstrukt mit Calmodulin1

In einem nächsten Ansatz wurden HEK-Zellen mit GFP-getagtem Prestin-FL und Calmodulin kotransfiziert. Analog zu den vorangegangenen Cotransfektionen wurden die HEK-Zellen für 6 h transfiziert und für 48 h-60 h kultiviert. Danach erfolgte die immunohistochemische Färbung der Zellen zum Nachweis von Calmodulin mit dem spezifischen Primärantikörper anti-Calm und dem Sekundärantikörper Cy3. Die auf diese Art kotransfizierten Zellen sind exemplarisch in Abb. 20 dargestellt.

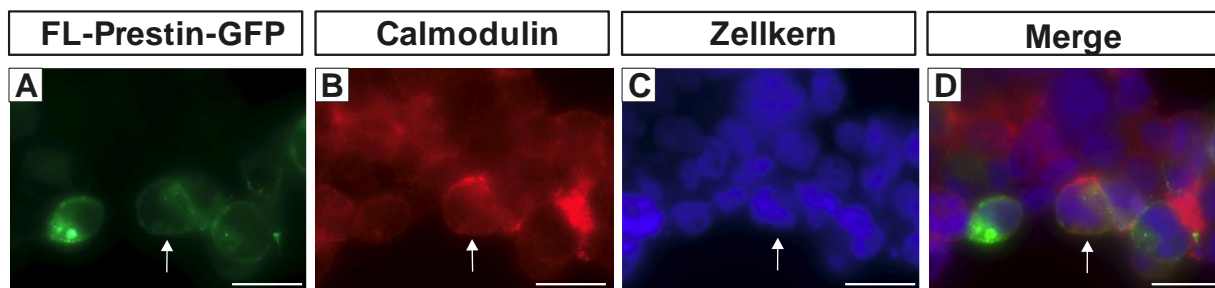


Abb. 20: Fluoreszenzbilder von HEK-Zellen cotransfiziert mit dem FL-Prestin-GFP- Fusionskonstrukt (A) und Calmodulin (B). Die Fluoreszenzfärbung von Calmodulin erfolgte mit anti-Calm Cy3 Antikörpern. C Zellkernfärbung mittels DAPI. Die Darstellung erfolgt mit 100- facher Vergrößerung (A-D). D stellt die Überlagerung von Abb. A und B dar. Maßstab in A-D 20 μm .

Im fluoreszenzmikroskopischen Bild stellt sich FL-Prestin-GFP in der Membran dar. Calmodulin stellt sich im Zytoplasma, aber auch in der Membran dar. In der Überlagerung der einzelnen Fluoreszenzaufnahmen zeigt sich in einigen Zellen eine Kolokalisation in der Membran von FL-Prestin und Calmodulin (Abb. 20 D; Pfeil).

3.6 Messungen der Zellmembranauslenkung von untransfizierten und mit FL-Prestin transfizierten HEK-Zellen mittels AFM-Mikroskopie und Patch-Clamp

Bisher wurden in dieser Arbeit mittels der Technik der Fluoreszenzmikroskopie Aussagen über die subzelluläre Lokalisation und auch räumliche Kolo­kalisierung in Solotransfektions- und Kotransfektionsexperimenten mit HEK-Zellen von FL-Prestin, seiner Splicevariante 9b-Prestin und den putativen Prestininteraktionspartnern Rab10 und Calmodulin getroffen. Mithilfe von fluoreszenzmikroskopischen Versuchen und Kotransfektionen können wahrscheinliche Interaktionspartner bestimmt werden, da eine bei Kotransfektion auftretende subzelluläre räumliche Nähe der untersuchten Proteine, die sich in den vorangegangenen Versuchen als Überlagerung von Fluoreszenzen darstellte, eine Bedingung für ihre Interaktion ist. Allerdings kann man mittels der Fluoreszenzmikroskopie die tatsächliche Interaktion der transfizierten und translatierten Proteine nicht beweisen. Hierfür ist die räumliche Auflösung des Fluoreszenzmikroskops (Lichtmikroskop) zu gering. Um den Nachweis einer funktionellen Interaktion oder Veränderung der funktionellen Eigenschaften einer Zelle nach der Transfektion eines Proteins zu testen, wurde die Kombination aus whole-cell Patch-Clamp-Technik und Rasterkraftmikroskopie (AFM) gewählt, um gleichzeitig die Zelle über eine Membranpotentialänderung mittels Patch-Clamp zu stimulieren und die Reaktion oder funktionelle Reaktion mittels des AFM zu messen.

Vorbild für den Versuchsaufbau ist die ÄHZ, welche als spezialisierte Eukaryontenzelle Prestin exprimiert (Zheng et al. 2000). Bei einem Reiz (Verschiebung der Tektorialmembran) depolarisiert die ÄHZ und es kommt zu einer Längenveränderung der ÄHZ, für die eine Konformationsänderung des Prestinproteins verantwortlich gemacht wird. Es galt also, in Folge diesen Vorgang der Längenänderung in einer eukaryonten HEK-Zelle nach Transfektion mit Prestin nachzustellen. Die Depolarisation der Zellmembran oder Änderung des Membranpotentials wurde mit der whole-cell Patch-Clamp-Technik erreicht und die funktionelle Antwort der Zelle in Form einer Zellmembranauslenkung mittels der

AFM Technik gemessen. Die Versuche wurden für untransfizierte und mit FL-Prestin transfizierte HEK-Zellen durchgeführt. Es galt hier eine putative Veränderung der Zellmembranauslenkung nach Transfektion mit FL-Prestin transfizierten HEK-Zellen zu identifizieren. Zusätzlich wurden die Versuche für verschiedene Kräfte, mit welchen der AFM-Sensor auf die zu untersuchende HEK-Zelle drückt, durchgeführt, um den Effekt der Zellmembranvorspannung auf die Zellmembranauslenkung zu untersuchen. Zur Änderung des Zellmembranpotentials wurden zwei Protokolle verwendet. In einem Protokoll wurde die Änderung des Zellmembranpotentials schrittförmig, im anderen sinusförmig vorgenommen.

3.6.1 Zellmembranauslenkung durch schrittförmige Veränderung des Membranpotentials

In einem ersten Stimulationsversuch wurde mit Hilfe der whole-cell Patch-Clamp-Technik schrittweise das Membranpotential verändert und die Auslenkung der Zellmembran, wie in Material und Methoden beschrieben, mittels AFM-Sensor gemessen. Mit Beginn der Stimulation (Abb. 21) erkennt man eine maximale Änderung der Zellmembranauslenkung um 1-2 nm bei der maximalen Depolarisation von -80 mV auf +20 mV.

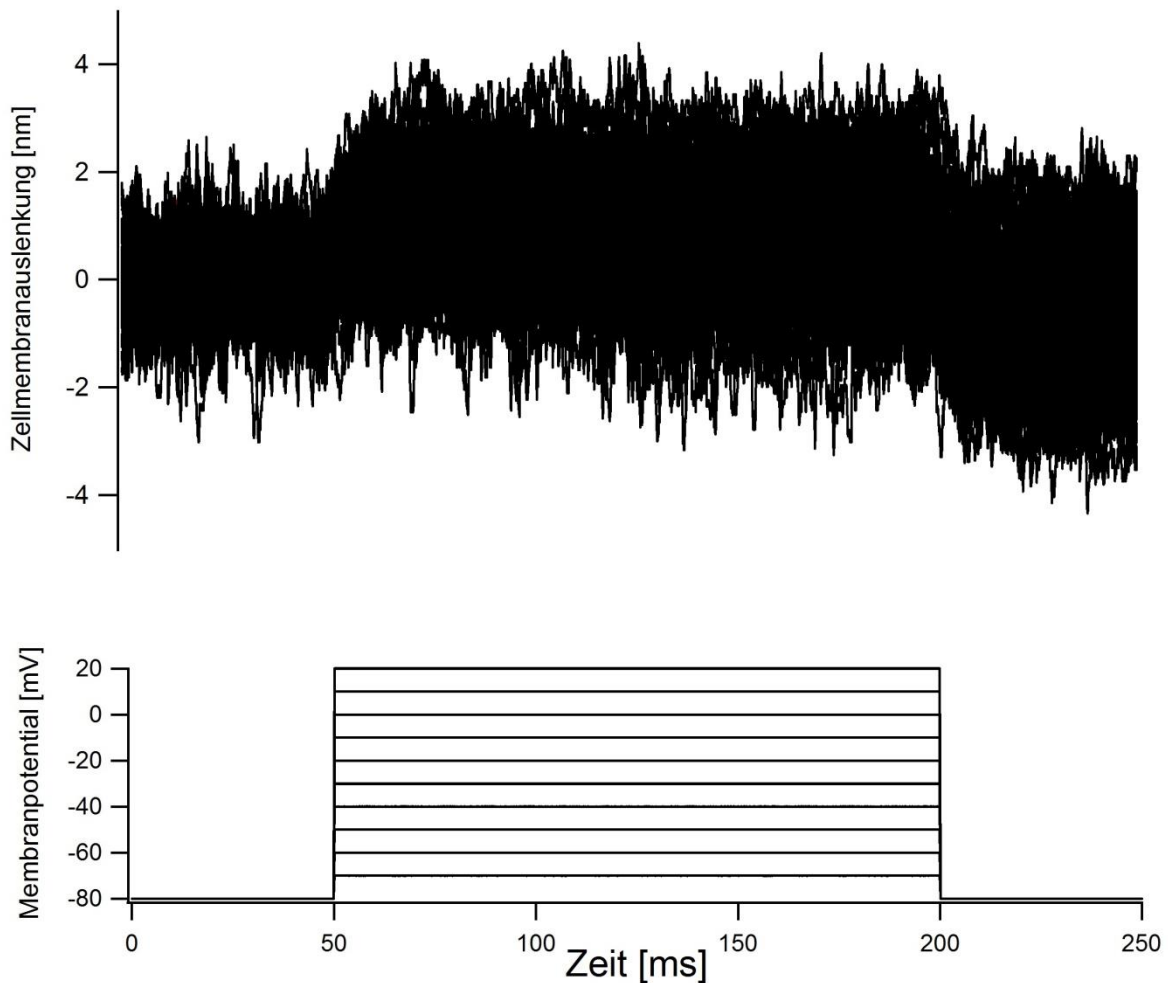


Abb. 21: Zellmembranauslenkung (oben) einer nicht-transfizierten HEK-Zelle in Abhängigkeit einer schrittförmigen Veränderung des Membranpotentials (unten).

