Funktionelle Bedeutung der Interaktion zwischen dem intestinalen Anionenaustauscher Down-Regulated in Adenoma (DRA) und dem PDZ-Adapterprotein Sorting Nexin 27 (SNX27)

Inauguraldissertation zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizinwissenschaften (Doctor rerum humanarum, Dr. rer. hum.)

Universitätsmedizin Rostock
Zentrum für Innere Medizin, Klinik II
Abteilung für Gastroenterologie und Endokrinologie
Direktor: Prof. Dr. med. Georg Lamprecht

vorgelegt von Karen Bannert
geb. am 19.03.1990 in Wolgast

Rostock, 2018

urn:nbn:de:gbv:28-diss2018-0126-7

Dekan: Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger

1. Gutachter: **Prof. Dr. med. Georg Lamprecht**
Abteilung für Gastroenterologie und Endokrinologie,
Universitätsmedizin Rostock

2. Gutachter: **Dr. rer. nat. Thomas Bittorf**
Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie,
Universitätsmedizin Rostock

3. Gutachter: **Prof. Dr. med. Ursula Seidler**
Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie,
Medizinische Hochschule Hannover

Datum der Einreichung: 28.02.2018
Datum der Verteidigung: 25.07.2018

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis VII

Abbildungsverzeichnis X

Tabellenverzeichnis XI

1 Einleitung 1

1.1 Mechanismen des intestinalen Na^+- und Cl^--Transports 1

1.2 Transporter der elektroneutralen NaCl-Absorption 4

1.2.1 NHE2 und NHE3: Na^+/H^+-Austauscher der SLC9A-Genfamilie 4

1.2.2 DRA und PAT1: Cl^-/HCO_3^--Austauscher der SLC26-Genfamilie 5

1.3 Regulation von NHE3 und DRA 8

1.3.1 Trafficking und Recycling von NHE3 und DRA 8

1.3.2 Interaktionen von NHE3 und DRA mit PDZ-Adapterproteinen 10

1.3.3 Regulation von NHE3 durch die PDZ-Adapterproteine der NHERF-Familie 12

1.3.4 Regulation von DRA durch die PDZ-Adapterproteine der NHERF-Familie 12

1.4 SNX27 - einzigartiges PDZ-Protein der Sorting Nexin-Familie 13

1.4.1 Interaktionen und Funktionen von SNX27 15

1.4.2 SNX27-Retromer-Komplex 17

2 Zielstellung 20

3 Material und Methoden 21

3.1 Klonierungsarbeiten 21

3.1.1 Restriktionsverdau 21

3.1.2 Agarose-Gelelektrophorese 22

3.1.3 Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen 22

3.1.4 Ligation 23

3.1.5 Transformation von kompetenten *Escherichia coli* 23
3.1.6 Isolation von Plasmid-DNA....23
3.1.7 Anlegen von Glycerol-Stocks 24
3.2 Zellbiologische Arbeiten 24
3.2.1 Verwendete Zelllinien....24
3.2.2 Zellkultur 26
3.2.3 Induzierbare Expression von BFP-SNX27 in EcR293-Zellen....28
3.2.4 Knockdown von SNX27....30
3.3 Genexpressionsanalysen....31
3.3.1 Isolation von RNA aus Zellen 31
3.3.2 cDNA-Synthese 32
3.3.3 Nachweis von Genen mittels quantitativer Echtzeit-PCR....33
3.4 Proteinanalytische Methoden 33
3.4.1 Herstellung von Zelllysat 34
3.4.2 Proteinbestimmung und Probenvorbereitung 34
3.4.3 SDS-PAGE 34
3.4.4 Western Blot und Immundetektion von Proteinen....35
3.4.5 Immunfluoreszenzfärbungen....36
3.4.6 Oberflächenbiotinylierung....37
3.5 Fluorometrie....41
3.6 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie und Superresolution Mikroskopie....42
3.7 Statistische Auswertungen 44
4 Ergebnisse....45
4.1 Induzierbare Expression von BFP-SNX27 in EcR293-Zellen....45
4.2 SNX27 Knockdown in EcR293-Zellen 49
4.3 Einfluss der SNX27-Expression auf die Aktivität von DRA in .....
EcR293-Zellen 50

4.3.1 Aktivität von DRA nach Induktion der Expression von BFP-SNX27 in EcR293-Zellen 51

4.3.2 Aktivität von DRA nach SNX27 Knockdown in EcR293-Zellen 52

4.4 Oberflächenexpression von DRA nach Induktion der Expression von SNX27 und nach SNX27 Knockdown in EcR293-Zellen 54

4.5 Lokalisation von SNX27 und Colokalisation mit DRA in 4C4-Zellen 56

4.5.1 Darstellung der Lokalisation von SNX27 und Colokalisation mit DRA in 4C4-Zellen anhand repräsentativer Aufnahmen 57

4.5.2 Subzelluläre Verteilung von SNX27, DRA bzw. DRA-ETKFminus und Rab5, Rab7 sowie Rab11 in 4C4-Zellen 58

4.5.3 Colokalisation von SNX27 und DRA in Rab5-, Rab7- und Rab11-positiven Endosomen in 4C4-Zellen 65

5 Diskussion 72

5.1 Zellmodelle und SNX27-Expressionsbedingungen 72

5.2 Einfluss von SNX27 auf die Aktivität und die Oberflächenexpression von DRA 74

5.2.1 Einfluss von SNX27 auf die Aktivität von DRA 75

5.2.2 Einfluss von SNX27 auf die Oberflächenexpression von DRA 77

5.2.3 Einfluss von SNX27 auf die Aktivität und Oberflächenexpression von DRA im gemeinsamen Kontext 78

5.3 Intrazelluläre Lokalisation und Colokalisation von SNX27 und DRA 80

5.3.1 Intrazelluläre Lokalisation von SNX27 81

5.3.2 Intrazelluläre Lokalisation von DRA 84

5.3.3 Colokalisation von DRA mit SNX27 85

5.4 Möglicher Einfluss von SNX27 auf das Recycling von DRA 86

6 Zusammenfassung 92

7 Literaturverzeichnis 94

Anhang.....107

A1 Chemikalien und Reagenzien.....107

A2 Verbrauchsmaterialien 108

A3 Geräte.....109

A4 Puffer und Gebrauchslösungen.....111

A5 Verwendete Vektoren.....114

Danksagungen

Selbstständigkeitserklärung

Wissenschaftlicher Lebenslauf

Abkürzungsverzeichnis

A. dest.	destilliertes Wasser
APS	Ammoniumpersulfat
BAR	Bin/Amphiphysin/Rvs
BCECF-AM	2‘,7‘-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(6)-Carboxyfluorescein-Acetoxymethylester
BFP	blue fluorescent protein
BSA	bovines Serumalbumin
Caco	carcinoma colon
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
CED	chronisch-entzündliche Darmerkrankung
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CLD	congenital chloride diarrhea
CLSM	confocal laser scanning microscopy
CMV	Zytomegalievirus
DMEM	Dulbecco’s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRA	down-regulated in adenoma, SLC26A3
DRA-ETKFminus	mutierte Form von DRA ohne PDZ-Interaktionsmotiv
DTT	Dithiothreitol
E. coli	*Escherichia coli*
E3KARP	NHE3 kinase A regulatory protein
EBP50	ezrin binding phosphoprotein of 50 kDa
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	early endosome, frühes Endosom
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EGFR	epidermal growth factor receptor
ENaC	epithelial Na^+ channel
EPEC	enteropathogener *Escherichia coli*
ERM	Ezrin, Radixin, Moesin

ETKF	Glutamat, Threonin, Lysin, Phenylalanin (PDZ-Interaktionsmotiv von DRA)
FBS	Fetales Kälberserum
FERM	Protein 4.1-Ezrin-Radixin-Moesin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
HEK	human embryonic kidney
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-1-Ethansulfonsäure
IKEPP	intestinal and kidney enriched PDZ protein
KD	Knockdown
Kir3	inwardly rectifying K^+ channel
KO	Knockout
LE	late endosome, spätes Endosom
miR	microRNA
mRNA	messenger RNA
MRP4	multidrug resistance-associated protein 4
mrt1	methamphetamine responsive transcript 1
MW	Molekulargewicht
MβCD	Methyl-β-Cyclodextrin
NHE3	Na^+/H^+ exchanger 3, SLC9A3
NHERF	Na^+/H^+ exchanger regulatory factor
NR2C	N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor 2C
NTC	non targeting control
PAT1	putative anion transporter 1
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDZ	Post Synaptic Density 95, Disc Large, Zonula Occludens 1
PDZK1	PDZ domain protein kidney 1
pH_i	intrazellulärer pH-Wert
PI	Phosphatidylinositol
PI3P	Phosphatidylinositol-3-Phosphat
PKA	Protein Kinase A
PonA	Ponasteron A
PX	phagocyte oxidase homology
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR

Rab	ras-like in rat brain
RE	Recycling-Endosom
RFP	red fluorescent protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
ROI	region of interest
RT	Raumtemperatur
SD	standard deviation, Standardabweichung
SEM	standard error of the mean, Standardfehler
SGLT1	sodium glucose linked transporter 1
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
Slc	solute carrier
SNX27	Sorting Nexin 27
SR-SIM	Superresolution Structured Illumination Microscopy
STAS	sulfate transporter and anti-sigma factor antagonist
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	Tetramethylethylendiamin
VPS	vacuolar protein sorting
WASH	Wiskott-Aldrich syndrome protein and SCAR homolog
β_2-AR	β_2-Adrenorezeptor

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Elektroneutrale NaCl-Absorption. 3

Abbildung 2: Mitglieder der NHERF(Na^+/H^+ exchanger regulatory factor)-Familie. ...11

Abbildung 3: Struktur von Sorting Nexin 27 (SNX27). 14

Abbildung 4: Intrazelluläres Trafficking und Recycling von Transmembranproteinen sowie die Beteiligung des Sorting Nexin 27(SNX27)-Retromer-Komplexes. 19

Abbildung 5: Schema zur Durchführung (A) und Auswertung (B und C) der Oberflächenbiotinylierungs-Experimente. 40

Abbildung 6: Schematische Darstellung zum Bezug der Z-Ebenen unterschiedlich hoher Zellen auf die relative Zellhöhe von basal (0 %) bis apikal (100 %). 43

Abbildung 7: Induzierbare Genexpression von SNX27. 46

Abbildung 8: Induzierbare Proteinexpression von SNX27. 47

Abbildung 9: Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen der induzierbaren Expression von SNX27. 48

Abbildung 10: Knockdown (KD) von SNX27 in den Zelllinien EcR293/EGFP-DRA und EcR293/EGFP-DRA-ETKFminus. 49

Abbildung 11: Aktivität von DRA bzw. DRA-ETKFminus nach Induktion der SNX27-Expression. 51

Abbildung 12: Aktivität von DRA bzw. DRA-ETKFminus nach dem Knockdown (KD) von SNX27. 53

Abbildung 13: Oberflächenexpression von DRA bzw. DRA-ETKFminus. 55

Abbildung 14: Repräsentative Superresolution Mikroskopie-Aufnahmen. 57

Abbildung 15: Subzelluläre Verteilung von SNX27 (A), DRA bzw. DRA-ETKFminus (B), der endosomalen Marker Rab5 (C), Rab7 (D) und Rab11 (E) sowie DAPI (F). 59

Abbildung 16: Vergleich der subzellulären Verteilung von SNX27, DRA bzw. DRA-ETKFminus und DAPI (oben) bzw. Rab5, Rab7 und Rab11 (unten) innerhalb der Zelllinien 4C4/EGFP-DRA (A) bzw. 4C4/EGFP-DRA-ETKFminus (B). 63

Abbildung 17: Colokalisation von SNX27 (A) und DRA (B) mit jeweils Rab5-, Rab7- und Rab11-positiven Endosomen sowie von DRA mit SNX27 (C). 67

Abbildung 18: Vergleich der Colokalisation von SNX27 (oben) und DRA bzw. DRA-ETKFminus (unten) mit jeweils Rab5-, Rab7- und Rab11-positiven Endosomen innerhalb der Zelllinien 4C4/EGFP-DRA (A) und 4C4/EGFP-DRA-ETKFminus (B). ...69

Abbildung 19: Modell zum Einfluss von SNX27 auf das Recycling von DRA und zu einem alternativen Mechanismus für das Recycling von DRA-ETKFminus. 87

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien. 26

Tabelle 2: Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese.....32

Tabelle 3: Temperaturprotokoll für die cDNA-Synthese. 32

Tabelle 4: Reaktionsansatz für die quantitative Echtzeit-PCR. 33

Tabelle 5: Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele. 35

Tabelle 6: Für den Western Blot verwendete Primär- und Sekundär-Antikörper. 36

Tabelle 7: Für die Immunfluoreszenzfärbungen verwendete Primär- und Sekundär-Antikörper.....37

1 Einleitung

Jährlich sterben nach aktuellen Angaben der World Health Organisation weltweit etwa 525.000 Kinder unter fünf Jahren an Durchfallerkrankungen [1]. Die häufigsten Ursachen sind kontaminiertes Trinkwasser, unzureichende Sanitärzustände und mangelnde Hygiene in Entwicklungsländern. Doch auch in wohlhabenderen Nationen bleibt die Diarrhö trotz deutlich geringerer Inzidenz und vielfältiger Ursachen einer der zwei häufigsten pädiatrischen Notfälle [2]. Besonders für Kleinkinder, aber auch für unterernährte, immungeschwächte und ältere Menschen können schwere Diarrhöen lebensbedrohlich sein, da sie zu einem starken Verlust von Flüssigkeit und Elektrolyten führen. Die Aufrechterhaltung des Wasser- und Elektrolythaushaltes ist somit von außerordentlicher Bedeutung für die Gesundheit.