Da die Zellmembranpotentialänderung bei schrittförmiger Stimulation sehr schnell im Bereich von unter 1 ms erfolgt, wurde als nächstes ein sinusförmiges Protokoll zur Membranpotentialänderung verwendet, in welchem die maximale Zellmembranpotentialänderung von -80 mV auf +20 mV in einem Zeitraum von 12,5 ms erfolgte. Somit kann man auch ein reaktionsträgeres System testen und gleichzeitig auftretende Interferenzen jeglicher Art messtechnisch herausfiltern.

3.6.2 Zellmembranauslenkung durch sinusförmige Membranpotentialänderung

In einem zweiten Versuchsansatz wurde eine Veränderung des Membranpotentials durch ein sinusförmiges Spannungsprotokoll geprüft. Hierbei wurde das Membranpotential von HEK-Zellen auf -80 mV geklemmt. Dann erfolgten 10 sinusförmige Membranpotentialänderungen um 10 mV von -80 mV auf -70 mV. Danach wurde das Membranpotential wieder auf -80 mV geklemmt und 10 weitere sinusförmige Membranpotentialänderungen mit einem Wert von 20 mV von -80 auf -60 mV durchgeführt. Diesem Prinzip folgend wurde das Membranpotential bis zu +20 mV verändert und hierfür die Auslenkung der Zellmembran mittels AFM-Sensor gemessen (Abb. 22)

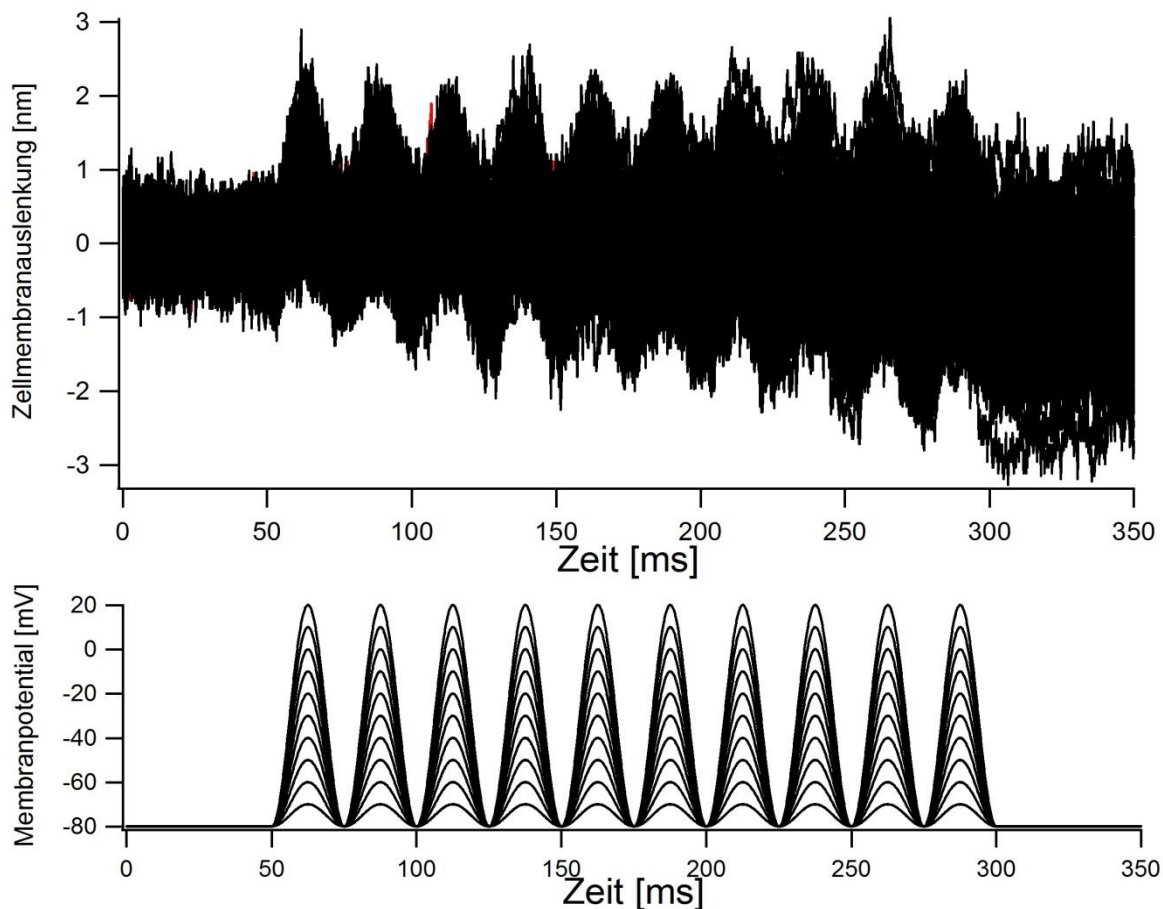


Abb. 22: Zellmembranauslenkung (oben) einer nicht-transfizierten HEK-Zelle in Anhängigkeit einer sinusförmigen Veränderung des Membranpotentials (unten).

In Abb. 22 ist exemplarisch die Zellmembranauslenkung einer untransfizierten HEK-Zelle bei sinusförmiger Veränderung des Membranpotentials dargestellt. Der Wert 0 nm entspricht der Zellmembranauslenkung bei einem Haltepotential von -80 mV, welches jeweils zu Beginn und zum Ende der Stimulation angelegt wurde. Für den Zeitpunkt der Stimulation erkennt man eine Änderung der Zellmembranauslenkung von maximal 1-2 nm bei maximaler sinusförmiger Depolarisation von -80 mV auf +20 mV. Die Auslenkung der Zellmembran erfolgte in Phase zur sinusförmigen Stimulation.

Diese Messungen wurden für alle gemessenen HEK-Zellen für fünf verschiedene Kräfte, mit denen der AFM-Sensor auf die HEK-Zelle drückt (AFM-Sensordruck), durchgeführt. Ziel war zu messen, welchen Einfluss die Vorspannung der Membran auf die Zellmembranauslenkung einer mittels Membranpotentialänderung stimulierten HEK-Zelle hat. Aus den gesammelten Daten aller mit dem sinusförmigen Stimulationsprotokoll gemessenen Zellen wurde für jede Kraft, mit der der AFM-Sensor auf die HEK-Zelle drückt (AFM-Sensordruck), der Mittelwert der Zellmembranauslenkung und die Standardabweichung berechnet. Die Ergebnisse sind in Abb. 23 grafisch dargestellt. Jede Kurve stellt die Zellmembranauslenkung für je einen AFM-Sensordruck bei unterschiedlichen Depolarisationen der Zellmembran von -80 bis +20 mV dar.

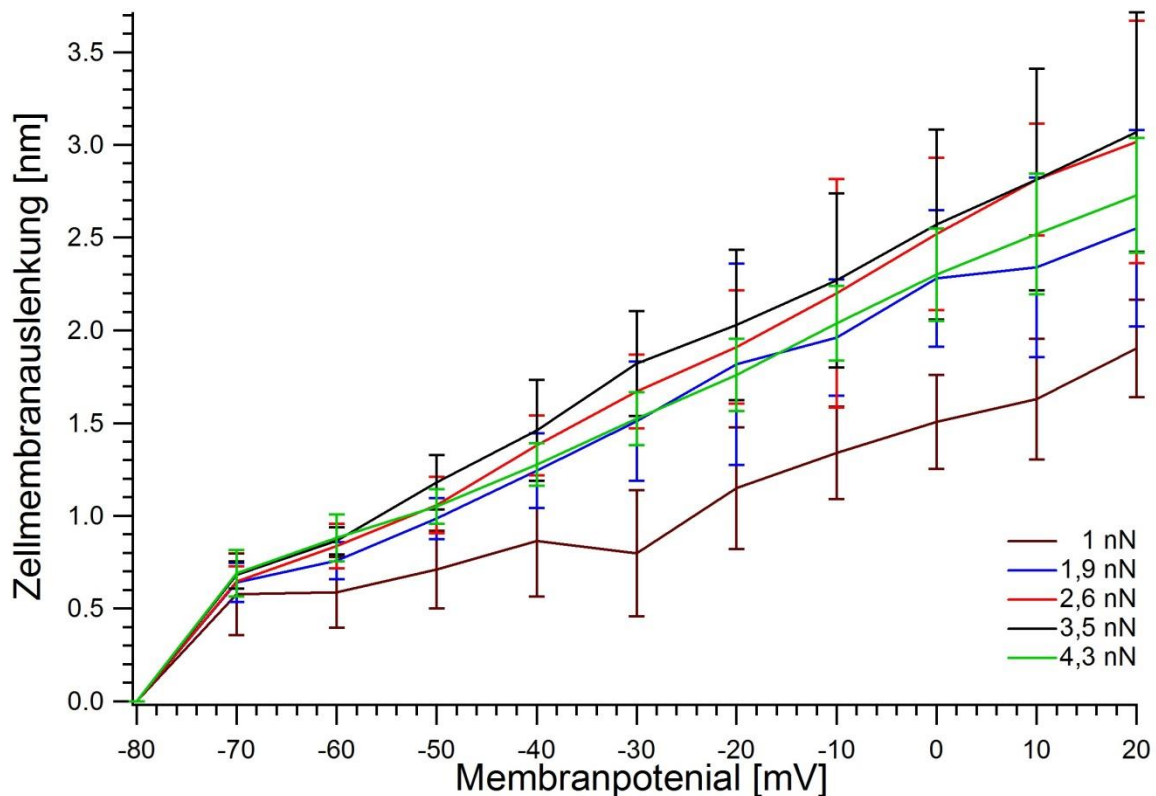


Abb. 23: Zellmembranauslenkung von untransfizierten HEK-Zellen bei sinusförmiger Veränderung des Membranpotentials von -80 bis +20 mV in Abhängigkeit von der Kraft mit der AFM-Sensor auf die Zelle drückt (Legende: 1 nN = braun; 1,9 nN = blau; 2,6 nN = rot; 3,5 nN = schwarz; 4,3 nN = grün). Die Standardabweichungen sind in gleichen Farben der zugehörigen Wertekurven dargestellt. Es zeigt sich eine mit Depolarisationszunahme steigende Zellmembranauslenkung.