Täglich passieren bei gesunden Erwachsenen zirka 8,5 l Flüssigkeit den Verdauungstrakt. Davon stammen nur etwa 2 l aus der Nahrung, der Rest setzt sich aus endogenen Sekreten der Speicheldrüsen, des Magens, des Pankreas, der Gallenblase und des Darmepithels - vor allem des proximalen Dünndarms - zusammen. Unter physiologischen Bedingungen werden davon 99 % resorbiert, sodass lediglich rund 100 ml mit dem Stuhl ausgeschieden werden [3]. Obwohl der Dünndarm den Hauptresorptionsort darstellt und nur ein relativ geringer Flüssigkeitsanteil über den Dickdarm resorbiert wird, besitzt das Kolon eine maximale Absorptionskapazität von bis zu 5 l täglich [4]. Infolgedessen kann eine gesteigerte Wasserpassage aufgrund einer dysregulierten Absorption oder Motilitätsstörung des Dünndarms bis zu einem gewissen Grad durch den Dickdarm kompensiert werden [5]. Im Gegensatz dazu können selbst relativ geringe Abnahmen der kolonischen Flüssigkeitsabsorption zu signifikanten Durchfällen führen [4]. Für die Aufrechterhaltung des Flüssigkeits- und Elektrolythaushaltes sind Ionentransportvorgänge in den intestinalen Epithelzellen von entscheidender Bedeutung.

1.1 Mechanismen des intestinalen Na^+- und Cl^--Transports

Der intestinale Wasser- und Elektrolythaushalt wird durch Ionentransportvorgänge reguliert, zu denen sowohl Absorptions- als auch Sekretionsprozesse zählen. Die Flüssigkeitsbewegung in den Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes folgt dem trans- und parazellulären aktiven Transport von Elektrolyten, wobei vorrangig Na^+ und Cl^- eine Rolle spielen. Der Na^+- und Cl^--Transport wird dabei durch vier unterschiedliche, miteinander vernetzte Mechanismen vermittelt, die im Folgenden näher erläutert werden.

In der apikalen Membran des Jejunums und des Ileums existieren Symporter, die Na^+ gemeinsam mit Glukose bzw. Galaktose (sodium glucose linked transporter 1, SGLT1) oder mit Aminosäuren (solute carriers, Slc) in die Zelle aufnehmen [3]. Diese **Nährstoff-gekoppelte Na^+-Absorption** ist der primäre Mechanismus für die postprandiale Flüssigkeitsabsorption [4]. Die elektrochemische Triebkraft für diesen sekundär aktiven Cotransport wird durch die basolateral lokalisierte Na^+/K^+-ATPase und das intrazellulär negative Membranpotential erzeugt [6]. Zudem entsteht durch die transepitheliale Na^+-Bewegung ein lumennegatives transepitheliales Potential, das die parazelluläre Absorption von Wasser und Cl^- antreibt. SGLT1 wird nur wenig durch Second Messenger wie Ca^{2+}, zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) oder zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) beeinflusst und ist in der Regel auch nach Infektionen mit Enterotoxin-freisetzenden Keimen aktiv [3, 7]. Daher kann dieser Mechanismus auch für therapeutische Interventionen bei Durchfallerkrankungen genutzt werden. Zur Erhöhung der Elektrolyt- und Wasser-Absorption werden orale Rehydratations-Lösungen eingesetzt [4, 8].

Weiterhin kann Na^+ im distalen Kolon auch elektrogen in die Zellen gelangen. Für die **elektrogene Na^+-Absorption** ist der hochselektive, epitheliale Na^+-Kanal ENaC (epithelial Na^+ channel) verantwortlich, der in der apikalen Membran lokalisiert ist. Im Kolon ist die luminale Na^+-Konzentration deutlich geringer als in anderen Darmabschnitten und nimmt von proximal nach distal ab [8]. Die Absorption von Na^+ gegen den bestehenden Konzentrationsgradienten wird durch die Aktivität der basolateralen Na^+/K^+-ATPase angetrieben. Zudem kommt es aufgrund des lumennegativen transepithelialen Potentials zu einer passiven Cl^--Absorption über Cl^--Kanäle in der apikalen Epithelzellmembran und zum Einstrom von Wasser. ENaC wird vorrangig über Aldosteron reguliert. Aldosteron trägt über eine vermehrte Synthese, einen vermehrten Einbau in die Plasmamembran und eine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit zur Stimulation des Kanals bei [3].

Entlang des gesamten Intestinaltrakts findet eine **elektrogene Cl^--Sekretion** statt, die durch den apikalen Cl^--Kanal CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) vermittelt wird. Der für die Cl^--Sekretion notwendige Gradient wird durch das intrazellulär negative Membranpotential hervorgerufen. Die Aktivität eines basolateralen $Na^+/K^+/2Cl^-$-Cotransporters sorgt dabei für eine ausreichende intrazelluläre Cl^--Konzentration [9]. Zudem treibt das resultierende transepitheliale lumennegative Potential die parazelluläre Sekretion von Na^+ und Wasser an. Hormone, bakterielle Toxine, Transmitter oder auch Laxantien können die intrazelluläre Konzentration der second messenger Ca^{2+}, cAMP und cGMP erhöhen, die eine Stimulation von CFTR

bewirken [3]. Bei einer übermäßigen Aktivierung von CFTR kommt es zur vermehrten Flüssigkeitssekretion in das Darmlumen. Diese kann die Absorptionskapazität des Kolons übersteigen und somit eine sekretorische Diarrhö verursachen [10]. Die Bedeutung einer intakten Cl^--Sekretion zeigt sich jedoch vor allem bei einer Mutation von CFTR, die das Krankheitsbild der zystischen Fibrose (auch Mukoviszidose) verursacht.

Ein Großteil des NaCl- und Wassertransports im Ileum und im proximalen Kolon kommt durch den parallelen Austausch von Na^+ gegen H^+ und von Cl^- gegen HCO_3^- im Rahmen der **elektroneutralen NaCl-Absorption** zustande [11]. Die Absorption von Na^+ und Cl^- wird durch die funktionelle Kopplung des Na^+/H^+-Austauschers NHE3 (Na^+/H^+ exchanger 3) und des Cl^-/HCO_3^--Austauschers DRA (down-regulated in adenoma) vermittelt [12–15]. Durch die Verknüpfung der Transportaktivitäten von DRA und NHE3 entsteht keine Veränderung des intrazellulären pH-Wertes oder des transepithelialen Potentials [16]. Der für die NaCl-Absorption notwendige elektrochemische Gradient wird durch die basolaterale Na^+/K^+-ATPase bereitgestellt. Darüber hinaus kommt es durch den entstehenden osmotischen Gradienten zur parazellulären Wasserresorption. Die elektroneutrale NaCl-Absorption ist schematisch in **Abbildung 1** dargestellt. Im Gegensatz zur Stimulation der elektrogenen Cl^--Sekretion führt eine Zunahme der intrazellulären Ca^{2+}-, cAMP- oder cGMP-Konzentration zu einer Inhibition der elektroneutralen NaCl-Absorption [7, 8, 17].

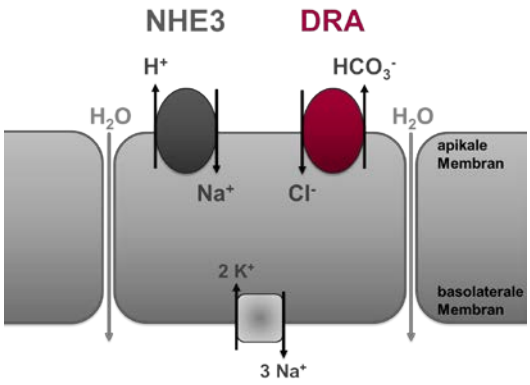


Abbildung 1: Elektroneutrale NaCl-Absorption. Die elektroneutrale NaCl-Absorption wird durch den Na^+/H^+-Austauscher NHE3 (Na^+/H^+ exchanger 3) und den Cl^-/HCO_3^--Austauscher DRA (down-regulated in adenoma) vermittelt. Zusätzlich kommt es zur parazellulären Resorption von Wasser. Der notwendige elektrochemische Gradient wird durch die Aktivität der basolateralen Na^+/K^+-ATPase bereitgestellt [eigene Abbildung].

Die Funktionsweise und die Regulation von DRA sind Forschungsschwerpunkte der eigenen Arbeitsgruppe und Gegenstand der vorliegenden Promotionsarbeit. In den folgenden Abschnitten wird daher zunächst ein Überblick über die an der elektroneutralen NaCl-Absorption beteiligten Transporter gegeben [1.2]. Weiterhin werden die

bislang bekannten Mechanismen der Regulation von NHE3 und DRA beschrieben [1.3] und schließlich auf Sorting Nexin 27 (SNX27) als Interaktionspartner und potentieller Regulator der Funktion von DRA eingegangen [1.4].

1.2 Transporter der elektroneutralen NaCl-Absorption

In den folgenden Abschnitten werden die an der elektroneutralen NaCl-Absorption beteiligten Transportproteine in ihrer Struktur, Funktion und physiologischen Bedeutung beschrieben. Neben NHE3 und DRA vermitteln auch NHE2 und PAT1 (putative anion transporter 1) einen Austausch von Na^+ gegen H^+ bzw. von Cl^- gegen HCO_3^- im Darm und werden daher ebenfalls in diesem Kapitel erläutert.

1.2.1 NHE2 und NHE3: Na^+/H^+-Austauscher der SLC9A-Genfamilie

Die SLC9A-Familie besteht aus neun monovalenten Kation-Proton-Antiportern, die an der pH-Homöostase, dem epithelialen Elektrolyt-Transport und der systemischen sowie zellulären Volumenregulation beteiligt sind [18, 19]. Die Struktur der Mitglieder der SLC9A-Familie wurde bislang nicht endgültig aufgedeckt. Es ist jedoch bekannt, dass der N-Terminus der NHEs aus elf oder zwölf Transmembrandomänen besteht und für den Na^+/H^+-Austausch verantwortlich ist [18]. Darüber hinaus wird der intrazelluläre C-Terminus für die Regulation der Transportrate sowie die Interaktion mit akzessorischen Proteinen und dem Zytoskelett benötigt [20, 21]. NHE3 enthält ein internes und ein C-terminales PDZ(Post Synaptic Density 95, Disc Large, Zonula Occludens 1)-Interaktionsmotiv, welche die Bindung von NHE3 an multiple Proteine ermöglichen [18, 22]. Die PDZ-Interaktionen sind von großer Bedeutung für die Regulation von NHE3 und werden daher gesondert in Abschnitt 1.3 behandelt.

Von den neun SLC9A-Familienmitgliedern sind NHE3 (SLC29A3) und NHE2 (SLC9A2) in der apikalen Membran von Epithelzellen lokalisiert und weisen übereinstimmende Expressionen im humanen Jejunum, Ileum und Kolon auf [8]. Neben NHE3 übt auch NHE2 unter basalen Bedingungen eine Funktion bei der luminalen Na^+-Absorption aus [23], deren Ausmaß jedoch von der Spezies abhängig ist [18]. In Studien an NHE2- und NHE3-Knockout(KO)-Mäusen konnte gezeigt werden, dass NHE3 der quantitativ dominierende Na^+/H^+-Austauscher im Ileum und im proximalen Kolon ist. Im Gegensatz zu NHE3-KO-Mäusen, die Absorptionsstörungen und eine leichte Diarrhö aufwiesen [24], hatten Mäuse mit einem NHE2-KO keinen gastrointestinalen Phänotyp [25]. Bei einem parallelen KO von NHE2 und NHE3 wurden zudem die gleichen Auswirkungen

wie nach einem alleinigen NHE3-KO festgestellt [26]. Folglich ist NHE3 der entscheidende Kationenaustauscher für die elektroneutrale NaCl-Absorption im Intestinaltrakt.

Eine Störung des Na^+/H^+-Austausches ist im Bürstensaum für die autosomal-rezessive kongenitale Natrium-Diarrhö verantwortlich, die unter anderem mit Hyponatriämie, metabolischer Azidose und Durchfällen mit einem hohen Na^+-Gehalt einhergeht [27]. Eine spezifische Mutation von NHE3 konnte trotz der Hinweise aus den tierexperimentellen Studien allerdings nicht identifiziert werden [28], sodass der genaue Mechanismus dieser seltenen Erkrankung weiter unklar ist.

NHE3 wird ebenfalls in der Niere stark exprimiert und vermittelt den Hauptanteil der Na^+- und Wasserabsorption im proximalen Tubulus [29]. Darüber hinaus ist NHE3 auch für die renale und intestinale transepitheliale Ca^{2+}-Resorption von Bedeutung [30, 31]. Die spezifische physiologische Funktion von NHE2 ist hingegen bislang nicht bekannt. Es gibt jedoch Hinweise, dass NHE2 eine wichtige Funktion bei der Reparatur von Epithelschädigungen besitzt [32].

1.2.2 DRA und PAT1: Cl^-/HCO_3^--Austauscher der SLC26-Genfamilie

DRA (SLC26A3) und PAT1 (SLC26A6) gehören zu den elf Mitgliedern der SLC26-Genfamilie, die aus elektroneutralen oder elektrogenen Anionenaustauschern für den Transport einer Vielzahl unterschiedlicher mono- und divalenter Anionen besteht [33, 34]. Erst kürzlich wurde die Architektur der SLC26-Transporter anhand eines prokaryotischen Fumarat-Transporters aufgeschlüsselt [35]. Die modulare Struktur verbindet eine Transmembrandomäne aus zwei ineinandergreifenden, inversen Wiederholungen von jeweils sieben Transmembransegmenten mit einer kompakten, zytoplasmatischen STAS(sulfate transporter and anti-sigma factor antagonist)-Domäne. Die STAS-Domäne ist für die Stabilisierung der Proteine, die Oberflächenexpression und die Aktivität der Ionenaustauscher von Bedeutung [36, 37]. Darüber hinaus besitzen viele der SLC26 Transporter, darunter auch DRA und PAT1, ebenso wie NHE3 ein C-terminales Typ I PDZ-Interaktionsmotiv [33]. Die Interaktionen von DRA mit entsprechenden PDZ-Adapterproteinen spielen eine wichtige Rolle für die Regulation des Anionenaustauschers [siehe 1.3].