In Abb. 23 erkennt man, dass, unabhängig vom AFM-Sensordruck auf die HEK-Zelle, die Zellmembranauslenkung immer größer wird, je mehr die HEK-Zelle depolarisiert wird. Bei niedrigen AFM-Sensordrücken im Bereich von 1 nN, liegt die Zellmembranauslenkung unter 2 nm. Bei höheren Kräften zwischen 1,9 bis 4,3 nN kommt es zu höheren Auslenkungen. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung sind bei höheren Kräften die maximalen Auslenkungen bei maximaler Depolarisation der Zellmembran von -80 auf +20 mV nahezu gleich. Diese liegt im Mittelwert bei 2,5 bis 3 nm bei untransfizierten HEK-Zellen.

Nachdem in Kapitel 3.6.1 und 3.6.2 Versuche zur Membranauslenkung an untransfizierten HEK-Zellen bei Membranpotentialänderung mittels whole-cell

Patch-Clamp-Technik versucht wurden, werden in den folgenden Kapiteln Versuche von mit FL-Prestin transfizierten HEK-Zellen beschrieben.

3.6.3 Experimente mit untransfizierten und mit FL-Prestin transfizierten HEK-Zellen

In diesem Experiment wurden HEK-Zellen, wie in Material und Methoden beschrieben, mit FL-Prestin-GFP transfiziert, unter dem Fluoreszenzmikroskop identifiziert und wie bei den untransfizierten HEK-Zellen mit Hilfe der whole-cell Patch-Clamp Technik in Kombination mit dem AFM-Sensor gemessen.

In diesem Versuchsansatz wurde wieder ein sinusförmiges Protokoll zur Membranpotentialänderung verwendet. In diesem Protokoll erfolgte die Membranpotentialänderung von 0 mV auf einen Wert von -100 mV in 10 Schritten von je 10 mV. Im Gegensatz zu dem sinusförmigen Protokoll von Abb. 24, in welchem mit einer Frequenz von 40 Hz (10 sinusförmige Membranpotentialänderungen in 250 ms) stimuliert wurde, wird in diesem Protokoll sinusförmig mit einer Frequenz von 160 Hz (72 sinusförmige Membranpotentialänderungen in 450 ms) stimuliert. Die maximale Membranpotentialänderung beträgt 100 mV bei einer Membranpotentialänderung von 0 mV auf -100 mV.

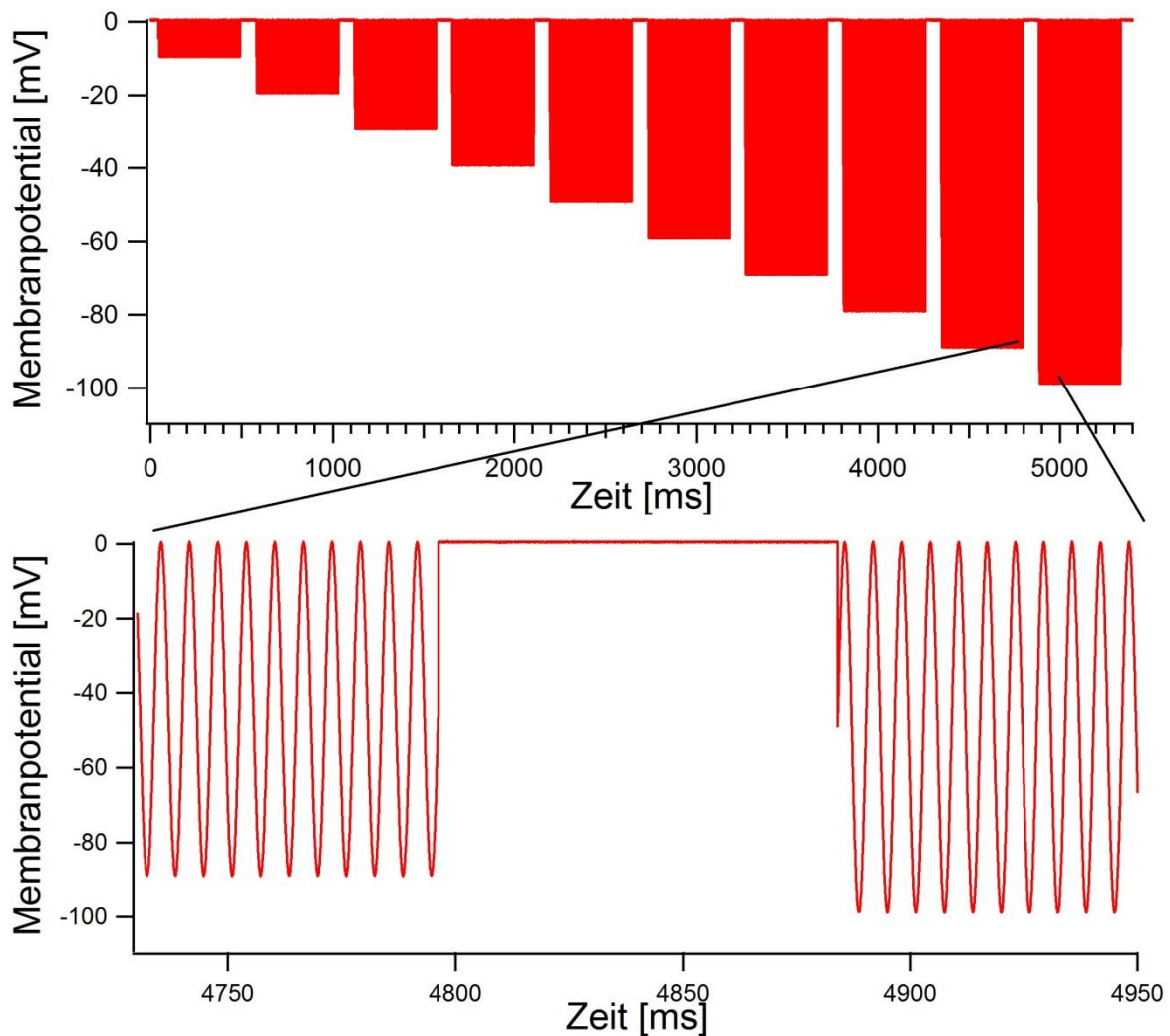


Abb. 24: Protokoll zur sinusförmigen Membranpotentialänderung untransfizierter und mit FL-Prestin transfizierter HEK-Zellen. Gesamtes Protokoll (oben), Ausschnitt (unten).

Mit den in Abb. 24 gezeigten Protokollen wurden erneut die Zellmembranauslenkungen von untransfizierten und dieses Mal auch mit FL-Prestin transfizierten HEK-Zellen mittels AFM-Sensor gemessen. Exemplarisch sind die Zellmembranauslenkungen einer untransfizierten und einer mit FL-Prestin transfizierten HEK-Zelle in Abb. 25 dargestellt.

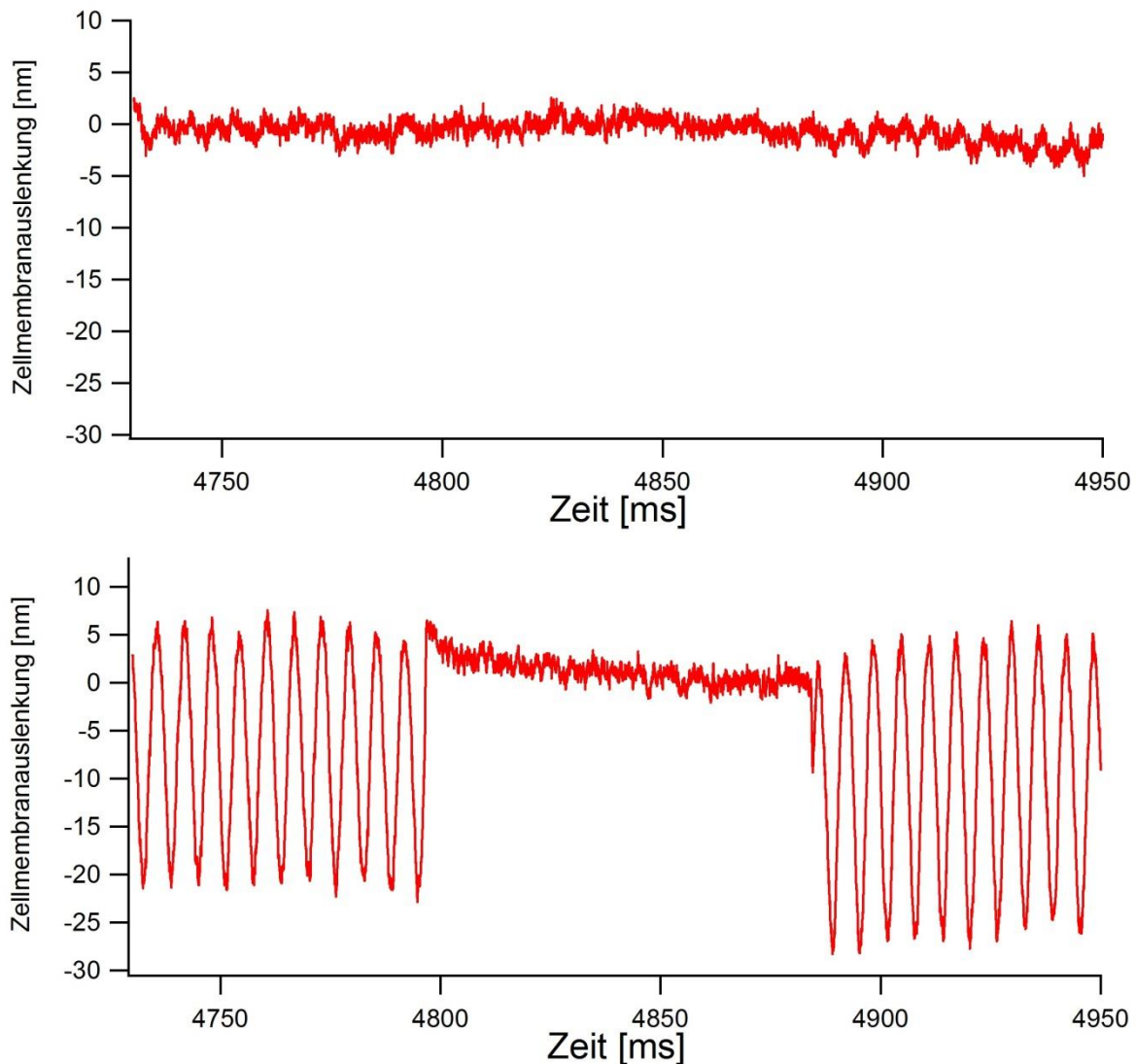


Abb. 25: Zellmembranauslenkung bei untransfizierter HEK-Zelle (oben) und mit FL-Prestin-GFP transfizierter HEK-Zelle (unten) bei sinusförmiger Membranpotentialänderung auf -90 und -100 mV