Das *SLC26A3*-Gen wurde 1993 durch Schweinfest et al. identifiziert. Da die Expression des auf Chromosom 7q31 lokalisierten Gens in Adenomen und Adenokarzinomen des Kolons herunterreguliert ist, wurde es „down-regulated in adenoma“ (DRA) genannt und eine mögliche Rolle als Tumorsuppressor beschrieben [38]. Die genaue Funktion des Proteins war zunächst unklar, bis die Mutation von DRA als Auslöser der kongenitalen Chlorid-Diarrhö (congenital chloride diarrhea, CLD [39]) gefunden wurde

[40]. Die CLD wurde erstmalig im Jahr 1945 von Gamble et al. [41] und Darrow [42] als schwere, chronische Durchfallerkrankung beschrieben, die durch die Ausscheidung großer Mengen wässrigen Stuhls mit hohem Cl^--Gehalt charakterisiert ist. Ursache für die unbehandelt meist tödlichen Cl^--reichen Durchfälle ist eine Störung des Cl^-/HCO_3^--Austausches, die durch eine Loss-of-Function-Mutation des *SLC26A3*-Gens hervorgerufen wird. Bislang wurden über 80 Mutationen als Auslöser dieser seltenen Erkrankung identifiziert [43], für die bis zum Jahr 2015 nur etwa 250 Fälle beschrieben wurden [44].

Diese Erkenntnisse zur Funktion des Anionenaustauschers wurden auch durch Untersuchungen im KO-Mausmodell gestützt. In einer Studie von Schweinfest et al. zeigten Slc26a3-KO-Mäuse Krankheitserscheinungen, die ähnlich der CLD im Menschen mit Cl^--reichen Durchfällen, Dehydratation und Wachstumsretardierung einhergingen [45]. Folglich konnte gezeigt werden, dass DRA ein essentieller Cl^-/HCO_3^--Austauscher im Kolon mit bedeutender Funktion für den intestinalen Elektrolyt- und Wasserhaushalt ist.

DRA wurden vielfältige Transportaktivitäten für SO_4^{2-}, OH^-, Cl^-, HCO_3^- und Oxalat zugeschrieben [33, 34, 46, 47]. Allerdings konnte in HEK293(human embryonic kidney)-Zellen gezeigt werden, dass DRA nur einen geringen SO_4^{2-}/HCO_3^--Austausch und keinen Transport von OH^- vermittelt [48]. Darüber hinaus existieren Hinweise, dass DRA für den ungekoppelten Transport von NO_3^- und SCN^- verantwortlich ist und auch als Kanal fungiert [49, 50]. Anhand von Untersuchungen in HEK293-Zellen und *Xenopus laevis* Oozyten wurde für DRA weiterhin eine Funktion als elektrogener Anionenaustauscher beschrieben, der einen gekoppelten Austausch von 2 Cl^-/1 HCO_3^- vermittelt [49, 51]. Weitere Studien zeigten jedoch, dass DRA als elektroneutraler Austauscher bei der gekoppelten NaCl-Absorption im Ileum und proximalen Kolon sowie bei der ungekoppelten HCO_3^--Sekretion agiert [34, 48, 52]. Weiterhin ist DRA, funktionell gekoppelt mit CFTR, für die Cl^-- und HCO_3^--Sekretion im oberen Gastrointestinaltrakt zuständig [51, 53–55]. Zwischen DRA und CFTR findet eine wechselseitige Stimulation statt, die über die Interaktion der STAS-Domäne von DRA mit der R-Domäne von CFTR sowie deren PDZ-Liganden vermittelt wird [51, 54]. Die Interaktion mit unterschiedlichen PDZ-Adapterproteinen hat dabei möglicherweise einen Einfluss auf die koordinierte Funktion der Transportproteine [48] und ist Gegenstand von Abschnitt 1.3.2. Die Expression und Aktivität von DRA in der Plasmamembran hängt neben der Interaktion des Transporters mit einem oder mehreren PDZ-Adapterproteinen auch von der Aktivität der Phosphatidylinositol-3-Kinase sowie der Lokalisation in Sphingolipid- und Cholesterol-reichen Membran-Mikrodomänen, sogenannten Lipid Rafts, ab [56].

Auch wenn die molekularen Mechanismen noch nicht vollständig geklärt sind, gibt es Hinweise auf eine Funktion von DRA als Tumorsuppressor [16, 57]. Unter anderem konnte unabhängig von der Transportaktivität eine wachstumshemmende Wirkung von DRA [58] und somit eine mögliche Funktion des Ionenaustauschers bei der Regulation des Zellwachstums gezeigt werden [33], die möglicherweise auf einer Inhibition der Proliferation von Kryptenzellen beruht [59]. Darüber hinaus wurden durch Bhutia et al. eine gezielte tumorsuppressive Wirkung im Kolon und ein Zusammenhang mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) beschrieben [16]. Die DRA-Expression ist in der intestinalen Mukosa von Patienten mit einer CED verringert [60, 61], zudem ist die Inflammation wiederum mit der Entstehung von Kolonkarzinomen assoziiert [16].

DRA wird in der apikalen Membran des gesamten Intestinaltraktes exprimiert, ist jedoch vorrangig im Duodenum und im Kolon nachweisbar [8, 34, 40, 53]. Durch immunhistochemische Analysen konnte zudem gezeigt werden, dass DRA in Enterozyten des Kolons an der Oberfläche und im oberen Abschnitt der Krypten lokalisiert ist [62–64]. Zusätzlich zur membranständigen Lokalisation wurde DRA auch intrazellulär in endosomalen Kompartimenten nachgewiesen [65].

Neben DRA ist auch PAT1 in der apikalen Membran intestinaler Epithelzellen nachweisbar und vermittelt ebenfalls den Austausch von Cl^- gegen HCO_3^- [8]. Obwohl zunächst ein elektrogener Cl^-/HCO_3^--Austausch mit einer Stöchiometrie von 1:2 beschrieben wurde [49, 66], ist basierend auf elektrophysiologischen Messungen in Mäusen von einem elektroneutralen Transport im Duodenum und Jejunum auszugehen [34, 67]. Darüber hinaus fungiert PAT1 auch als Cl^-/OH^--Austauscher und vermittelt ebenfalls den Transport von SO_4^{2-}, Formiat und Oxalat [34, 66]. PAT1 wird besonders im Dünndarm und eher in geringem Ausmaß im Kolon exprimiert und weist damit ein entgegengesetztes Muster zu der Expression von DRA auf [68, 69]. Immunhistochemische Untersuchungen konnten zudem zeigen, dass PAT1 im Bürstensaum des Duodenums im oberen Teil der Mikrovilli lokalisiert ist [34, 68], während DRA vorrangig in den Krypten und im unteren Teil der Mikrovilli detektiert wurde [34]. Darüber hinaus wiesen PAT1-defiziente Mäuse zwar einen deutlich verminderten Cl^-/HCO_3^--Austausch auf, erschienen jedoch gesund [70]. Folglich vermittelt PAT1 ebenfalls die Aufnahme von Cl^-, die allerdings nicht wie bei DRA direkt an die Resorption von Wasser gekoppelt ist [69]. Walker et al. konnten zudem anhand von PAT1- und DRA-KO-Mäusen zeigen, dass DRA der quantitativ bedeutendere Cl^-/HCO_3^--Austauscher im Dünndarm ist [15].

Zusammenfassend lässt sich anhand dieser Ergebnisse und der Mutation von DRA als Auslöser der CLD belegen, dass DRA den verantwortlichen Cl^-/HCO_3^--Austauscher der elektroneutralen NaCl-Absorption darstellt. Die Funktion und Regulation des Anionenaustauschers werden in den folgenden Abschnitten weiter vertieft.

1.3 Regulation von NHE3 und DRA

NHE3 und DRA weisen im distalen Dünndarm und im proximalen Dickdarm eine korrelierende Expression auf und vermitteln gemeinsam die elektroneutrale NaCl-Absorption. Allerdings konnten für die beiden Transportproteine Darmsegment-spezifische Expressions- und Funktionsunterschiede nachgewiesen werden [71]. Obwohl NHE3 und DRA auch unabhängig voneinander exprimiert werden und aktiv sind, wird durch die enge funktionelle Kopplung bei der NaCl-Absorption im Ileum und proximalen Kolon von einer gemeinsamen Regulation der Proteine ausgegangen [14, 55, 71].
In NHE3-KO-Mäusen wurde eine vermehrte Expression von DRA im Kolon nachgewiesen, die auf eine kompensatorische Rolle von DRA beim Wasser- und Elektrolytverlust hinweist [63]. Weiterhin kam es in Caco2(carcinoma colon)-Zellen durch Stimulanzien, die zu einer Erhöhung von intrazellulärem Ca^{2+} oder cAMP führen, zu einer Inhibition der apikalen Funktion von DRA und NHE3, die mit der gesteigerten Endozytose der Transporter einherging [14].
Änderungen des intrazellulären pH-Wertes vermitteln eine indirekte Kopplung von NHE3 und DRA [18, 55]. Darüber hinaus kommt es wahrscheinlich auch zu einer physischen Kopplung, die vermutlich durch die Bindung beider Transporter an gemeinsame PDZ-Adapterproteine zustande kommt [13]. Die Bildung von Multiproteinkomplexen aus den Transportproteinen, PDZ-Adapterproteinen, Ankerproteinen, dem Zytoskelett und von beteiligten Proteinkinasen ist für die Regulation der elektroneutralen NaCl-Absorption mutmaßlich entscheidend [72].

In den folgenden Abschnitten werden Einzelheiten des Recyclings von NHE3 und DRA sowie bekannte Interaktionen der Transporter mit PDZ-Adapterproteinen beschrieben.

1.3.1 Trafficking und Recycling von NHE3 und DRA

NHE3 und DRA unterliegen einer konstitutiven und regulierten Endozytose. Der Ausbau der Transporter aus der Plasmamembran wird durch ein endosomales Recycling ausgeglichen, durch das ein Großteil der Proteine wieder an der Zelloberfläche erscheint [73]. Über das intrazelluläre Trafficking und Recycling wird die Anzahl

der Transporter in der Membran und damit die Aktivität der Ionenaustauscher beeinflusst [21].
Koordiniert werden diese Prozesse durch Rab(ras-like in rat brain)-Proteine, die zur Superfamilie der kleinen Ras-like GTPasen gehören [74]. Rab-Proteine sind meist in intrazellulären Membranen lokalisiert und agieren als molekulare Schalter in der Regulation des intrazellulären Traffickings [75]. Jede der etwa 70 humanen Rab-GTPasen wird mit einem Organell assoziiert und spezifiziert einen Transport-Schritt im endozytotischen, exozytotischen und Recycling-Weg [75, 76].

Eine Übersicht der Recycling-Wege von Transmembranproteinen ist in Abbildung 4 auf Seite 19 dargestellt. Zunächst werden die Transmembranproteine über einen Clathrin-abhängigen oder einen Clathrin-unabhängigen Weg endozytiert [77]. Das geschieht durch endozytotische Vesikel, die von der Plasmamembran abgespalten und zu frühen Endosomen werden bzw. mit einem vorhandenen frühen Endosom fusionieren [78, 79]. Frühe Endosomen stellen die entscheidende Schnittstelle bei der Sortierung der endozytierten Proteine dar [80] und sind mit Rab5 assoziiert. Ausgehend von den Rab5-positiven frühen Endosomen kann durch einen Reifungsprozess eine Konversion in Rab7-positive späte Endosomen erfolgen, in denen die Moleküle einem lysosomalen Degradations-Weg zugeführt werden. Im Gegensatz dazu können die Proteine auch in andere Organellen sortiert werden, die einem Wiedereinbau in die Plasmamembran dienen [79]. Mithilfe von Rab11-positiven Recycling-Endosomen erfolgt ein Wiedereinbau der internalisierten Proteine in der Plasmamembran über einen sogenannten *langsamen Recycling-Weg*. Alternativ können Proteine, die Clathrin-abhängig in die Zelle aufgenommen wurden, über einen Rab4-abhängigen *schnellen Recycling-Weg* zurück zur Zelloberfläche gelangen [73].

NHE3 wurde zusätzlich zum Mikrovillus in einer separaten Population von Clathrin-assoziierten, subapikalen Endosomen lokalisiert [81]. Diese endosomale Fraktion stellt möglicherweise einen Speicher funktioneller Transporter dar, die hormonabhängig zwischen diesem Kompartiment und dem Bürstensaum pendeln [21, 81]. Folglich wird NHE3 durch eine Verlagerung seiner Lokalisation in der Plasmamembran und in intrazellulären Kompartimenten reguliert, die durch Veränderungen der Endo- und/oder Exozytoseraten erfolgt [29]. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Ca^{2+}-vermittelte Inhibition von NHE3 vermutlich durch die Endozytose des Ionenaustauschers zustande kommt und darüber hinaus mit der Interaktion eines PDZ-Adapterproteins zusammenhängt [82].

DRA wird ebenfalls Clathrin-vermittelt endozytiert [83]. Die Arbeitsgruppe um Gill et al. konnte anhand von *in vitro* und *in vivo* Modellen zeigen, dass Infektionen mit

enteropathogenem *Escherichia coli* (EPEC) zu einer Reduktion der Funktion und Oberflächenexpression von DRA führten [84]. Gujral et al. beschrieben eine Modulation des Recycling von DRA als Ursache für die EPEC-induzierten Durchfälle, die zum Teil durch eine gesteigerte Endozytose und zum Teil durch eine verringerte Exozytose hervorgerufen wurde [83]. In der eigenen Arbeitsgruppe konnte zudem gezeigt werden, dass das Recycling von DRA in Abhängigkeit der Interaktion mit PDZ-Adapterproteinen erfolgt. Anhand von Immunisolationen und Colokalisations-Untersuchungen in HEK293-Zellen wurde nachgewiesen, dass das PDZ-Interaktionsmotiv von DRA für den Transport des Proteins von Rab5-positiven frühen Endosomen in Rab11-positive Recycling-Endosomen benötigt wird [65].

Das intrazelluläre Trafficking und Recycling von NHE3 und DRA stellt somit einen bedeutenden regulatorischen Mechanismus dar, der eng an die Interaktionen der Transporter mit PDZ-Adapterproteinen geknüpft ist.