In Abb. 25 sind vergleichend die Zellmembranauslenkung einer untransfizierten HEK-Zelle (Abb. 25 oben) und einer mit FL-Prestin-GFP-transfizierten HEK-Zelle (Abb. 25 unten) dargestellt. Die Zellmembranauslenkung von untransfizierter und transfizierter Zelle erfolgte stimulationssynchron. Die maximale Auslenkung der untransfizierten HEK-Zelle beträgt ungefähr 3-4 nm bei einer maximalen Membranpotentialänderung von 100 mV von 0 mV auf -100 mV. Die maximale Zellmembranauslenkung der mit FL-Prestin transfizierten HEK-Zelle beträgt

ungefähr 30 nm bei der maximalen Membranpotentialänderung von 100 mV. Der Druck des AFM-Sensor auf die HEK-Zelle betrug in beiden Fällen 1,6 nN. Orientierend ist somit die Zellmembranauslenkung von mit FL-Prestin transfizierten HEK-Zellen um den Faktor 10 größer als bei untransfizierten HEK-Zellen.

Um den Eindruck dieser einzelnen Messung zu bestätigen, wurde der Versuch wiederholte Male für verschiedene Kraftwerte, mit denen der AFM-Sensor auf die Zelle drückt, durchgeführt. Die Mittelwerte der Zellmembranauslenkung der gemessenen HEK-Zellen sind in Abhängigkeit von AFM-Sensorkraftdruck und der Membranpotentialänderung in Abb. 26 dargestellt.

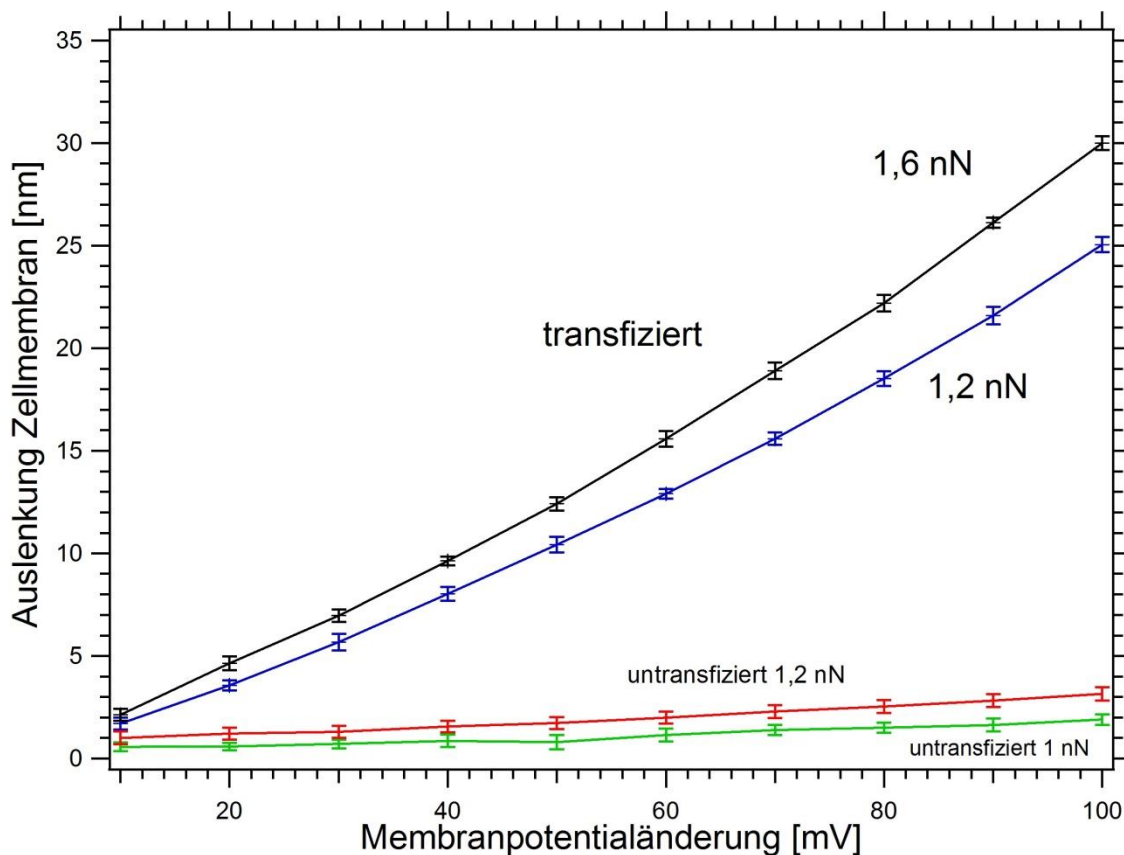


Abb. 26: Zellmembranauslenkung von untransfizierten HEK-Zellen (Kontrolle) und mit FL-Prestin-GFP transfizierten HEK-Zellen in Abhängigkeit von Membranpotentialänderung und der Kraft, mit der der AFM-Sensor auf die Zelle drückt. Man beachte die grössere Auslenkung mit FL-Prestin transfizierter Zellen in Abhängigkeit von der eingesetzten Kraft.

Die Zellmembranauslenkungen werden mit zunehmender Hyperpolarisation größer. Die maximale Zellmembranauslenkung beträgt 30 nm bei einer Membranpotentialänderung von 100 mV. Diese wurde für die höchste verwendete Sensorandruckkraft von 1,6 nN gemessen. Bei niedrigeren Kräften, mit denen der AFM-Sensor auf die Zelle drückt, ist die maximale Zellmembranauslenkung mit 25 nm (1,2 nN) geringer. Die maximale Auslenkung einer mit dem sinusförmigen Spannungsprotokoll gemessenen Zellmembranauslenkung einer untransfizierten HEK-Zelle beträgt 3 nm bei einer Kraft von 1,2 nN des AFM-Sensors, ebenfalls bei einer Membranpotentialänderung von 100 mV von 0 mV auf -100 mV. Man kann erkennen, dass mit FL-Prestin transfizierte HEK-Zellen eine um den Faktor 10 höhere Zellmembranauslenkung bei der maximalen Membranpotentialänderung von 100 mV zeigten gegenüber untransfizierten HEK-Zellen. Es ist davon auszugehen, dass in die HEK-Zellen transfiziertes FL-Prestin zu einer verstärkten funktionellen Antwort der Zellmembran in Form von Zellmembranauslenkung oder Zellmembrankrümmung bei Membranpotentialänderung führt.

Zusammenfassend konnte so in der vorliegenden Arbeit (i) eine erfolgreiche Transfektion von HEK-Zellen mit FL-Prestin und trunkiertem 9b-Prestin dokumentiert werden (ii) die erfolgreiche Transfektion von HEK-Zellen mit den putativen Prestin-Interaktionspartnern Rab10 und Calmodulin und deren spezifischer Expressionsnachweis in den Zellen etabliert werden (iii) die Co-transfektion von FL-Prestin und 9b in HEK –Zellen und deren Co-lokalisierung in einigen Zellen dokumentiert werden (iv) in einem ersten Ansatz validiert werden, dass erfolgreich mit FL-Prestin transfizierte Zellen tatsächlich in der Lage sind nach Stimulation Längenänderungen der Membran zu vollziehen die mit Hilfe der Atomic Force Mikroskopie nachgewiesen werden können. Damit war die Basis gelegt, um in zukünftigen Studien den Effekt kombinierter Transfektionsansätze von FL-Prestin und putativen Interaktionspartnern im Detail zu studieren.

4. Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde zum ersten Mal die Lokalisation bzw. Kolokalisation von FL-Prestin, seiner Splicevariante 9b-Prestin, Rab10 und Calmodulin in einem in vitro Zellsystem von eukaryotischen Zellen untersucht. Weiterhin wurde die membranpotentialinduzierte Zellmembranauslenkung in FL-Prestin-transfizierten HEK-Zellen mit Hilfe der whole-cell Patch-Clamp-Technik und der Rasterkraftmikroskopie (AFM) gemessen. Die durchgeführten Versuche zur Lokalisation ergaben eine Fluoreszenzanfärbung der Zellmembran für FL-Prestin und in geringerer Ausprägung für Calmodulin und eine zytoplasmatische Zellanfärbung für Rab10 und 9b-Prestin. Eine Kolokalisation in der Membran konnte für eine Kotransfektion von FL-Prestin und Calmodulin nachgewiesen werden. Die Kotransfektion von FL-Prestin und 9b-Prestin ergab eine Membrananfärbung für FL-Prestin und eine zytoplasmatische und Membrananfärbung für 9b-Prestin, aber nur eine geringe Kolokalisation. Weiterhin ergab sich in den kombinierten whole-cell Patch-Clamp- und Rasterkraftmikroskopieexperimenten eine um den Faktor 10 größere Zellmembranauslenkung der mit FL-Prestin transfizierten HEK-Zellen, gegenüber den untransfizierten HEK-Zellen der Kontrolle.

4.1 Expression und Lokalisation der Einzelkonstrukte

Prestin, das dicht gepackt in der lateralen Zellmembran der ÄHZ (Weber et al., 2002; Navaratnam et al., 2005) exprimiert wird, ist für den aktiven Verstärkungsmechanismus unseres Innenohres verantwortlich (Santos-Sacchi & Zhao, 2003; Jia et al., 2005; Navaranam et al. 2005; Fettiplace, 2006). Aktive Verstärkermechanismen unterstützen die Hörfähigkeit in Invertebraten und Vertebraten. Der Mechanismus, wie Prestin die Längenänderung der ÄHZ und darüber die Hörfähigkeit beeinflusst, ist jedoch noch nicht bis ins Detail verstanden (Beurg et al., 2013; Nin et al., 2012; Gorbunov et al., 2014). Prestin gehört als fünftes Mitglied zur insgesamt zehn Mitglieder umfassenden Genfamilie der SLC26-Anionentransporterfamilie (Dallos et al., 2006). Bisher ist kein weiteres Mitglied der

Genfamilie in mechanosensitiven Organen wie dem Hörorgan bei Säugern detektiert worden.

In der vorliegenden Arbeit galt es, ein Messverfahren zu entwickeln, das in einem nachfolgenden späteren Ansatz erlauben sollte, explizit den Einfluss von putativen Interaktionspartnern von Prestin auf motile Eigenschaften von Prestin zu studieren. Dies erfolgte mit einem *in vitro* Zellsystem, in welchem, die Prestin-Isoformen und deren putative Interaktionspartner als Fusionsproteine in Zellen in Kultur transfiziert und translatiert wurden. Da ÄHZ *ex vivo* nicht kultivierbar sind, wurden für die Transfektionsexperimente, welche Inkubationszeiträume von bis zu 48 h benötigten, humane embryonale Nierenzellen (human embryonic kidney cells; HEK-Zellen) verwendet (Albert et al., 2007).

Es zeigte sich einzig für GFP-Full-Length-Prestin (FL-Prestin)-Konstrukte, welche in den pEGFP-N1-Vektor kloniert wurden, in HEK-Zellen eine ausgeprägte Fluoreszenzanfärbung in der Zellmembran. Schon in früheren Studien wurden Fluoreszenzanfärbungen der Zellmembran von Zellen in Kultur nach Transfektion von GFP-FL-Prestin-Fusionskonstrukt beschrieben (Albert et al., 2007). Die Fluoreszenzanfärbung ist erwartungsgemäß nicht wie bei der ÄHZ in der lateralen Zellwand verdichtet exprimiert (Belyantseva et al., 2000), sondern gleichmäßig in der Zellmembran verteilt. Was bis heute unklar bleibt, ist die Frage, ob natives FL-Prestin und das GFP-FL-Prestin-Fusionskonstrukt exakt gleiche Konformationsänderungen in der Membran von HEK-Zellen eingehen oder ob die Fusion mit GFP die motilen Eigenschaften des transfizierten Proteins beeinflusst. Unabhängig davon ist das hier etablierte HEK-Zell-Transfektionssystem für zukünftige weitergehende Untersuchungen zum Mechanismus der durch Prestin induzierten Längenänderungen interessant. So könnte man mit diesem *in vitro* z.B. nach homologen Proteinen und weiteren Subtypen oder Isoformen von Prestin suchen, die möglicherweise für die Hörfunktion in anderen Spezies oder auch für Entstehung von Taubheit und Schwerhörigkeit verantwortlich sein könnten. So fand man z.B. heraus, dass Mutationen in einer Upstream-Region des Gens, welche für ein reguläres Splicen der Prestin mRNA in vier verschiedene Transkripte

(SLC26A5a, b, c, d) verantwortlich sind, Schwerhörigkeit bei Menschen verursachen könnte (Liu et al., 2003). Die Mutation ist in einer sehr konservierten Nukleotidregion 'upstream' des Exons 3 detektiert, in einer sogenannten 'Splice Acceptor Site' des Gens, die für die Regulation von definierten Splicevarianten des Proteins verantwortlich gemacht wird (Liu et al., 2003). Putative Funktionen der Isoformen könnten sich bei einem Funktionsausfall von Prestin bemerkbar machen. Ausbleibende Spannungsänderungen der ÄHZ würden typischerweise zu einem moderaten Hörverlust, einer Herabsetzung der Frequenzselektivität (Ryan & Dallos, 1975; Dallos & Harris, 1978) und einem Hörschwellenverlust von 45-60 dB (Liberman et al., 2002) führen. Die Mutation der 'Splice Acceptor Site' in 2 Patienten mit homozygoter Ausprägung dieser Mutation führte aber überraschenderweise zu einem größeren Verlust, als bei einem Verlust des cochleären Verstärkers zu erwarten wäre, nämlich zu einer fast kompletten Taubheit und Verlust von inneren und äußeren Haarzellen (Liberman et al., 2002). Dies unterstreicht bisher unbekannt Funktionen von Prestinisoformen für das Hören.

In Vorarbeiten zur vorliegenden Studie wurde von Cimerman et al. 2013 ein Analog der humanen Splicevarianten SLC26A5d in der Ratte identifiziert. In der vorliegenden Studie wurde diese Splicevariante 9b-Prestin als DsRed Fusionsprotein in HEK-Zellen transfiziert. Mit 9b-Prestin transfizierte Zellen zeigten eine dominante zytoplasmatische Fluoreszenzanfärbung. Ein Membraneinbau von 9b-Prestin war wohl erhofft, jedoch aufgrund der stark veränderten Topologie des Proteins nicht zwangsläufig, da manche Prestinchimären in in vitro Zellsystemen oft nur ins Endoplasmatische Retikulum transportiert werden (Dallos & Zheng, 2006). Um weitere putative Interaktionspartner von Prestin zu identifizieren, wurde geprüft, ob putative Kandidaten Interaktionspartner von Prestin, wie das mithilfe der Massenspektroskopie identifizierte Protein Rab10 oder das Protein Calmodulin1, in HEK-Zellen transfiziert werden können. Die beiden Proteine wurden daraufhin im HEK-Zell-Transfektions-System auf ihre Transfektionseigenschaften hin untersucht.

Rab10 zeigte in der Einzeltransfektion eine zytoplasmatische Fluoreszenz, aber keine Fluoreszenz in der Membran. Rab10 gehört zur RAS-Gruppe der GTPasen, welche in verschiedenen exozytischen und endozytischen Räumen der Zelle aufzufinden sind und den intrazellulären Vesikeltransport steuern (Bao & Zhu, 1998). Rab10 ist ein weniger als andere Rab-Proteine evolutionär konserviertes RAB-Protein (Leaf & Blum, 1998). Es ist besonders in der frühen Zellteilungsphase in Golgiapparat lokalisiert (Schuck et al., 2007) und übernimmt eine Rolle in der Regulierung und dem Transport von Vesikeln vom Golgiapparat zur basolateralen Zellmembran, z.B. von Zellmembranbausteinen (Cao et al., 2008; Babbey et al., 2010; Wang et al., 2010). Weiterhin ist Rab10 mit dem endozytotischen Wiederaufbereiten von Vesikeln assoziiert (Babbey et al., 2010). Es wird vermutet, dass Rab10 auch über die Beeinflussung verschiedener Myosinisoformen, den zytoplasmatischen Vesikelversand (trafficking) beeinflusst (Vieira, 2018; Lim et al., 2011).

Rab10 konnte in der vorliegenden Studie erfolgreich als Fusionskonstrukt kloniert im pGADT7-Vektor in HEK-Zellen transfiziert, translatiert und mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen werden. Eine nachfolgende Prüfung des Einflusses von Rab10 Cotranfektion auf motile Eigenschaften des FL-Prestin sind jedoch in Zukunft eher nicht angebracht, da eine spezifische Interaktion von Prestin in ÄHZ mit Rab10 in späteren Studien nicht bestätigt werden konnte (Luo et al., 2018).

Der zweite untersuchte putative Prestininteraktionspartner war Calmodulin1, der als Regulator von Prestinfunktionen postuliert wurde (Keller et al., 2014). Calmodulin1 ist eine Urform/Archetyp der Gruppe der Calcium-bindenden Proteine, die unter der Gruppenbezeichnung Calmodulin subsumiert werden. Die Calcium-bindenden Proteine (Calmodulin) kommen im Zytosol und in der Zellmembran vor und regulieren Vorgänge des Zellzyklus, des Wachstums und der Herstellung sowie des Versands von Neurotransmittern. Für das Protein Calmodulin1 kodiert das Gen CALM1 auf Chromosom 14. Es existieren zwei Pseudogene auf Chromosom 7 und X (Scambler et al., 1987; McPherson et al., 1991). CALM1 ist eines von drei Genen,

die für das identische Calcium-bindende Protein und die delta-Untereinheit der Phosphorylase-Kinase, kodieren (Koller et al., 1990; Peques & Friedberg, 1990). Die Funktion der Phosphorylase-Kinase ist die Aktivierung der Glykogenphosphatase, ein Enzym des eukaryonten Glykogenstoffwechsels. CALM1 ist in praktisch allen humanen Geweben in unterschiedlichen Konzentrationen exprimiert (Rhyner et al., 1994), so auch in den ÄHZ, in welchen die Blockade von Calmodulin zur Abnahme der endozytären Aktivität führt (Kaneko et al., 2006). Nach starker Lärmeinwirkung kommt es zu einer vermehrten Expression von Calmodulin in ÄHZ (Zuo et al., 2008). Weiterhin können erhöhte Calciumkonzentrationen in ÄHZ über Calmodulin zu einer erhöhten oder veränderten Elektromotilität führen (Keller et al., 2014).

In der vorliegenden Studie konnte dokumentiert werden dass eine erfolgreiche Transfektion von HEK-Zellen möglich ist. Bei mit CALM1 transfizierten HEK-Zellen kam es zu einer erfolgreichen spezifischen Anfärbung der Zellmembran, wie auch des Zytoplasmas. Dies lässt auf einen vermehrten Einbau von Calmodulin in die Zellmembran der HEK-Zelle nach Transfektion von Calmodulin schließen. Damit konnte auch hier ein in Zellsystem vorbereitet werden, das in späteren Experimenten eine Kotransfektion mit FL-Prestin erlauben könnte, um dessen Einfluss auf motile Eigenschaften von Prestin im Detail zu analysieren.

4.2 Expression und Lokalisation der Konstrukte bei Kotransfektion

In einem nächsten Schritt wurden schließlich eine erfolgreiche Kotransfektion von FL-Prestin, 9b-Prestin, FL-Prestin und Calmodulin1 dokumentiert. Die Kotransfektion von FL-Prestin und Rab10 wurde nicht durchgeführt, da sich für die zuerst versuchte Färbung von Rab10 mittels eines HA-Primärantikörpers eine gleichzeitige Anfärbung von FL-Prestin durch anti-HA ergab. Die Fluoreszenzanfärbung mit anti-Rab wurde etabliert und wird für die Kotransfektion mit FL-Prestin in einer folgenden Arbeit verwendet.