1.3.2 Interaktionen von NHE3 und DRA mit PDZ-Adapterproteinen

Wie unter 1.2.1 und 1.2.2 erwähnt, besitzen sowohl NHE3 als auch DRA PDZ-Interaktionsmotive, die für die Regulation der elektroneutralen NaCl-Absorption entscheidend sind. Während NHE3 über ein internes und ein C-terminales Bindemotiv verfügt [22], setzt sich das Interaktionsmotiv von DRA aus den C-terminalen Aminosäuren Glutamat, Threonin, Lysin und Phenylalanin (ETKF) zusammen. Über die PDZ-Interaktionsmotive von NHE3 und DRA erfolgt die strukturelle Kopplung der Transporter und die Bindung an PDZ-Domänen von regulatorischen Adapterproteinen [13, 72]. Weiterhin ist auch eine PDZ-vermittelte strukturelle Kopplung von DRA und CFTR bekannt [54].

PDZ-Domänen stellen die häufigsten Protein-Protein-Interaktionsmodule im menschlichen Genom dar, die einzeln oder mehrfach in einer großen Vielzahl von Proteinen enthalten sind. Die Bezeichnung leitet sich dabei von den ersten drei Proteinen ab, in denen solche Domänen entdeckt wurden: Post Synaptic Density 95, Drosophila Disc Large und Zonula Occludens 1. PDZ-Domänen sind etwa 90 - 100 Aminosäuren lang und besitzen eine konservierte Sequenz, die durch Faltung eine kompakte, globuläre Struktur ausbildet [72, 85]. Diese Napf-ähnliche Struktur ermöglicht die spezifische Erkennung der Zielproteine anhand kurzer, meist distaler Sequenzen am Carboxy-Terminus [86, 87]. Zudem haben PDZ-Proteine mit mehreren PDZ-Domänen oder zusätzlichen Protein-Interaktions-Domänen die Fähigkeit, mit sich selbst und weiteren Target-Proteinen Oligomere zu bilden und sich dadurch zu diversen intrazellulären Multiproteinkomplexen zu formieren [85, 86, 88]. Darüber hinaus zeigten Wu et al.,

dass viele PDZ-Domänen im menschlichen Genom nicht nur mit ihren Liganden interagieren, sondern auch an Phosphatidylinositol(PI)-haltige Lipidmembranen binden [89].

In Epithelzellen sind multiple PDZ-Proteine enthalten, die in spezifischen subzellulären Kompartimenten wie dem Bürstensaum, der basolateralen Membran, den Tight Junctions, dem Golgi-Apparat und Endosomen lokalisiert sind [90]. Eine besondere Klasse innerhalb der PDZ-Proteine stellen die Adapterproteine der NHERF(Na^+/H^+ exchanger regulatory factor)-Familie dar. Die NHERF-Familie besteht aus vier Mitgliedern (NHERF1 - NHERF4) mit je zwei bzw. vier PDZ-Domänen sowie zum Teil einer zusätzlichen ERM(Ezrin, Radixin, Moesin)-Domäne. Eine Übersicht über die PDZ-Adapterproteine der NHERF-Familie ist in **Abbildung 2** dargestellt.

Abbildung 2: Mitglieder der NHERF(Na^+/H^+ exchanger regulatory factor)-Familie. Dargestellt sind synonyme Bezeichnungen, die Struktur bestehend aus multiplen PDZ(Post Synaptic Density 95, Disc Large, Zonula Occludens 1)- und zum Teil einer ERM(Ezrin, Radixin, Moesin)-Domäne sowie die Größe der Proteine und die vorrangige Lokalisation in Epithelzellen. Modifiziert nach [90].

Die NHERF-Proteine sind hochgradig homolog und werden unter anderem im Bürstensaum des Dünndarms und des Kolons exprimiert [90]. Allerdings weisen die NHERF-Familienmitglieder innerhalb der intestinalen Epithelzellen unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen auf [vgl. Abbildung 2] und interagieren mit verschiedenen Bindungspartnern in spezifischen Komplexen [90]. Darüber hinaus konnten Untersuchungen an NHERF-KO-Mäusen zeigen, dass die Adapterproteine nicht redundant sind und sich nicht funktionell ersetzen können [91].

Für alle vier beschriebenen Familienmitglieder wurde eine Interaktion mit NHE3 und DRA nachgewiesen. EBP50 (ezrin binding phosphoprotein of 50 kDa, auch NHERF oder NHERF1) und E3KARP (NHE3 kinase A regulatory protein, auch NHERF2) besitzen jeweils zwei PDZ-Domänen sowie eine ERM-Domäne, über die eine Bindung an NHE3 und DRA sowie an Proteine des Zytoskeletts erfolgt [13, 92]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass beide PDZ-Adapterproteine sowohl Homo- als auch Heterodimere sowie -oligomere bilden können und somit zur Entstehung zellulärer Signalkomplexe beitragen [93]. Vermutlich kommt es durch Dimerisierung von

E3KARP und Bindung von DRA und NHE3 an die jeweils zweite PDZ-Domäne des PDZ-Adapterproteins zur strukturellen Kopplung der beiden Transporter [13]. Weiterhin wurden ebenfalls für PDZK1 (PDZ domain protein kidney 1, auch NHERF3) und IKEPP (intestinal and kidney enriched PDZ protein, auch NHERF4), die jeweils vier PDZ-Domänen besitzen, Interaktionen mit NHE3 und DRA nachgewiesen [55, 94–96].

Allerdings wurden bislang vorrangig Studien zur funktionellen Relevanz der PDZ-Interaktionen für NHE3 durchgeführt. Die PDZ-Adapterproteine sind über die Regulation der Transportrate und der Expression in der Plasmamembran sowohl für die Stimulation als auch für die Inhibition des Na^+/H^+-Austauschers verantwortlich [72].

1.3.3 Regulation von NHE3 durch die PDZ-Adapterproteine der NHERF-Familie

EBP50 und E3KARP werden für die cAMP-vermittelte Inhibition von NHE3 benötigt [97]. Beide PDZ-Proteine dienen mithilfe ihrer ERM-Domänen als Adapter zwischen NHE3 und Ezrin, einem Ankerprotein für die Protein Kinase A (PKA). Folglich wird NHE3 durch EBP50 bzw. E3KARP in räumliche Nähe zur PKA gebracht, die zu einer Phosphorylierung und damit zur Inhibition des Kationenaustauschers führt [98]. Über diesen Mechanismus wird NHE3 durch die PDZ-Interaktion basal in einem inaktiven Zustand gehalten [86].
EBP50 ist weiterhin für die Aktivierung von NHE3 nach der Stimulation des β_2-Adrenorezeptors zuständig [99]. Darüber hinaus sind E3KARP und PDZK1 als Protein Kinase G- und Protein Kinase C-Ankerproteine für die cGMP-[100] bzw. Ca^{2+}-vermittelte Inhibition von NHE3 erforderlich, die mit einer gesteigerten Endozytose von NHE3 einhergeht [82, 95, 101]. Im Gegensatz dazu führte die Bindung von IKEPP zu einer Ca^{2+}-abhängigen Stimulation von NHE3 in transfizierten PS120-Zellen [96]. Weiterhin ist die Glukokortikoid-vermittelte Stimulation der NHE3-Aktivität von E3KARP abhängig [102].

1.3.4 Regulation von DRA durch die PDZ-Adapterproteine der NHERF-Familie

Die Regulation von DRA ist wahrscheinlich von seinen Partnerproteinen abhängig, der Transporter wird jedoch auch individuell reguliert [55]. Obwohl NHE3 und die elektroneutrale NaCl-Absorption durch cAMP inhibiert werden, besitzt DRA keine *consensus phosphorylation site* für die PKA und ist per se cAMP-unempfindlich. Gemeinsam mit NHE3 erfolgt jedoch eine sekundäre, PKA-abhängige Inhibition von DRA. Diese Inhibition kommt möglicherweise durch die funktionelle Kopplung der Transporter über den intrazellulären pH-Wert oder durch eine Komplexbildung anhand von Interaktionen mit den PDZ-Adapterproteinen zustande [55]. Bei Coexpression mit CFTR wird DRA

hingegen durch cAMP stimuliert [103]. Beide Transporter bilden durch Interaktion ihrer R- bzw. STAS-Domäne und einem zusätzlichen PDZ-Adapterprotein (EBP50 oder PDZK1) einen strukturellen Komplex und können so gemeinsam über die cAMP-vermittelte Phosphorylierung der R-Domäne von CFTR durch die PKA stimuliert werden [54, 55, 103]. Darüber hinaus wird DRA unabhängig von NHE3 oder CFTR durch die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration inhibiert. Dieser Prozess erfordert die Interaktion von DRA mit PDZK1 [17].

Die bisherigen Erkenntnisse zur Aktivität und der Regulation von NHE3 und DRA lassen die Hypothese zu, dass unterschiedliche PDZ-Adapterproteine in verschiedenen Kompartimenten entlang des Recycling-Weges vorhanden sind [65]. Diese Vermutung wird durch Ergebnisse einer Studie von Li et al. gestützt, in der NHE3 intrazellulär und in der Plasmamembran in unterschiedlich großen Multiproteinkomplexen detektiert wurde [104]. Folglich ist das Trafficking von NHE3 - und wahrscheinlich auch von DRA - mit unterschiedlichen PDZ-Adapterproteinen assoziiert, die vermutlich sequentiell mit den Transportern interagieren und die Stimulation bzw. Inhibition beeinflussen [90, 105].

Aufgrund der nahen Verwandtschaft mit den bislang bekannten NHERF-Familienmitgliedern [90] und der Lokalisation in frühen Endosomen ist SNX27 als ein weiteres PDZ-Protein in den Fokus der eigenen Arbeitsgruppe gerückt, das nachfolgend im Detail beschrieben wird.

1.4 SNX27 - einzigartiges PDZ-Protein der Sorting Nexin-Familie

SNX27 ist eines von bis zu 34 im Menschen exprimierten Mitgliedern der Sorting Nexin-Proteinfamilie [106]. Die Sorting Nexine besitzen eine Funktion bei der Endozytose, der endosomalen Sortierung sowie dem intrazellulären Trafficking von Proteinen und sind durch eine phagocyte oxidase homology(PX)-Domäne charakterisiert [107, 108]. PX-Domänen können an Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI3P) binden, das besonders in Rab5-positiven frühen Endosomen vorkommt [73]. Daher stehen Sorting Nexine häufig mit PI3P-angereicherten Kompartimenten des frühen endosomalen Netzwerkes in Verbindung [108]. Neben dieser Phospholipid-Bindedomäne enthalten diverse Familienmitglieder weitere Protein-Protein-Interaktionsmotive, die deren subzelluläre Lokalisation und Fähigkeit zur Komplexbildung bestimmen [107].

Als einziges Sorting Nexin besitzt SNX27 eine N-terminale PDZ-Domäne und weist damit eine strukturelle Besonderheit auf. Zahlreiche PDZ-vermittelte Interaktionen von SNX27 wurden in den vergangenen Jahren beschrieben. Ausgewählte interagierende

Proteine und die Funktion von SNX27 bei diesen Interaktionen werden nachfolgend gesondert erläutert [siehe 1.4.1]. Darüber hinaus enthält SNX27 C-terminal zusätzlich eine Ras-assoziierende sowie eine atypische Protein 4.1-Ezrin-Radixin-Moesin-(FERM)-Domäne [siehe **Abbildung 3**] [109]. Die FERM-ähnliche Domäne ist für die Bindung der Interaktionspartner mitverantwortlich [108] und gemeinsam mit der PDZ-Domäne in das Recycling gebundener Proteine involviert [110]. Darüber hinaus wurde in der FERM-ähnlichen Domäne ebenfalls eine PI-Bindestelle entdeckt, die eine deutliche Präferenz für bi- und triphosphorylierte PIs besitzt [111]. Die PX-Domäne vermittelt zudem die vorrangige Lokalisation von SNX27 in frühen Endosomen [110, 112–115].

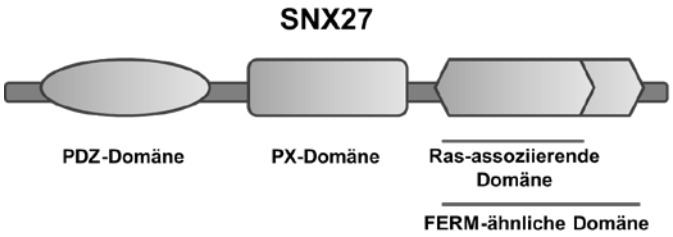


Abbildung 3: Struktur von Sorting Nexin 27 (SNX27). SNX27 besitzt neben einer charakteristischen phagocyte oxidase homology(PX)-Domäne als einziges Sorting Nexin eine N-terminale PDZ(Post Synaptic Density 95, Disc Large, Zonula Occludens 1)-Domäne sowie eine Ras-assoziierende und eine atypische 4.1-Ezrin-Radixin-Moesin(FERM)-Domäne. Modifiziert nach [109].

SNX27 wurde erstmalig im Jahr 2003 von Kajii et al. beschrieben. Die Arbeitsgruppe entdeckte im Neokortex der Ratte das durch Psychostimulanzien induzierbare Gen *mrt1* (methamphetamine responsive transcript 1), das für zwei Proteine von etwa 60 kDa mit einer PX- und einer PDZ-Domäne kodiert (Mrt1a und Mrt1b) [116]. Auch im Menschen gibt es unterschiedliche SNX27-Isoformen, die durch alternatives Splicing entstehen. Die Isoformen SNX27a (61 kDa) und SNX27b (60 kDa) unterscheiden sich lediglich in den C-terminalen 15 Aminosäuren [115]. Darüber hinaus existiert eine weitere Isoform (51 kDa), die ebenso wie SNX27a und SNX27b vorrangig im Gehirn exprimiert wird [117]. SNX27 kommt darüber hinaus auch in einer Vielzahl weiterer Gewebe, in moderater Menge auch im Gastrointestinaltrakt, vor [114, 118].