Für die Kotransfektion von FL-Prestin und 9b-Prestin zeigte nur eine geringe überlagernde Fluoreszenz der Zellmembran der HEK-Zellen. Die Anzahl der

kotransfizierten Zellen war gering, im Gegensatz zu den Zellen, die mit einem der beiden Einzelkonstrukte transfiziert waren, obwohl versucht wurde, dem durch eine höhere DNA-Menge an 9b-Prestin im Vergleich zu FL-Prestin entgegenzuwirken. Gründe hierfür können eine unterschiedliche Promoteraktivität der verwendeten Vektoren sein, die zu einer unterschiedlich starken Expression eines Proteins führt. Auch besteht die Möglichkeit, dass 9b-Prestin aufgrund seiner von FL-Prestin unterschiedlichen Struktur nicht in der Membran exprimiert wird, wie das für manche Prestinchimäre der Fall ist. Dallos & Zheng, 2006 beschrieben, dass FL-Prestin mit verkürztem C-terminalem Ende nur in das endoplasmatische Retikulum transportiert werden kann. Weiterhin ist es möglich, dass das in den Transfektionsvektor hinzugefügte Fluoreszenzgen für GFP im FL-Prestin durch putative Konformationsveränderungen eine Interaktion mit 9b-Prestin verhindert, oder diese umgekehrt durch DsRed im 9b-Prestin verhindert wird. Dies kann in Zukunft mit einer erneuten Kotransfektion von FL-Prestin mit nativem 9b-Prestin und Anfärbung mittels spezifischer Fluoreszenzantikörper ausgeschlossen werden. Ebenso sind spätere Experimente über eine mögliche funktionelle Veränderung der Eigenschaften mit FL-Prestin und 9b-Prestin transfizierter Zellen interessant.

Für die Kotransfektion von FL-Prestin und Calmodulin1 zeigte sich eine kolokalisierte Fluoreszenzanfärbung in der Zellmembran. Die Fluoreszenzanfärbung untransfizierter HEK-Zellen mit dem calmodulinspezifischen Antikörper anti-Calm zeigte keine Membranfärbung. Die mit Calmodulin1 transfizierten HEK-Zellen zeigten nach Kotransfektion mit FL-Prestin, jedoch eine wenigstens partiell überlappende Membranfärbung, womit sich die in nachgewiesene Bindung zwischen Prestin und Calmodulin (Keller et al., 2014) zum ersten Mal auch auf zellulärer Ebene zeigt. In zukünftigen Versuchen könnte nun über das etablierte in vitro Transfektionssystem gezeigt werden, ob die Kolokalisation auch mit einer funktionellen Änderung der FL-Prestin vermittelten motilen Zelleigenschaften einhergeht. Dabei ließe sich auch in vitro prüfen, ob die Proteine trotz der

Kolokalisation immer noch zu weit voneinander entfernt sind, um miteinander zu interagieren.

4.3 Funktionelle Eigenschaften von untransfizierten und mit FL-Prestin transfizierten HEK-Zellen

In einem nächsten Schritt wurde in der vorliegenden Studie die Kombination aus whole-cell Patch-Clamp-Technik und dem AFM angewendet, um eine untransfizierte oder mit FL-Prestin transfizierte HEK-Zelle mittels einer Änderung des Membranpotentials zu stimulieren und die funktionelle Reaktion der HEK-Zelle in Form einer Zellmembranauslenkung mittels des AFM zu messen. Die AFM-Technik wurde verwendet, um die Elastizitätseigenschaften der Stereozilien in Kombination mit der Patch-Clamp-Technik und die Zellmembranbewegung bei Zellmembrandepolarisation zu messen (Zhang et al., 2001). Das AFM kann auch für ganz andere Protein-Interaktionsmessungen verwendet werden, wie zum Beispiel für funktionelle Untersuchungen von Myosin V (Kodera et al., 2010) und Actinfilamenten in Malaria infizierten Protozoen (Schmitz et al., 2010). Die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen ergaben eine maximale Zellmembranauslenkung von 3 nm für untransfizierte HEK-Zellen. Die maximale Zellmembranauslenkung bei einer Membranpotentialänderung von 100 mV betrug für HEK-Zellen, die mit FL-Prestin transfiziert wurden, 30 nm. Dieser Wert ist um den Faktor 10 größer, verglichen mit den untransfizierten HEK-Zellen. Allerdings ist die maximale Zellmembranauslenkung von mit FL-Prestin transfizierten HEK-Zellen mit 30 nm bei 100 mV Zellmembranpotentialänderung im Vergleich zu den äußeren Haarsinneszellen mit einer Zellmembranauslenkung von 20-30 nm/mV klein (Dallos & Fakler 2002). ÄHZ zeigen bei einer Membranpotentialänderung von 30 mV in vivo eine Zellmembranauslenkung von 600-900 nm. Das Zustandekommen dieser Differenz kann damit begründet werden, dass Prestin in den ÄHZ nur in der lateralen Zellmembran exprimiert ist. Die HEK-Zellen sind im Gegensatz zu den ÄHZ wesentlich geringer polarisiert und teilen sich auch noch. Außerdem zeigen sie bei FL-Prestin-GFP-Transfektion eine Fluoreszenzanfärbung der kompletten

Zellmembran (siehe Kap. 3.1.2 und 3.5). Dies ist darauf zurückzuführen, dass HEK-Zellen nicht wie ÄHZ polarisierte Zellen sind, deren laterale Membranen mit Deiter`s Zellen verankert sind und daher eine gewisse Steifheit aufweisen (Cimerman et al., 2013). Die geringere Zellmembranauslenkung der transfizierten HEK-Zellen ist allein über diese fehlende Steifheit der HEK-Zellen erklärbar. Außerdem ist die Form der ÄHZ, die länglich imponieren, grundlegend anders als die der HEK-Zellen, die flach und wenig strukturiert auf den Objektträgern wachsen. Bei ÄHZ ist die absolute Zellmembranauslenkung durch Platzieren des Sensors am apikalen oder basalen schmalen Ende mit weniger Streuung der Messwerte zu messen als bei HEK-Zellen, die wesentlich flacher wachsen. Unter dem Lichtmikroskop lässt sich aufgrund der vielfältigen Form nicht vorhersagen, wo sich die Stelle der größten Auslenkung befindet. Eine weitere Möglichkeit für die geringere Zellmembranauslenkung kann ein Unterschied in der Funktionsfähigkeit von nativem Prestin aus in vivo ÄHZ und dem hier verwendeten Prestin im FL-Prestin-GFP-Fusionskonstrukt sein. Weiterhin verfügt eine ÄHZ noch über weitere Eigenschaften wie putative Interaktionspartner oder ein spezielles Zytoskelett, welche die Auslenkungsunterschiede zur HEK-Zelle, die nicht über diese Eigenschaften verfügt, erklären können.

Für untransfizierte und mit FL-Prestin transfizierte HEK-Zellen zeigt sich eine geringere Zellmembranauslenkung für kleine Drucke von 1 nN, als für Drucke ab 1,6-2 nN (Abb. 23, 26). Allerdings nimmt die Zellmembranauslenkung für noch höhere Drücke (Abb. 23) nicht mehr zu. Eine Erklärung hierfür ist, dass der Sensor bei geringen Drücken entweder noch nicht vollständig in Kontakt mit der zu untersuchenden Zelle ist oder dass die Membran zum Aufbringen der maximalen Kraft erst vorgespannt werden muss.

In der vorgestellten Arbeit wurde ein System etabliert, das die funktionellen Eigenschaften von Haarzellen, die sich durch eine Transfektion eines Gens ändern können, messen kann. Damit ist ein wesentlicher Schritt erreicht, der es jetzt in nachfolgenden zukünftigen Studien ermöglicht, funktionelle Eigenschaften der HEK-Zelle nach Kotransfektion von FL-Prestin mit und ohne putativen Interaktionspartner

wie z.B. 9b-Prestin und Calmodulin zu studieren. Die Fluoreszenzmikroskopie kann hierbei eingesetzt werden, um transfizierte Zellen zu identifizieren und eine Cotransfektion zu bestätigen. Über diesen experimentellen Weg könne über eine Messung mittels der Kombination aus AFM und whole-cell Patch-Clamp neue Einblicke in die Funktion von Proteinen für motile Zellantworten gewonnen werden.

5. Zusammenfassung:

Schwerhörigkeit ist eine weit verbreitete sensorische Erkrankung beim Menschen. Die congenitale Schwerhörigkeit ist häufig erblich verursacht und besteht sehr oft in einer Innenohrschwerhörigkeit. Das genaue Verständnis der Innenohrfunktion und dadurch initiiertes Entwicklungsprozesse für neue Therapieansätze gehört zu den zentralen Interessen der Hörforschung. **Prestin** ist ein Motorprotein, welches in der Zellmembran der äußeren Haarzellen der Cochlea lokalisiert ist. Dieses Protein ist für die motilen Zellantworten der äußeren Haarzellen verantwortlich, welche die molekulare Basis des aktiven cochleären Verstärkers bilden. Der aktive cochleäre Verstärkungsmechanismus ist für die hohe Frequenzselektivität des Innenohres und damit z.B. für das Sprachdiskriminierungsvermögen des Menschen verantwortlich. Prestin führt über die Transformation von elektrischen Potentialänderungen in Konformationsänderungen zu Längenänderungen der äußeren Haarzellen. Der Ausfall der Funktion von Prestinproteinen durch z.B. Genmutationen wurde kürzlich mit einer schwerwiegenden Form von nicht-syndromaler, hereditärer Innenohrschwerhörigkeit in Zusammenhang gebracht. Bisher ist die Funktion einer trunkeierten Prestinisoform der Ratte (Prestin9b), die homolog zu einer Isoform im menschlichen Innenohr ist, sowie putativer Prestininteraktionspartner Rab10 (1) und Calmodulin (2) unbekannt. In der vorliegenden Studie wurde ein in vitro Zellsystem zur Solo- und Kotransfektion von Prestin, sowie von Prestin9b, Rab10 und Calmodulin in HEK293A-Zellen etabliert. Es wurde darüber hinaus ein System zur Messung funktioneller Veränderungen von mit FL-Prestin transfizierten HEK-Zellen anhand der Zellmembranauslenkung bei Zellmembranpotentialänderung mittels whole-cell patch-clamp-Technik und der Rasterkraftmikroskopie aufgebaut. Der Transport der translatierten Proteine in die Zellmembran konnte für FL-Prestin, rPrestin9b und Calmodulin in Solotransfektion, sowie für FL-Prestin und Calmodulin und vereinzelt für FL-Prestin und rPrestin9b in Kotransfektion nachgewiesen werden. Mit FL-Prestin transfizierte HEK-Zellen zeigten eine bis zu 10fach höhere Zellmembranauslenkung als untransfizierte. Damit konnte in der vorliegenden Studie die Basis für eine weiterführende Funktionsanalyse von rPrestin9b sowie putativer Prestininteraktionspartner gelegt werden. Mithilfe der in der vorliegenden Studie etablierten Funktionsanalysen von Prestin und seiner putativen Interaktionspartner konnte somit die funktionelle Interaktion von transfizierten Genkonstrukten des Prestinproteins direkt gemessen werden. Ein erweiterter Einblick in die molekulare Funktionsweise des aktiven cochleären Verstärkers wurde vorbereitet.