Die physiologische Bedeutung von SNX27 wird im KO-Mausmodell deutlich [114]. SNX27-KO-Mäuse wiesen eine starke Beeinträchtigung des Organwachstums, unter anderem des Darmes, auf und starben innerhalb der ersten drei Wochen nach der Geburt. Wang et al. beschrieben darüber hinaus eine Beteiligung von SNX27 an der Pathogenese des Down Syndroms und des Morbus Alzheimer [119]. Eine verringerte SNX27-Expression führte im Mausmodell zu synaptischen Dysfunktionen, einer

Störung des Lernens und des Erinnerungsvermögens [120] sowie zur Entstehung eines Hydrocephalus [121].

Somit besitzt SNX27 eine essentielle Rolle bei einer Vielzahl physiologischer Prozesse wie dem postnatalen Wachstum und Überleben sowie einer normalen Hirnfunktion.

1.4.1 Interaktionen und Funktionen von SNX27

In eigenen Vorarbeiten im Rahmen einer Masterarbeit wurde bereits die strukturelle Interaktion von DRA mit SNX27 identifiziert und charakterisiert. Anhand unterschiedlicher Bindungsassays (Fluorophor-gekoppelter Immunadsorptions Assay, Pull Down Assay und Co-Immunpräzipitation) konnte die spezifische Bindung des C-terminalen PDZ-Bindemotivs von DRA an die PDZ-Domäne von SNX27 nachgewiesen werden [122]. Die Proteinbindung hatte eine vergleichbare Affinität wie die mit den bereits zuvor bekannten Interaktionspartnern EBP50 und E3KARP. Im Gegensatz dazu fand keine Interaktion von SNX27 mit der mutierten Form von DRA ohne PDZ-Interaktionsmotiv statt. Basierend auf diesen Ergebnissen konnte SNX27 daher als weiteres Mitglied der NHERF-Familie identifiziert werden, das möglicherweise einen Einfluss auf das Recycling von DRA ausübt [122]. Die funktionelle Bedeutung der Interaktion von DRA und SNX27 ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

SNX27 interagiert über seine PDZ-Domäne mit zahlreichen weiteren Transmembran- und auch einigen intrazellulären Proteinen, von denen viele entscheidende Funktionen beim Wachstum und der Zellhomöostase ausüben [123]. Dabei spielt SNX27 eine wichtige Rolle bei der Sortierung und dem Trafficking der Proteine. In der Literatur werden jedoch unterschiedliche Funktionen von SNX27 beschrieben - von der Endozytose und lysosomalen Degradation bis hin zum Recycling gebundener Proteine.

Joubert et al. konnten im Zellkulturmodell die spezifische, PDZ-abhängige Interaktion von SNX27 mit dem 5-Hydroxytryptamin-Typ 4-Rezeptor nachweisen, einem G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR), der in Prozesse des Lernens, der Atmungskontrolle, der Ernährung und des gastrointestinalen Transits involviert ist. SNX27 führt zu einer Umverteilung des Rezeptors von der Plasmamembran hin zu frühen Endosomen [115].
Des Weiteren führt die PDZ-Interaktion von SNX27 mit dem G-Protein-gekoppelten Kaliumkanal Kir3 (inwardly rectifying K^+ channel) zur Endozytose, einem vermehrten lysosomalen Abbau, einer verringerten Oberflächenexpression und einer reduzierten Aktivität des Proteins, das die neuronale Erregbarkeit im Gehirn reguliert [124].
Cai und Loo et al. beschrieben im Rahmen der Interaktion mit dem N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor 2C (NR2C) ebenfalls eine Funktion von SNX27 bei der Endozytose.

Die Arbeitsgruppe fand eine gesteigerte NR2C-Expression sowie eine beeinträchtigte Endozytose des Glutamat-Rezeptors in Neuronen von SNX27-KO-Mäusen.
In einer weiteren Untersuchung in HEK293-Zellen vermittelte SNX27 die Internalisierung des multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4) und führte dadurch zu einer Verringerung der Oberflächenexpression und Transportfunktion des Medikamenten-Transporters [125].

Die genannten Ergebnisse belegen eine Funktion von SNX27 bei der Endozytose und dem lysosomalen Abbau der Interaktionspartner, die mit einer verringerten Oberflächenexpression und Aktivität einhergehen und dadurch unterschiedliche, vorrangig neuronale, Prozesse beeinträchtigen. Im Gegensatz dazu wurde in zahlreichen weiteren Studien eine Rolle von SNX27 beim Recycling von gebundenen Proteinen beschrieben.

Wang et al. trugen durch den Nachweis der PDZ-Interaktion von SNX27 mit ionotropen Glutamat-Rezeptoren und mit Presenilin-1, einer Untereinheit des γ-Sekretase-Komplexes, zum Verständnis der Pathogenese des Down Syndroms und der Alzheimer Erkrankung bei [119–121]. Die beim Down Syndrom überexprimierte micro-Ribonukleinsäure (miRNA) 155 führt zu einer Verringerung der SNX27-Expression, die ein vermindertes Recycling der Glutamat-Rezeptoren und schließlich eine Beeinträchtigung der synaptischen Funktionen zur Folge hat [120]. SNX27 interagiert außerdem mit Presenilin-1, inhibiert dadurch die Formation des γ-Sekretase-Komplexes und verringert somit dessen proteolytische Aktivität. Daher führte die Herabregulation von SNX27 in HEK293-Zellen zu einer gesteigerten Produktion von neurotoxischem β-Amyloid, dessen Akkumulierung zur Down Syndrom-Pathogenese beiträgt und Ursache der Entstehung des Morbus Alzheimer ist [119].
Des Weiteren konnten Singh et al. SNX27 in intestinalen Epithelzellen nachweisen und zeigen, dass das Protein für die Aktivität und Stabilität von NHE3 im Bürstensaum von Bedeutung ist [126]. Die Depletion von SNX27 führte zu einer Reduktion der basalen und stimulierten NHE3-Aktivität und Oberflächenexpression. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Interaktion der PDZ-Domäne von SNX27 mit dem C-Terminus von NHE3 für die Exozytose des Transporters von frühen Endosomen zur Plasmamembran benötigt wird [126].
In einer Studie von Lauffer et al. wurde außerdem die PDZ-Interaktion von SNX27 mit dem β_2-Adrenorezeptor (β_2-AR) beschrieben, einem G-Protein-gekoppelten Signalrezeptor, der an der Relaxation der glatten Muskulatur - unter anderem des Darmes - beteiligt ist [112]. SNX27 wird als entscheidendes Sortierungs-Protein für das Recycling des β_2-AR von frühen Endosomen zur Plasmamembran aufgefasst [112].

Die Beteiligung von SNX27 am Recycling unterscheidet sich fundamental von den zuvor beschriebenen Effekten bei der Endozytose und dem lysosomalen Abbau interagierender Proteine. Diese kontroversen Ergebnisse hinsichtlich der SNX27-Funktion beruhen möglicherweise auf unterschiedlichen experimentellen Ansätzen. Während unter SNX27-Überexpressionsbedingungen eine gesteigerte Endozytose und eine Degradation der gebundenen Proteine beobachtet wurde [112, 115, 124, 127], führte die Depletion von nativem SNX27 zu einem gestörten Recycling sowie einer verringerten Oberflächenexpression und Aktivität der Proteine [112, 119, 126]. Insgesamt kann davon ausgegangen werden, dass SNX27 bei endogener Expression - und damit unter physiologischen Bedingungen - eine wichtige Bedeutung für das Recycling gebundener Proteine besitzt.

Damit stimmen auch die Ergebnisse einer Studie von Steinberg et al. überein. Die Arbeitsgruppe hat quantitative Proteom-Untersuchungen des SNX27-Interaktoms durchgeführt und das Oberflächenproteom in SNX27- und Retromer-supprimierten Zellen analysiert [123]. SNX27 konnte dadurch als zentrale Komponente des sogenannten Retromer-Komplexes identifiziert werden, auf den im nachfolgenden Abschnitt im Detail eingegangen wird [siehe 1.4.2]. Zudem wurden mehr als 120 Oberflächenproteine bestimmt, die den SNX27-Retromer-Komplex zur Umgehung des lysosomalen Abbaus und zur Aufrechterhaltung der Oberflächenexpression benötigen. Dazu gehörten zahlreiche Interaktionspartner von SNX27; darunter Glukose- und Ionentransporter sowie viele Signalrezeptoren [123].

1.4.2 SNX27-Retromer-Komplex

Das Retromer ist ein evolutionär konservierter Komplex, der als „Master-Regulator“ an multiplen Sortierungs-Ereignissen im endosomalen Netzwerk und damit an diversen physiologisch bedeutsamen Prozessen beteiligt ist [106, 128]. Während zunächst eine Funktion des Retromers beim retrograden Transport von Proteinen aus Endosomen zurück zum Golgi-Komplex beschrieben wurde [129], zeigen neuere Studien jedoch die hauptsächliche Funktion beim Recycling diverser Transmembranproteine zurück zur Plasmamembran [106, 130–132].

Bereits 1997 wurde das Retromer in *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt und ursprünglich als Multiproteinkomplex aus zwei Untereinheiten und insgesamt fünf Proteinen beschrieben [129]. Das für die Protein-Erkennung verantwortliche Kerngerüst besteht aus den vacuolar protein sorting(VPS)-Proteinen VPS26, VPS29 und VPS35. Einen weiteren Subkomplex bildet ein Heterodimer aus zwei Proteinen der Sorting Nexin-Familie, die an PI3P-reiche endosomale Membranen binden und eine

C-terminale Bin/Amphiphysin/Rvs(BAR)-Domäne besitzen (SNX1 bzw. SNX2 [133] und SNX5 bzw. SNX6 [134]). Die SNX-BAR-Proteine vermitteln eine Formation von Tubuli an der endosomalen Membran, welche die Sortierung von Proteinen in den Recyling-Weg begleiten oder sogar antreiben [131].

Temkin et al. beschrieben im Jahr 2011 eine indirekte Assoziation von SNX27 mit dem Retromer-Komplex (SNX27-Retromer, dargestellt in **Abbildung 4**) [135]. SNX27 interagiert über seine FERM-Domäne mit FAM21, der Untereinheit eines weiteren Retromer-assoziierten Proteinkomplexes (Wiskott-Aldrich syndrome protein and SCAR homolog, WASH) [132, 136]. Der WASH-Komplex ist in der Lage, verzweigte Aktin-Netzwerke auf Endosomen und darüber Aktin-stabilisierte Mikrodomänen zu bilden, in denen die Retromer-gebundenen Proteine verdichtet werden und diskrete endosomale Regionen für die Formation von Tubuli entstehen [130]. Darüber hinaus verhindert die FERM-vermittelte Interaktion von SNX27 mit dem WASH-Komplex den Transport gebundener Proteine zum Golgi-Apparat [132].
Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass SNX27 auch direkt über seine PDZ-Domäne an die Retromer-Untereinheit VPS26 und über die FERM-Domäne an die SNX-BAR-Proteine bindet [123]. Die Struktur der PDZ-Domäne ermöglicht außerdem die simultane Interaktion mit Proteinen, die ein PDZ-Bindemotiv besitzen [137]. Die VPS26-SNX27-Interaktion erhöht die Affinität der Bindung internalisierter Proteine und wird benötigt, um den lysosomalen Abbau von Proteinen zu verhindern [123, 137].

Eine Dysfunktion von SNX27 und des Retromers stehen in einem engen Zusammenhang mit diversen neurodegenerativen Erkrankungen und mit Diabetes mellitus [106, 137–140].
Folglich ist das SNX27-Retromer ein komplexes und physiologisch relevantes Gefüge, das aus verschiedenen Proteinen besteht. Der SNX27-Retromer-Komplex verhindert die lysosomale Degradation von Transmembranproteinen mit einem PDZ-Bindemotiv und ist für deren Recycling von Bedeutung.
Demzufolge besitzt SNX27 möglicherweise auch einen Einfluss auf das Recycling von DRA. Für die vorliegende Promotionsarbeit war in diesem Zusammenhang vor allem die PDZ-Interaktion von SNX27 und DRA von Interesse.

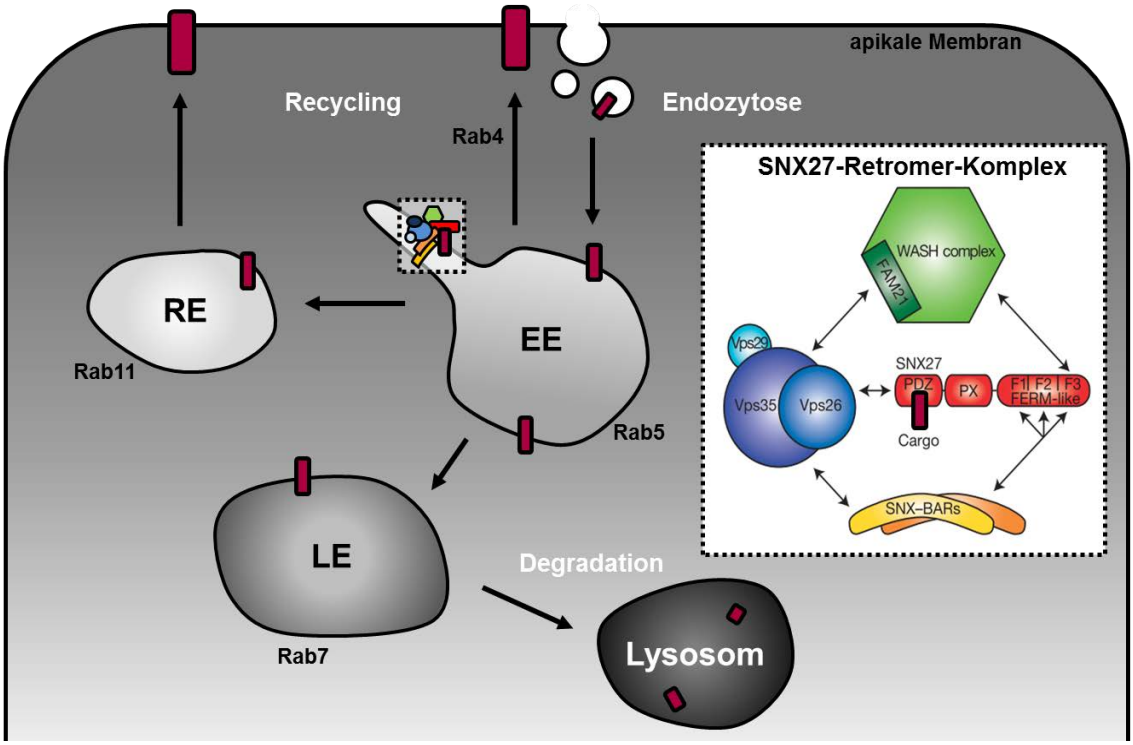


Abbildung 4: Intrazelluläres Trafficking und Recycling von Transmembranproteinen sowie die Beteiligung des Sorting Nexin 27(SNX27)-Retromer-Komplexes. Die Proteine werden durch Endozytose in die Zelle aufgenommen und in Rab5-positiven frühen Endosomen (early endosome, EE) sortiert. Frühe Endosomen können einerseits zu Rab7-positiven späten Endosomen (late endosome, LE) reifen, die schließlich mit Lysosomen fusionieren und zur Degradation der Proteine führen. Andererseits können die internalisierten Proteine auch über einen schnellen, Rab4-abhängigen Recycling-Weg oder Rab11-positive Recycling-Endosomen (RE) wieder in die Plasmamembran eingebaut werden. SNX27 verhindert als Teil des SNX27-Retromer-Komplexes den lysosomalen Abbau und ist am Recycling der Transmembranproteine beteiligt (Einzelheiten im Text) [eigene Abbildung, Vergrößerung zum SNX27-Retromer-Komplex modifiziert nach [123]].