6. Abbildungen und Tabellen

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Übersicht über die Schallleitung im Ohr

Abb. 2: Zeichnung eines Querschnittes durch eine Cochleawindung

Abb. 3: Schematische Abbildung des Cortischen Organs

Abb. 4: Schematischer Abbau der AFM- und Patch-Clamp-Versuchseinrichtung

Abb. 5: Schema Lichtzeigerdetektionsverfahren

Abb. 6: AFM-Sensoren

Abb. 7: Negativkontrolle Leervektor GFP; Maßstab in A, 200 μm , in B, 50 μm

Abb. 8: FL-Prestin-GFP / Zellkern – Dapi; Maßstab in A,B, 50 μm , in C,D, 20 μm

Abb. 9: FL-Prestin-GFP / Zellkern – Dapi; Maßstab in A-F, 50 μm ,

Abb. 10: Negativkontrolle Leervektor DsRed / Dapi; Maßstab in A,B, 200 μm ,
in C,D, 50 μm

Abb. 11: 9b-Prestin-DsRed / Zellkern – Dapi; Maßstab in A-D, 20 μm

Abb. 12: Negativkontrolle anti-HA-Cy3 / Zellkern Dapi / Merge; Maßstab in A-F, 20
 μm

Abb. 13: Negativkontrolle Leervektor pGADT7- anti-HA – Cy3 / Zellkern Dapi /
Merge; Maßstab in A-C, 20 μm

Abb. 14: Negativkontrolle Leervektor anti-Rab – Alexa-Green / Zellkern Dapi /
Merge; Maßstab in A-C, 20 μm

Abb. 15: Rab10 – anti-Rab – AlexaGreen / Zellkern Dapi / Merge; Maßstab in A-F,
20 μm

Abb. 16: Negativkontrolle anti-Calm – AlexaGreen / Zellkern Dapi / Merge; Maßstab
in A-C, 20 μm

Abb. 17: Calmodulin – anti-Calm – AlexaGreen / Zellkern Dapi / Merge; Maßstab in
A-F, 20 μm

Abb. 18: Calmodulin anti-Calm – Cy3 / Zellkern Dapi / Merge; Maßstab in A-F, 20 μm

Abb. 19: FL-Prestin-GFP / 9b-Prestin-DsRed / Zellkern Dapi / Merge; Maßstab A-D
50 μm , E-P, 20 μm

Abb. 20: FL-Prestin-GFP / Calmodulin – anti-Calm – Cy3 / Zellkern Dapi / Maßstab in A-D, 20 μm

Abb. 21: Zellmembranauslenkung nicht-transfizierte HEK-Zelle in Abhängigkeit einer schrittförmigen Membranpotentialveränderung

Abb. 22: Zellmembranauslenkung nicht-transfizierte HEK-Zelle in Anhängigkeit sinusförmiger Membranpotentialveränderung

Abb. 23: Zellmembranauslenkung untransfizierter HEK-Zellen bei sinusförmiger Veränderung des Membranpotentialänderung und unterschiedlichen AFM-Sensordrücken

Abb. 24: sinusförmige Membranpotentialänderung untransfizierter und mit FL-Prestin transfizierter HEK-Zellen

Abb. 25: Zellmembranauslenkung bei untransfizierter HEK-Zelle und mit FL-Prestin-GFP transfizierter HEK-Zelle bei sinusförmiger Membranpotentialänderung

Abb. 26: Vergleich Zellmembranauslenkung untransfizierte HEK-Zellen und mit FL-Prestin-GFP transfizierten HEK-Zellen in Abhängigkeit von Membranpotentialänderung und der Kraft, mit der der AFM-Sensor auf die Zelle drückt

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendung von Primärantikörpern

Tabelle 2: Verwendung von Sekundärantikörpern

Tabelle 3: Verwendete Fluoreszenzproteine, Spektren und Fluoreszenzfilter

7. Literaturverzeichnis

Albert JT, Winter H, Schaechinger TJ, et al. Voltage-sensitive prestin orthologue expressed in zebrafish hair cells. *J Physiol.* 2007;580(Pt. 2):451–461.

Aldrich RW, Corey DP, Stevens CF (1983) A reinterpretation of mammalian sodium channel gating based on single channel recording. *Nature* 306(5942):436-41

Ashmore JF (1987) A fast motile response in guinea-pig outer hair cells: the cellular basis of the cochlear amplifier. *J Physiol* 388:323-347

Ashmore JF (1990) Forward and reverse transduction in the mammalian cochlea. *Neurosci Res Suppl* 12:S39-50

Ashmore J (2018) Outer Hair Cells and Electromotility Cold Spring Harb Perspect Med. 2018 Sep 4. pii: a033522

Babbey CM, Bacallao RL, Dunn KW (2010) Rab10 associates with primary cilia and the exocyst complex in renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 299(3):F495-506

Bao S, Zhu J (1998) Cloning of Rab GTPases expressed in human skeletal muscle: studies in insulin-resistant subjects. *Horm Metab Res.* 30(11):656-62.

Belyantseva IA, Adler HJ, Curi R, Frolenkov GI, Kachar B (2000) Expression and localization of prestin and the sugar transporter GLUT-5 during development of electromotility in cochlear outer hair cells. *J Neurosci* 20:RC116

Beurg M, Tan X, Fettiplace R. (2013) A prestin motor in chicken auditory hair cells: active force generation in a nonmammalian species. *Neuron.*;79(1):69–81.

Brown MC, Nuttall AL, Masta RI, Lawrence M (1983) Cochlear inner hair cells: effects of transient asphyxia on intracellular potentials. *Hear Res* 9:131-144

Cao J, Albertson R, Riggs B, Field CM, Sullivan W. (2008) Nuf, a Rab11 effector, maintains cytokinetic furrow integrity by promoting local actin polymerization. *J Cell Biol.* 182(2):301-13

Cimerman J, Waldhaus J, Harasztosi C, Duncker SV, Dettling J, Heidrych P, Bress A, Gampe-Braig C, Frank G, Gummer AW, Oliver D, Knipper M, Zimmermann U. (2013) Generation of somatic electromechanical force by outer hair cells may be influenced by prestin-CASK interaction at the basal junction with the Deiter's cell. *Histochem Cell Biol.* 140(2):119-35

Dallos P, Harris D (1978) Properties of auditory nerve responses in absence of outer hair cells. *J Neurophysiol* 41:365-383

Dallos P (1992) The active cochlea. *J Neurosci* 12:4575-4585

Dallos P, Evans BN (1995) High-frequency motility of outer hair cells and the cochlear amplifier. *Science* 267:2006-2009

- Dallos P, (1996) Cochlear Neurobiology *In: The Cochlea*. Springer Handbook of Auditory Research, Volume 8, (Editors: Dallos P, Popper AN, Fay RR), Springer Verlag, S. 1-43
- Dallos P, Fakler B (2002) Prestin, a new type of motor protein. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:104-111
- Dallos P, Zheng J, Cheatham MA (2006) Prestin and the cochlear amplifier. *J Physiol* 576:37-42
- Dallos P, (2008) Cochlear amplification, outer hair cells and prestin. 18(4):370-376.
- Davis H (1983) An active process in cochlear mechanics. *Hear Res* 9:79-90
- English AR, Voeltz GK. (2012) Rab10 GTPase regulates ER dynamics and morphology. *Nat Cell Biol*. 15(2):169–178.
- Fettiplace R (2006) Active hair bundle movements in auditory hair cells. *J Physiol* 576(Pt 1):29-36
- Forge A, Davies S, Zajic G (1991) Assessment of ultrastructure in isolated cochlear hair cells using a procedure for rapid freezing before freeze-fracture and deep-etching. *J Neurocytol* 20:471-484
- Gold T (1948) Hearing II. The physical basis of the action of the cochlea. *Proc R Soc Lond B* 135:492-498
- Gorbunov D, Sturlese M, Nies F (2014) Molecular architecture and the structural basis for anion interaction in prestin and SLC26 transporters. *Nat Commun*. 5:3622.
- Gummer AW, Meyer J (2002) Mechanical transduction in outer hair cells. *Audiol Neurootol*. 7(1):13-6.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*. 391(2):85-100.
- He DZZ, Lovas S, Ai Y, Li Y, Beisel KW. (2014) Prestin at Year 14: Progress and Prospect. *HearRes*. 0:25-35. doi:10.1016/j.heares.2013.12.002.
- He DZZ, Jia S, Sato T. (2010) Changes in plasma membrane structure and electromotile properties in prestin deficient outer hair cells. *Cytoskeleton (Hoboken, NJ)*. 67(1):43-55. doi:10.1002/cm.20423.
- Heidrych P, Zimmermann U, Bress A, Pusch CM, Ruth P, Pfister M, Knipper M, Blin N (2008) Rab8b GTPase, a protein transport regulator, is an interacting partner of otoferlin, defective in a human autosomal recessive deafness form. *Hum Mol Genet*. 17(23):3814-21
- Holley MC, Ashmore JF (1990) Spectrin, actin and the structure of the cortical lattice in mammalian cochlear outer hair cells. *J Cell Sci*. 96:283-91