2 Zielstellung

Der Cl^-/HCO_3^--Austauscher DRA vermittelt gemeinsam mit dem Na^+/H^+-Austauscher NHE3 die elektroneutrale Absorption von NaCl und folglich die Resorption von Wasser im Ileum und im proximalen Kolon. DRA bindet über sein C-terminales PDZ-Interaktionsmotiv an die PDZ-Adapterproteine der NHERF-Familie. Diese PDZ-Interaktionen beeinflussen die Lokalisation, das Trafficking und das Recycling von DRA und sind somit für die Regulation des Transporters essentiell.
In eigenen Vorarbeiten konnte das intrazelluläre Protein SNX27 als weiteres NHERF-Familienmitglied identifiziert werden, das mit seiner PDZ-Domäne an das PDZ-Interaktionsmotiv von DRA bindet. SNX27 ist ein strukturell einzigartiges Protein, das in frühen Endosomen lokalisiert ist und in Abhängigkeit seines Expressionsniveaus die Endozytose sowie den lysosomalen Abbau bzw. das Recycling seiner Bindungspartner beeinflusst. Als Bestandteil des SNX27-Retromer-Komplexes wurde SNX27 eine Rolle beim Recycling internalisierter Proteinen vom frühen Endosomen zur Plasmamembran zugeschrieben.

Basierend auf diesen Erkenntnissen aus der Literatur und den eigenen Vordaten zur strukturellen Interaktion von DRA und SNX27 sollte daher die funktionelle Bedeutung dieser Interaktion untersucht werden. Daraus haben sich folgende Fragestellungen ergeben, die anhand unterschiedlicher Zellkulturmodelle untersucht werden sollten:

Welchen Einfluss haben die Überexpression und der Knockdown (KD) von SNX27 auf die Aktivität von DRA?

Wie verändert sich die Oberflächenexpression von DRA bei diesen unterschiedlichen SNX27-Expressionsbedingungen?

An welcher Stelle des Recycling-Weges von DRA kommt es zu einer Colokalisation mit SNX27?

3 Material und Methoden

Die für die Durchführung der vorliegenden Promotionsarbeit standardmäßig verwendeten Chemikalien und Reagenzien [A1], Verbrauchsmaterialen [A2] und Geräte [A3] sind im Anhang aufgeführt. Darüber hinaus sind auch die Zusammensetzungen der mit einem Großbuchstaben versehenen Puffer und Gebrauchslösungen [A4] sowie die Darstellungen der verwendeten Vektoren [A5] im Anhang aufgelistet.

3.1 Klonierungsarbeiten

Das Ziel der in diesem Abschnitt beschriebenen Arbeiten war die Klonierung eines Konstruktes, das die induzierbare Expression von BFP(blue fluorescent protein)-markiertem SNX27 in einem geeigneten Zellmodell (EcR293-Zellen) ermöglicht. Die vollständige Sequenz (full-length) von SNX27 wurde mithilfe einer Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert und lag zu Beginn der Promotionsarbeiten bereits vor. Darüber hinaus wurde ein Vektor verwendet, aus dem die Sequenz für den BFP-Tag mithilfe eines Restriktionsverdaus isoliert wurde (pTagBFP-C, Evrogen, Moskau, Russland). Die Sequenzen von SNX27 und dem BFP-Tag wurden daraufhin in einen induzierbaren Expressionsvektor kloniert (pIND/Hygro, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Mit dem Konstrukt pIND[hygro]/BFP-SNX27 erfolgte schließlich die Transfektion der EcR293-Zellen [siehe 3.2.3]. In den folgenden Abschnitten sind die einzelnen Klonierungsschritte detailliert beschrieben.
Die Vektorkarten der verwendeten Ausgangsvektoren sind im Anhang [A5] einsehbar. Mithilfe der Software VectorNTI Advance (Version 11.5, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) wurden die einzelnen Klonierungsschritte zudem nachvollzogen und visualisiert.

3.1.1 Restriktionsverdau

Für den Verdau der Desoxyribonukleinsäure (DNA) an spezifischen Erkennungssequenzen wurden FastDigest®-Restriktionsenzyme (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) verwendet, die einen schnellen und vollständigen DNA-Verdau in einem universellen Puffer ermöglichen.
Der Verdau wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierzu wurden 2 µl des zehnfach konzentrierten FastDigest®-Puffers, 1 µg der Plasmid-DNA und 1 µl des jeweiligen FastDigest®-Restriktionsenzyms gemischt. Der Ansatz wurde mit Nuklease-freiem Wasser auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt und für 10 min in einem Heizblock

bei 37 °C inkubiert. Die Kontrolle des Restriktionsverdaus erfolgte schließlich mithilfe einer Agarose-Gelelektrophorese [siehe 3.1.2].

3.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der mittels Restriktionsspaltung verdauten DNA und damit zur Kontrolle der Klonierungsarbeiten wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Mithilfe der Gelelektrophorese erfolgte die Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe im elektrischen Feld und deren Visualisierung durch Färbung mit Ethidiumbromid.

Für die Herstellung 1 %iger Agarose-Gele wurden 0,5 g LE-Agarose durch Aufkochen in 50 ml 0,5-fachem Tris-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure(EDTA)-Puffer (TAE-Puffer [A]) gelöst und mit 2 µl Ethidiumbromid-Lösung versetzt. Die Gel-Lösung wurde in einen horizontalen Gelträger (Bio-Rad, München) gegossen, ein Probenkamm eingesetzt und das Gel nach dem Verfestigen in einer Elektrophoresekammer (DNA Sub Cell™, Bio-Rad, München) mit 0,5-fachem TAE-Puffer überschichtet. Die zu untersuchenden Proben wurden mit je 2 µl Ladepuffer [B] versetzt, bei konstanten 90 V aufgetrennt und mithilfe eines Geldokumentationssystems (UVsolo, Analytik Jena AG, Jena) unter UV-Licht visualisiert. Die Bestimmung der Fragmentgrößen erfolgte anhand eines Größenstandards (MassRuler Express Reverse DNA Ladder Mix, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

3.1.3 Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen

Um spezifische DNA-Fragmente zu isolieren, erfolgte eine Aufreinigung der DNA aus den Agarose-Gelen. Hierzu wurde das peqGOLD Gel Extraction Kit (PEQLAB Biotechnologie, Erlangen) nach Herstellerangaben eingesetzt. Das Gelstück mit der gewünschten DNA-Bande wurde dazu zügig und mit möglichst wenig überschüssiger Agarose mithilfe eines Skalpells unter UV-Licht aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und gewogen. Daraufhin wurde das Gelstück in einem entsprechenden Volumen an Bindepuffer bei 60 °C für 7 min im Heizblock gelöst. Die in der Lösung enthaltene DNA wurde anschließend durch eine Säule zentrifugiert und dadurch reversibel an eine Membran gebunden. Nach mehreren Waschschritten zur Entfernung von Agarose-Resten erfolgte die Elution der an die Säule gebundenen und gereinigten DNA mit deionisiertem Wasser.

3.1.4 Ligation

Die Ligation der DNA-Fragmente wurde mithilfe des Rapid DNA Ligation Kits (Roche, Mannheim) durchgeführt. Entsprechend des Herstellerprotokolls wurden die DNA von Vektor und Insert standardmäßig im Verhältnis 1:3 mit einfachem DNA-Verdünnungspuffer auf ein Volumen von 10 µl eingestellt. Daraufhin wurden 10 µl T4 DNA-Ligationspuffer und 1 µl T4 DNA-Ligase zugegeben, der Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und bis zur anschließenden Transformation kompetenter Bakterien [siehe 3.1.5] auf Eis gelagert. Zur Kontrolle wurde ebenfalls ein Ligationsansatz ohne Insert mitgeführt.

3.1.5 Transformation von kompetenten *Escherichia coli*

Für die Vermehrung der Plasmid-DNA wurden *Escherichia coli* (*E. coli*) mittels Hitzeschock transformiert. Dazu wurden hocheffiziente, kompetente NEB® 5-alpha *E. coli* (New England Biolabs, Frankfurt am Main) eingesetzt. Zu 50 µl der Bakterien wurden 2 µl der ligierten Plasmid-DNA pipettiert und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgten der Hitzeschock für 30 s bei 42 °C und eine weitere Inkubation für 5 min auf Eis. Nach der Zugabe von 950 µl SOC Outgrowth Medium (New England Biolabs, Frankfurt am Main) wurden die transformierten *E. coli* für 1 h bei 37 °C und 300 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension auf Selektionsantibiotika-haltigen Agar-Platten [C] ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die Agar-Platten mit den Bakterienkolonien wurden mit Parafilm verschlossen und konnten so für mehrere Wochen bei 4 °C aufbewahrt werden.

3.1.6 Isolation von Plasmid-DNA

Für die Isolation der Plasmid-DNA aus den transformierten Bakterien wurde eine modifizierte alkalische Lyse durchgeführt, die bereits 1979 von Birnboim und Doly beschrieben wurde [141]. Bei dieser Methode werden die Bakterien zunächst in einem Glukose-haltigen Puffer resuspendiert. Anschließend erfolgen die alkalische Lyse und die Denaturierung der Bakterieneiweiße durch einen zweiten Puffer, der Natriumdodecylsulfat (SDS) und Natriumhydroxid enthält. Ein dritter Puffer mit Kaliumacetat und Essigsäure dient der Neutralisation und führt zu einer Ausfällung der Bakterieneiweiße sowie des bakteriellen Chromosoms zusammen mit Kaliumhydroxid. In einem letzten Schritt wird die Plasmid-DNA mithilfe von Isopropanol ausgefällt und kann so isoliert werden.

Dieses Prinzip wurde durch die Verwendung des QIAfilter Plasmid Purification Midi Kits (Qiagen, Hilden) umgesetzt. Nach Angaben des Herstellers wurden hierfür zunächst 100 ml LB-Medium, das entsprechende Selektionszusätze enthielt [D], mit den Bakterien inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 6.000 x g pelletiert und anschließend lysiert. Daraufhin wurde das Lysat durch Filtration geklärt und die Plasmid-DNA an ein Anionen-Austauscher-Harz gebunden. RNA, Proteine und Verunreinigungen wurden durch einen Waschpuffer entfernt und die DNA durch einen Elutionspuffer eluiert. Mithilfe einer Isopropanol-Präzipitation erfolgte schließlich die Konzentrierung und Entsalzung der Plasmid-DNA. Die Konzentration und die Reinheit der isolierten Plasmid-DNA wurden mithilfe eines NanoPhotometers (P330, Implen, München) durch Messung der UV-Absorptionen bei 260 nm bzw. 280 nm bestimmt.

3.1.7 Anlegen von Glycerol-Stocks

Die dauerhafte Aufbewahrung der transformierten Bakterien erfolgte mittels Glycerol-Stocks. Hierzu wurden 10 ml LB-Medium, das einen entsprechenden Selektionszusatz enthielt [D], mit der Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Bakterien-Suspension wurde am Folgetag für 10 min bei 4.000 x g zentrifugiert und das Pellet in 1,6 ml frischem LB-Medium resuspendiert. Jeweils 800 µl der Bakterien-Suspension wurden in ein Kryoröhrchen gegeben und mit je 200 µl sterilem Glycerol versetzt. Die Aufbewahrung der Glycerol-Stocks erfolgte bei -80 °C.

3.2 Zellbiologische Arbeiten

Die im Rahmen der Promotion durchgeführten Experimente zur Untersuchung des Einflusses von SNX27 auf die Funktion von DRA erfolgten *in vitro* in Zelllinien. In den folgenden Abschnitten sind die verwendeten Zelllinien und die zellbiologischen Arbeiten detailliert beschrieben.

3.2.1 Verwendete Zelllinien

Für die im Folgenden beschriebenen Versuche wurden unterschiedliche adhärente Zelllinien verwendet, die in **Tabelle 1** aufgelistet sind.
Zum einen wurden humane Nierenepithelzellen (HEK293-Zellen) genutzt, die eine stabile Expression eines modifizierten Ecdyson-Rezeptors aufweisen und darüber einen optimierten Ecdyson-abhängigen Promotor regulieren (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA). Die Zellen werden daher auch als EcR293-Zellen bezeichnet. Dieses Expressionssystem ermöglicht eine induzierbare Expression von rekombi-

nanten Proteinen durch die Zugabe von Ponasteron A (PonA, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) zum Kulturmedium, einem Analogon des Insekten-Steroidhormons Ecdyson [142, 143]. EcR293-Zellen stellen eine geeignete Modellzelllinie für die Untersuchungen dar, da DRA im Vergleich zu anderen Zelllinien endogen nur sehr gering, exogen (transfiziert) jedoch gut in diesen Zellen exprimiert und funktionell untersucht werden kann [48].