- Holley MC, Kalinec F (1992) Structure of the cortical cytoskeleton in mammalian outer hair cells. *J Cell Sci.*102:569-80.
- Jia S, He DZ (2005) Motility-associated hair-bundle motion in mammalian outer hair cells. *Nat Neurosci* 8:1028-1034
- Kachar B, Brownell WE, Altschuler R, Fex J (1986) Electrokinetic shape changes of cochlear outer hair cells. *Nature* 322:365-368
- Kaneko T, Harasztosi C, Mack AF, Gummer AW (2006) Membrane traffic in outer hair cells of the adult mammalian cochlea. *Eur J Neurosci.* 23(10):2712-22
- Keller JP, Homma K, Duan C, Zheng J, Cheatham MA, Dallos P. (2014) Functional regulation of the SLC26-family protein prestin by calcium/calmodulin. *J Neurosci.* 34(4):1325–1332.
- Kodera N, Yamamoto D, Ishikawa R, Ando T (2010) Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy, 4;468(7320):72-6
- Koller M, Schnyder B, Strehler EE (1990) Structural organization of the human CaMIII calmodulin gene. *Biochim Biophys Acta.* 1087(2):180-9
- Leaf DS, Blum LD (1998) Analysis of rab10 localization in sea urchin embryonic cells by three-dimensional reconstruction. *Exp Cell Res.* 243(1):39-49.
- Lieberman MC, Gao J, He DZ, Wu X, Jia S, Zuo J (2002) Prestin is required for electromotility of the outer hair cell and for the cochlear amplifier. *Nature* 419:300-304
- Lim Y S, Chua C E, Tang B L (2011), Rabs and other small GTPases in ciliary transport. *Biology of the Cell*, 103: 209-221
- Liu XZ, Ouyang XM, Xia XJ, Zheng J, Pandya A, Li F, Du LL, Welch KO, Petit C, Smith RJ, Webb BT, Yan D, Arnos KS, Corey D, Dallos P, Nance WE, Chen ZY (2003) Prestin, a cochlear motor protein, is defective in non-syndromic hearing loss. *Hum Mol Genet* 12:1155-1162
- Luo X, Wang JY, Zhang FL, Xia Y (2018) Identification and analysis of the proteins interacted with Prestin in cochlear outer hair cells of guinea pig *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi.* 7;53(1):34-38.
- McPherson MA, Shori DK, Mills CL, Goodchild MC, Dormer RL. (1991) Altered biochemical regulation of secretion in cystic fibrosis epithelial cells. *Adv Exp Med Biol.* 290:173-85
- Navaratnam D, Bai JP, Samaranayake H, Santos-Sacchi J (2005) N-terminal-mediated homomultimerization of prestin, the outer hair cell motor protein. *Biophys J* 89:3345-3352

- Nin F, Reichenbach T, Fisher JA, Hudspeth AJ. (2012) Contribution of active hair-bundle motility to nonlinear amplification in the mammalian cochlea. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109(51):21076–21080.
- Oliver D, Fakler B (1999) Expression density and functional characteristics of the outer hair cell motor protein are regulated during postnatal development in rat. *J Physiol* 519:791-800
- Oliver D, He DZ, Klocker N, Ludwig J, Schulte U, Waldegger S, Ruppersberg JP, Dallos P, Fakler B. (2001) Intracellular anions as the voltage sensor of prestin, the outer hair cell motor protein. *Science*. 292:2340–3.
- Opsahl LR, Webb WW (1994) Lipid-glass adhesion in giga-sealed patch-clamped membranes. *Biophys J*. 66(1):75-9
- Pegues JC, Friedberg F (1990) Multiple mRNAs encoding human calmodulin. *Biochem Biophys Res Commun*, 172(3):1145-9
- Robles L, Ruggiero MA. *Mechanics of the Mammalian Cochlea*. *Physiological reviews*. 2001;81(3):1305-1352.
- Roland JT, Lapierre LA, Goldenring JR. (2009) Alternative splicing in class V myosins determines association with Rab10. *J Biol Chem*. 284(2):1213–1223.
- Rhyner JA, Ottiger M, Wicki R, Greenwood TM, Strehler EE (1994) Structure of the human CALM1 calmodulin gene and identification of two CALM1-related pseudogenes CALM1P1 and CALM1P2. *Eur J Biochem*. 225(1):71-82
- Ryan A, Dallos P (1975) Effect of absence of cochlear outer hair cells on behavioural auditory threshold. *Nature* 253:44-46
- Santos-Sacchi J, Dilger JP (1988) Whole cell currents and mechanical responses of isolated outer hair cells. *Hear Res* 35:143-150
- Santos-Sacchi J (2003) New tunes from Corti's organ: the outer hair cell boogie rules. *Curr Opin Neurobiol* 13:459-468
- Santos-Sacchi J, Zhao HB (2003) Excitation of fluorescent dyes inactivates the outer hair cell integral membrane motor protein prestin and betrays its lateral mobility. *Pflugers Arch* 446:617-622
- Scambler PJ, McPherson MA, Bates G, Bradbury NA, Dormer RL, Williamson R. (1987) Biochemical and genetic exclusion of calmodulin as the site of the basic defect in cystic Hum Genet. 76(3):278
- Schmitz S, Schaap IA, Kleinjung J, Harder S, Grainger M, Calder L, Rosenthal PB, Holder AA, Veigel C (2010) Malaria parasite actin polymerization and filament structure. *J Biol Chem*. 285(47):36577-85
- Schuck S, Gerl M J, Ang A, Manninen A, Keller P, Mellman I, Simons K (2007) Rab10 is involved in basolateral transport in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Traffic*. Jan;8(1):47-60

Song L, Santos-Sacchi J. (2010) Conformational State-Dependent Anion Binding in Prestin: Evidence for Allosteric Modulation. *Biophysical Journal*. 98(3):371-376.

Strutz, Mann (2017) *Praxis der HNO-Heilkunde*

Szönyi M, He DZ, Ribári O, Sziklai I, Dallos P (2001) Intracellular calcium and outer hair cell electromotility. *Brain Res*. 13;922(1):65-70

Vieira OV. (2016) Rab3a and Rab10 are regulators of lysosome exocytosis and plasma membrane repair. *Small GTPases*. 9(4):349–351.

Wang D, Lou J, Ouyang C, et al. (2010) Ras-related protein Rab10 facilitates TLR4 signaling by promoting replenishment of TLR4 onto the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci* 107(31):13806-11

Weber T, Zimmermann U, Winter H, Mack A, Köpschall I, Rohbock K, Zenner HP, Knipper M (2002) Thyroid hormone is a critical determinant for the regulation of the cochlear motor protein prestin. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:2901-2906

Zhang PC, Keleshian AM, Sachs F (2001) Voltage-induced membrane movement. *Nature*. 413(6854):428-32

Zheng J, Shen W, He DZ, Long KB, Madison LD, Dallos P (2000) Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature* 405:149-155

Zheng J, Long KB, Matsuda KB, Madison LD, Ryan AD, Dallos PD (2003) Genomic characterization and expression of mouse prestin, the motor protein of outer hair cells. *Mamm Genome* 14:87-96

Zuo H, Cui B, She X, Wu M (2008) Changes in Guinea pig cochlear hair cells after sound conditioning and noise exposure. *J Occup Health* 50(5):373-9

8. Danksagung

Allen voran gilt mein ganz besonderer Dank Frau Professor Dr. Marlies Knipper für die Möglichkeit einen Großteil dieser Arbeit in Ihrer Arbeitsgruppe durchführen zu können und für die Bereitstellung dieses äußerst vielseitigen und hoch interessanten Themas! Ohne ihre hervorragende Betreuung, Ihre immerwährende Hilfsbereitschaft, und die unzähligen fachlichen Ratschläge wäre die Fertigstellung dieser Arbeit nicht geglückt.

Mein nicht minderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Stephan Grissmer für seine Hilfsbereitschaft und konstruktive Kritik beim Erstellen der Arbeit.

Herr Dr. Matthias Langer danke ich für seine technische wie fachliche Hilfe bei den elektrophysiologischen Versuchen und beim Erstellen der Arbeit.

Frau Dr. Zimmermann danke ich sehr herzlich für all ihre Unterstützung. Ohne ihre Organisation und fachliche Unterstützung wäre die Durchführung der immunhistochemischen Versuche nicht in dieser Form möglich gewesen. Weiterhin danke ich ihr für die unzähligen Korrekturen und die Hilfestellung bei der Bildbearbeitung.

Christoph Franz, Jelka Cimermann und Katharina Braun danke ich sehr herzlich für Ihre Korrekturen, für die Bereitstellung der Topologiebilder und für ihre stete Hilfsbereitschaft bei allen Fragen und Problemen. Vielen Dank für alles!

Ein herzliches Dankeschön gilt allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Knipper.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Persönliche Daten

Name	Friedrich Roland Bader
Geburtsdatum	11.06.1984
Geburtsort	Esslingen am Neckar

Schulbildung

2003	Abitur Schelztorgymnasium, Esslingen am Neckar
------	---

Universitätsausbildung

2003 - 2010	Medizin, Universität Ulm
2005	1. Medizinisches Staatsexamen
2010	2. Medizinisches Staatsexamen

Berufliche Laufbahn:

Seit 1.12.2010 bis 06.07.2016	Assistenzarzt, Hals-Nasen-Ohrenklinik, Katharinenhospital Klinikum Stuttgart
----------------------------------	---

07.07.2016 bis 31.12.2017	Facharzt, Hals-Nasen-Ohrenklinik, Katharinenhospital Klinikum Stuttgart
------------------------------	--

Seit 1.1.2018	Facharzt, Universitätsklinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Universitätsklinik Tübingen
---------------	--

Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

30.08.2019

Die vorliegende Arbeit wurde im Hörforschungszentrum Tübingen unter Betreuung von Frau Prof. Dr. Knipper durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Frau Dr. Knipper und mich selbst.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Labormitglieder der AG Knipper von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 30.08.2019