Zum anderen wurden intestinale Epithelzellen verwendet, die ursprünglich aus einem Adenokarzinom des Kolons isoliert wurden (Caco2-Zellen). Bei Caco2-Zellen handelt es sich um eine etablierte Modellzelllinie zur Untersuchung der Barriere- und Transporteigenschaften des Darms. Diese Zellen besitzen die besondere Fähigkeit, nach dem Erreichen der Konfluenz spontan zu differenzieren und weisen Dünndarm-ähnliche Eigenschaften von Enterozyten mit einem Bürstensaum auf [144].

Die Caco2-Zellen sind aufgrund ihrer komplexeren Eigenschaften schwierig zu handhaben und für die funktionellen Versuche weniger geeignet als transfizierte HEK293- bzw. EcR293-Zellen. Allerdings eignet sich diese intestinale Epithelzelllinie besonders für die Untersuchungen der Lokalisation und Colokalisation von DRA und SNX27. Bei den in dieser Arbeit verwendeten 4C4-Zellen handelt es sich um einen speziellen Caco2-Zellklon, der stabil das regulierbare Tet-Off®-Genexpressionssystem (Clontech Laboratories, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) [145] für die induzierbare Expression entsprechender Konstrukte exprimiert. Diese Zellen wurden von Le Shen aus der Arbeitsgruppe von Jerrold R. Turner entwickelt und waren zu Beginn der eigenen Arbeiten bereits G418- und Zeocin-resistent [17, 146].

Die zu Beginn der Arbeiten zur Verfügung gestellten EcR293- und 4C4-Zellen wiesen bereits eine stabile Expression von grün fluoreszierendem EGFP(enhanced green fluorescent protein)-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus auf. Bei diesem letztgenannten Konstrukt handelt es sich um das Transportprotein mit einer Deletion der vier C-terminalen Aminosäuren (ETKF), die ein PDZ-Interaktionsmotiv darstellen. Die mutierte Form des Anionenaustauschers ohne PDZ-Interaktionsmotiv stellt somit eine spezifische Kontrolle für die Untersuchung der PDZ-Interaktionen von DRA dar [13].

Durch das Tet-Off®-Genexpressionssystem ließ sich die Genexpression der Konstrukte EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus in den verwendeten 4C4-Zelllinien durch die Zugabe des Tetracyclin-Derivats Doxycyclin zum Zellkulturmedium reprimieren. Dementsprechend erfolgte eine Induktion der Expression nach dem Entfernen des Doxycyclins aus dem Medium.

In den EcR293-Zellen wurde nach Transfektion zusätzlich stabil und durch PonA induzierbar BFP-SNX27 exprimiert bzw. ein Knockdown des Proteins (SNX27 KD) herbeigeführt.

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien.

Bezeichnung	Eigenschaften und Verwendung
EcR293/EGFP-DRA EcR293/EGFP-DRA-ETKFminus	HEK293-Zellen mit stabiler Expression von EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus Kontroll-Zelllinien mit endogener Expression von SNX27 und Ausgangs-Zelllinien für die Transfektion mit BFP-SNX27 [3.2.3] und mit shRNA für den SNX27 KD [3.2.4]
EcR293/EGFP-DRA/BFP-SNX27 EcR293/EGFP-DRA-ETKFminus/BFP-SNX27	HEK293-Zellen mit stabiler Expression von EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus und zusätzlich von induzierbarem BFP-SNX27 [3.2.3] Untersuchung der Funktion von DRA mittels Fluorometrie [3.5] und Expression in der Plasmamembran mittels Oberflächenbiotinylierung [3.4.6] unter Einfluss einer induzierbaren SNX27-Expression
EcR293/EGFP-DRA/SNX27 KD EcR293/EGFP-DRA-ETKFminus/SNX27 KD	HEK293-Zellen mit stabiler Expression von EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus und zusätzlich von shRNA, die einen SNX27 KD vermittelt Untersuchung der Funktion von DRA mittels Fluorometrie [3.5] und Expression in der Plasmamembran mittels Oberflächenbiotinylierung [3.4.6] unter Einfluss eines SNX27 KD
4C4/EGFP-DRA 4C4/EGFP-DRA-ETKFminus	Caco2-Zellen mit stabiler und induzierbarer Expression von EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus Immunfluoreszenzfärbungen zur Untersuchung der Lokalisation von endogenem SNX27 und der Colokalisation mit DRA [3.4.5 und 3.6]

3.2.2 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter Standardbedingungen bei 37 °C und 5 % CO_2 im Brutschrank. Alle zwei bis drei Tage erfolgte ein Mediumwechsel.

3.2.2.1 Kultivierung der EcR293-Zellen

Für die Kultivierung der EcR293-Zellen wurde ein standardisiertes Medium mit Glukose und ohne L-Glutamin (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Lonza, Verviers,

Belgien) verwendet. Neben 10 % (v/v) fetalem Kälberserum (FBS Superior, Biochrom, Berlin) und 0,5 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) enthielt das Zellkulturmedium auch 400 µg/ml Zeocin (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) und 400 µg/ml G418-BC (Biochrom, Berlin) als Selektionszusätze. Das Passagieren der Zellen erfolgte mithilfe von 0,05 %igem Trypsin-EDTA (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Nach einem kurzen Spülen des Zellrasens mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS, ohne $CaCl_2$ und $MgCl_2$) wurde das Trypsin auf die Zellen gegeben und für 1 min bei RT inkubiert. Das Trypsin wurde daraufhin abgenommen und die Zellen für einige weitere Minuten inkubiert, bis der Zellrasen anfing, sich vom Boden der Zellkulturflaschen zu lösen. Anschließend wurden die Zellen in frischem Kulturmedium aufgenommen und in neue Zellkulturflaschen überführt.

3.2.2.2 Kultivierung der 4C4-Zellen

Die 4C4-Zellen wurden in DMEM mit Glukose und mit L-Glutamin (Lonza, Verviers, Belgien) kultiviert, dem 10 % (v/v) FBS und 0,5 % (v/v) Penicillin/Streptomycin beigefügt wurden. Zusätzlich enthielt das Medium 250 µg/ml G418-BC, 50 µg/ml Zeocin und 200 µg/ml Hygromycin B-Lösung (Carl Roth, Karlsruhe) als Selektionsmarker für EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus. Die Expression der Zielgene wurde durch die Zugabe von 50 ng/ml Doxycyclin-Hyclat (Sigma-Aldrich, Steinheim) unterdrückt. Für ein Anschalten der Expression von EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus wurde das Doxycyclin aus dem Zellkulturmedium entfernt. Die Subkultivierung der 4C4-Zellen erfolgte mithilfe von 0,25 %igem Trypsin-EDTA (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), das nach einem kurzen Spülen mit PBS (ohne $CaCl_2$ und $MgCl_2$) für 3 min auf die Zellen gegeben und im Brutschrank inkubiert wurde. Nach dem Abnehmen des Trypsins wurden die Zellen für einige weitere Minuten bei 37 °C inkubiert, bis sich der Zellrasen ablöste. Anschließend wurden die Zellen in frischem Medium aufgenommen und in neue Zellkulturflaschen überführt.

3.2.2.3 Einsaat von Zellen

Für die Einsaat einer definierten Zellzahl wurden die Zellen wie oben beschrieben abgelöst, in frischem Medium aufgenommen und die Zellsuspension 1:10 mit Trypanblau verdünnt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte daraufhin in einer Neubauer-Zählkammer (Neubauer improved, Kammertiefe 0,1 mm, Fläche eines Großquadrates 1 mm^2, Marienfeld-Superior, Königshofen) anhand untenstehender Formel. Das

entsprechende Volumen der Zellsuspension wurde in frischem Medium aufgenommen und die Zellen wie unter 3.2.2.1 bzw. 3.2.2.2 beschrieben kultiviert.

$$\frac{Zellen}{ml} = Anzahl\ der\ Zellen * Verdünnungsfaktor * \frac{10^4}{ml}$$

3.2.2.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um Zellkulturen dauerhaft aufzubewahren, wurden sie in Flüssigstickstoff eingefroren. Dazu wurden die Zellen zunächst mittels Trypsin abgelöst [siehe 3.2.2.1 bzw. 3.2.2.2] und die Zellzahl mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Parallel wurde die Zellsuspension bei 1.200 x g für 6 min zentrifugiert und das Medium verworfen. Jeweils 5 - 8 x 10^6 Zellen wurden in 1 ml Einfriermedium [E] aufgenommen. Die Zellsuspension wurde daraufhin in Kryoröhrchen überführt, kontrolliert über Nacht bei -80 °C in Isopropanol-gefüllten Gefrierbehältern eingefroren und am Folgetag für die dauerhafte Aufbewahrung in Flüssigstickstoff-gefüllte Tanks überführt.
Das Auftauen der Zellen erfolgte zügig im Wasserbad bei 37 °C. Die aufgetaute Zellsuspension wurde in 5 ml Zellkulturmedium aufgenommen und bei 1.200 x g für 6 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und die Zellsuspension in eine 25 cm^2-Zellkulturflasche überführt. Am nächsten Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und die Zellen daraufhin wie oben beschrieben [3.2.2.1 bzw. 3.2.2.2] kultiviert.

3.2.3 Induzierbare Expression von BFP-SNX27 in EcR293-Zellen

In den folgenden Abschnitten wird die Generierung stabil BFP-SNX27-exprimierender Zelllinien beschrieben. Dazu wurden EcR293-Zellen transfiziert und mithilfe der Durchflusszytometrie sortiert. Anschließend wurden durch Kultivierung der transfizierten Zellen in einem Selektionsmedium und Isolation einzelner Zellklone Zelllinien monoklonalen Ursprungs gewonnen und charakterisiert. Die Expression von BFP-SNX27 konnte in diesen Zellen reguliert werden.

3.2.3.1 Transfektion

Um induzierbares BFP-SNX27 zusätzlich zu EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus in EcR293-Zellen zu exprimieren, wurden die Zellen mit dem zuvor klonierten Konstrukt pIND[hygro]/BFP-SNX27 [siehe 3.1] transfiziert. Das Einbringen der Plasmid-DNA in die Zellen erfolgte mithilfe der liposomalen Transfektion (Lipofektion). Hierfür wurden am Vortag 1 x 10^6 Zellen/Well in eine 6-Well-Platte eingesät und vor der Transfektion mit 2 ml frischem Medium versetzt. Pro Well wurden 2 µg der Plasmid-DNA mit Trans-

fektionsmedium (Opti-MEM®, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) auf ein Volumen von 100 µl eingestellt. Parallel wurden in einem zweiten Versuchsansatz pro Well 6 µl TurboFectin 8.0 (OriGene Technologies, Rockville, Maryland, USA) mit 94 µl Opti-MEM® versetzt und für 5 min inkubiert. Daraufhin wurden beide Ansätze gemischt und für weitere 15 min inkubiert. Anschließend erfolgte die tropfenweise Zugabe von je 200 µl des DNA-Lipid-Gemisches auf die Zellen. Als Kontrolle wurden Zellen ohne Plasmid-DNA und ausschließlich mit den Transfektionsreagenzien behandelt. Der Transfektionserfolg wurde zwei Tage nach der Transfektion mikroskopisch anhand der spezifischen blauen Fluoreszenz des Fusionsproteins BFP-SNX27 begutachtet. Zusätzlich wurde die spezifische grüne Fluoreszenz der Fusionsproteine EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus dokumentiert.

3.2.3.2 Zellsortierung

Zwei Tage nach der Transfektion wurde mit Unterstützung der Core Facility für Zellsortierung und Zellanalyse der Universitätsmedizin Rostock (Leiterin Prof. Dr. Brigitte Müller-Hilke, Institut für Immunologie) von Dr. Robby Engelmann eine Einzelzellsortierung durchgeführt. Dazu wurden die Zellen wie unter 3.2.2.1 beschrieben abgelöst, in 2 % (v/v) FBS-haltigem PBS aufgenommen und mithilfe eines Zellsiebs vereinzelt. Die durchflusszytometrische Analyse und Sortierung der Zellen erfolgte daraufhin mithilfe des FACSAria II Cell Sorters (BD Biosciences, San José, Kalifornien, USA) und der FACSDiva-Software (Version 6.1.2, BD Biosciences, San José, Kalifornien, USA). Schein-transfizierte Zellen, die ohne Plasmid-DNA behandelt wurden, dienten als Kontrolle. In den transfizierten Zellen erfolgten die Bestimmung der Transfektionseffizienz und anschließend die Sortierung der stark positiv BFP-exprimierenden Zellen. Die Zellsortierung wurde mit folgenden Einstellungen durchgeführt: 100 µm Nozzle bei 20 psi Druck und „single cells“ als Sortierungsmaske. Mit diesen Einstelllungen wurden 20 Zellen/Well in 24-Well-Platten sortiert und für die Generierung stabil BFP-SNX27 exprimierender Zellklone wie im folgenden Abschnitt beschrieben in Hygromycin B-haltigem Selektionsmedium kultiviert.

3.2.3.3 Generierung und Charakterisierung stabiler Zellklone

Im Anschluss an die Einzelzellsortierung erfolgte eine Selektion der transfizierten Zellen mit Hygromycin B-haltigem Medium. Alle zwei bis drei Tage wurde das Medium gewechselt, bis makroskopisch sichtbare Zellklone wuchsen. Die Zellklone wurden daraufhin mithilfe von Klonierungszylindern (Scienceware® cloning cylinders, Polystyrol, 6,4 x 8 mm, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) isoliert. Dazu wurden die Klonierungszylinder mithilfe von sterilem Silikon (Dow Corning® high-vacuum silicone

grease, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) um den Zellklon auf der Zellkulturplatte fixiert. Das Medium wurde abgenommen, Reste durch kurzes Spülen mit PBS entfernt und die Zellen mithilfe von Trypsin wie unter 3.2.2.1 beschrieben abgelöst. Der Zellklon wurde in frischem Medium aufgenommen und in ein neues Well einer 24-Well-Platte überführt. Anschließend wurde die monoklonale Zelllinie in Hygromycin B-haltigem Medium expandiert.

Es folgte eine Charakterisierung der Zellklone hinsichtlich der Gen- und Proteinexpression von BFP-SNX27 und EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) [3.3], Western Blot [3.4.1 bis 3.4.4] sowie Fluoreszenzmikroskopie [3.6]. Darüber hinaus wurde die Funktionalität der Zelllinien mittels Fluorometrie gemessen [3.5]. Mithilfe dieser Untersuchungen wurden zwei monoklonale Zelllinien (EcR293/EGFP-DRA/BFP-SNX27 und EcR293/EGFP-DRA-ETKFminus/BFP-SNX27) für die weiteren Untersuchungen ausgewählt.

3.2.3.4 Induktion der Proteinexpression mittels Ponasteron A

Die Expression von BFP-SNX27 wurde in den transfizierten EcR293-Zellen durch das Ecdyson-Analogon PonA induziert. Dazu wurde PonA in zunächst unterschiedlichen Konzentrationen (0 - 10 µM) zu dem Zellkulturmedium gegeben und die Gen- sowie Proteinexpression von BFP-SNX27 mittels qPCR [3.3] und Western Blot [3.4.1 bis 3.4.4] quantifiziert. Weiterhin wurde mithilfe dieser Methoden auch untersucht, ob PonA einen Einfluss auf die Gen- und Proteinexpression von EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus besitzt. Das Ziel dieser Konzentrationstestungen war einerseits, eine geeignete PonA-Konzentration zu finden, die nur eine leichte Überexpression hervorruft und damit so gut wie möglich die physiologische SNX27-Expression abbildet. Andererseits sollte mithilfe einer weiteren, höheren PonA-Konzentration eine mäßige Überexpression induziert werden, um mögliche Unterschiede zwischen endogenen Bedingungen und Überexpressionsbedingungen zu untersuchen. Darüber hinaus sollten die gewählten Konzentrationen eine vergleichbare Expression von BFP-SNX27 in den beiden Zelllinien EcR293/EGFP-DRA/BFP-SNX27 und EcR293/EGFP-DRA-ETKFminus/BFP-SNX27 hervorrufen.

3.2.4 Knockdown von SNX27

Für den KD von SNX27 wurde short hairpin RNA (shRNA) eingesetzt. Die doppelsträngige shRNA stellt einen Auslöser der sogenannten RNA-Interferenz (RNAi) dar, einem natürlichen genregulatorischen Mechanismus zur sequenz-spezifischen Abschaltung von Genen [147]. Dazu wird die shRNA ausgehend von einem DNA-Konstrukt, das mithilfe eines Vektors in den Zellkern transportiert wird, innerhalb der

Zelle transkribiert. Das *gene silencing* erfolgt schließlich durch eine Spaltung und Degradierung der entsprechenden Boten-RNA (messenger RNA, mRNA) [147].
Der SNX27 KD wurde mithilfe der shERWOOD-UltramiR shRNA (Lentiviral Target Gene Set in pZIP, transOMIC Technologies, Huntsville, Alabama, USA) umgesetzt. Die Bereitstellung der shRNA erfolgte über den Vektor pZIP, der einen humanen Zytomegalievirus(CMV)-Promotor enthält und konstitutiv neben der shRNA auch einen Fluoreszenzmarker (red fluorescent protein, RFP) sowie eine Puromycin-Kassette als Selektionsmarker exprimiert (pZIP-hCMV-RFP-Puro [A5]). Im Lieferumfang des Herstellers waren ein Gen-Set, bestehend aus drei unterschiedlichen Konstrukten, sowie eine nicht-bindende Kontrolle (non-targeting control, NTC) enthalten. Die Transfektion der Zelllinien EcR293/EGFP-DRA und EcR293/EGFP-DRA-ETKFminus mit den Vektoren wurde analog zu dem unter 3.2.3.1 beschriebenen Versuchsablauf durchgeführt. Zwei Tage später wurde der Transfektionserfolg anhand der RFP-Expression mikroskopisch begutachtet und eine Selektion erfolgreich transfizierter Zellen mithilfe von Puromycin-haltigem Zellkulturmedium (Enzo Life Sciences, Lörrach) vorgenommen. Die erhaltenen polyklonalen Zelllinien wurden hinsichtlich ihrer SNX27-Gen- [3.3] und Proteinexpression [3.4.4] untersucht und die Zelllinie mit dem stärksten erzielten SNX27 KD für die weiteren Versuche verwendet.

3.3 Genexpressionsanalysen

Die Untersuchungen der SNX27- und DRA-Genexpression erfolgten mithilfe der qPCR. Hierfür waren zuvor eine Isolation der RNA aus den Zellen sowie das Umschreiben der RNA in komplementäre DNA (cDNA) notwendig.

3.3.1 Isolation von RNA aus Zellen

Die Isolation von RNA für Untersuchungen der Genexpression erfolgte drei Tage (EcR293-Zellen) bzw. elf Tage (4C4-Zellen) nach der Einsaat von 1 x 10^6 Zellen/Well in eine 6-Well-Platte. Für die Lyse der Zellen wurde pro Well 1 ml TRIzol Reagenz (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) auf den Zellrasen gegeben und die Zellen nach einer 10-minütigen Inkubation in 2 ml Eppendorf-Gefäße überführt. Daraufhin wurden 200 µl Chloroform zugegeben, die Zellsuspension kurz geschwenkt und für 2 min inkubiert. Es folgte eine Phasentrennung durch Zentrifugation bei 12.000 x g und 4 °C für 15 min. Anschließend wurde die obere Phase vorsichtig in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit dem gleichen Volumen an eiskaltem Isopropanol versetzt, wodurch die Präzipitation der RNA erfolgte. Nach einer Inkubation von 10 min erfolgte eine weitere Zentrifugation bei

12.000 x g und 4 °C für 10 min. Der Überstand wurde verworfen, das RNA-Pellet mit 1 ml eiskaltem, 75 %igem (v/v) Ethanol gewaschen und bei 7.500 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Daraufhin wurde das Pellet für etwa 8 min getrocknet, in einem geeigneten Volumen Nuklease-freiem Wasser resuspendiert und durch eine Inkubation von 10 min bei 56 °C gelöst. Die Bestimmung der Konzentration und der Reinheit der isolierten RNA erfolgte schließlich mithilfe eines NanoPhotometers (P330, Implen, München) durch Messung der UV-Absorptionen bei 260 nm bzw. 280 nm. Die RNA wurde bei -80 °C gelagert.

3.3.2 cDNA-Synthese

Die isolierte Gesamt-RNA wurde anschließend mithilfe des High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) nach Angaben des Herstellers in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Dieser Prozess wird auch als Reverse Transkription bezeichnet.

Dafür wurden 2 µg der isolierten RNA mit Nuklease-freiem Wasser auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt und mit 10 µl des zuvor auf Eis pipettierten zweifachen Reaktionsansatzes versetzt [siehe **Tabelle 2**]. Nach einem kurzen Mischen und Zentrifugieren erfolgte die cDNA-Synthese nach dem in **Tabelle 3** dargestellten Schema im Thermo-Cycler (PTC-200, MJ Research, St. Bruno (Quebec), Kanada). Die cDNA wurde für die anschließende qPCR auf Eis gelagert oder bei -20°C aufbewahrt.

Tabelle 2: Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese.

Reagenz	**Volumen [µl]**
10 x RT-Puffer	2,0
25 x dNTP Mix (100 mM)	0,8
10 x RT-Random Primer	2,0
MultiScribe Reverse Transkriptase (50 U/µl)	1,0
Nuklease-freies Wasser	4,2
Gesamtansatz	**10,0**

Tabelle 3: Temperaturprotokoll für die cDNA-Synthese.

	Schritt 1	**Schritt 2**	**Schritt 3**	**Schritt 4**
Temperatur	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
Zeit	10 min	120 min	5 min	∞

3.3.3 Nachweis von Genen mittels quantitativer Echtzeit-PCR

Für den gezielten, sehr sensitiven und quantitativen Nachweis von Genen wurde eine qPCR durchgeführt. Hierzu wurden TaqMan® Genexpressions-Assays (SNX27: Hs00930622_m1 bzw. DRA: Hs00995363_m1, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) verwendet. Die TaqMan®-Assays bestehen aus PCR-Primern und einer TaqMan®-Sonde, die am 5'-Ende mit einem FAM®-Fluoreszenzfarbstoff und am 3'-Ende mit einem nicht-fluoreszierenden Quencher markiert ist.

Von der zuvor gewonnenen und 1:20 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnten cDNA wurden 3 µl (≙ 15 ng) für die qPCR eingesetzt. Die cDNA wurde zusammen mit dem TaqMan®-Mastermix (TaqMan® 2x Universal PCR Master Mix No AmpErase® UNG, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) und dem jeweiligen TaqMan®-Assay in eine MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) pipettiert [siehe **Tabelle 4**] und mit einer Klebefolie verschlossen. Die Bestimmung der Genexpression erfolgte in Duplikaten. Als interner Standard wurde das Haushaltsgen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, TaqMan®-Assay Hs99999905_m1, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) eingesetzt. Die Amplifizierung der cDNA mittels qPCR erfolgte am ViiA7® Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Im Anschluss wurde eine Quantifizierung der Genprodukte mithilfe der $2^{-\Delta\Delta cT}$-Methode durchgeführt.

Tabelle 4: Reaktionsansatz für die quantitative Echtzeit-PCR.

Reagenz	Volumen [µl]
TaqMan®-Mastermix	6,250
TaqMan®-Assay	0,625
Nuklease-freies Wasser	3,125
Gesamtansatz	**10,0**

3.4 Proteinanalytische Methoden

Für den gezielten Nachweis von Proteinen aus komplexen Proteingemischen wurde eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit anschließendem Western Blot durchgeführt. Diese Methode erlaubte den zugleich qualitativen und quantitativen Protein-Nachweis mithilfe spezifischer Antikörper.

3.4.1 Herstellung von Zelllysat

Für den Proteinnachweis aus Zellen wurde im Vorfeld ein Lysat hergestellt. Hierfür wurden drei Tage zuvor je 1 x 10^6 Zellen/Well in 6-Well-Platten eingesät und der Zellrasen zunächst mit PBS gespült. Anschließend wurden 450 µl 1 % (v/v) Triton X-100 in Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS) [F] sowie 50 µl zehnfach konzentrierter Protease-Inhibitor (cOmplete Mini, EDTA-free, Roche, Mannheim) zu den Zellen gegeben, diese mit einem Zellschaber abgelöst und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die Zellen wurden mechanisch mithilfe einer Feindosierungsspritze aufgeschlossen, indem die Zellsuspension für 3 min auf Eis auf- und abgezogen wurde. Abschließend wurde ein proteinhaltiger Überstand durch Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 10.000 x g gewonnen und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Das Lysat wurde im Folgenden für eine Bestimmung der Proteinkonzentration weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert.

3.4.2 Proteinbestimmung und Probenvorbereitung

Die Bestimmung der Konzentrationen der Proteinlysate erfolgte mithilfe eines Standards aus bovinem Serumalbumin (BSA). Hierzu wurde eine BSA-Standardreihe (0 - 25 µg/ml) angefertigt und 4:1 mit Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad, München) versetzt. Die Proteinlysate wurden 1:200 mit destilliertem Wasser (A. dest.) verdünnt und ebenfalls 4:1 mit dem Protein-Assay-Reagenz gemischt. Jeweils 100 µl der verdünnten Proben bzw. des BSA-Standards wurden in einer Dreifachbestimmung in eine 96-Well-Platte pipettiert und für 5 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 600 nm am GloMax®-Multi Detection System (Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA). Anhand der Standardreihe wurden eine Eichkurve erstellt und die Konzentrationen der untersuchten Proteinlysate ermittelt. Die Proben wurden entsprechend ihrer Konzentration mit zweifach bzw. vierfach konzentriertem SDS-haltigen Probenpuffer [G] auf eine definierte Proteinmenge von 40 µg eingestellt und mit einfachem Probenpuffer auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt. Abschließend wurden die Proben für 5 min bei 95 °C in einem Heizblock denaturiert.

3.4.3 SDS-PAGE

Mithilfe der SDS-PAGE wurden die Proteingemische gelelektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Hierzu wurden zunächst diskontinuierliche Gele, bestehend aus einem Trenn- und einem Sammelgel, hergestellt. Die Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele ist in **Tabelle 5** zusammengefasst. Für eine optimale

elektrophoretische Auftrennung der zu untersuchenden Proteine wurden Trenngele mit einem Acrylamidgehalt von 8 - 12 % gefertigt. Nach dem Zusammenfügen der einzelnen Reagenzien des Trenngels wurde die Gel-Lösung in eine vertikale Apparatur aus zwei Glasplatten (Mini-PROTEAN® Tetra Electrophoresis System, Bio-Rad, München) gegossen und bis zur vollständigen Polymerisation mit Isopropanol überschichtet. Danach wurde ein grobporiges Sammelgel hergestellt, auf das Trenngel gegossen und der Probenkamm eingesetzt. Anschließend wurden die Gele in die mit Elektrophoresepuffer [H] gefüllte Bio-Rad-Kammer (Mini-PROTEAN® Tetra Electrophoresis Cell, Bio-Rad, München) gesetzt, die Probenkämme entfernt und die Proben aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteingemische erfolgte pro Gel bei konstanten 10 mA im Sammelgel und 20 mA im Trenngel. Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurde ein Western Blot durchgeführt [3.4.4].

Tabelle 5: Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele.

Trenngel	**8 %**	**10 %**	**12 %**	**Sammelgel**	
A. dest.	5,34 ml	5,43 ml	4,40 ml	A. dest.	1,91 ml
Trenngelpuffer [I]	2,48 ml	2,48 ml	2,48 ml	Sammelgelpuffer [J]	0,78 ml
Acrylamid, 40 % (v/v)	2,01 ml	2,48 ml	2,97 ml	Acrylamid, 40 % (v/v)	0,38 ml
APS, 10 % (w/v)	60,00 µl	60,00 µl	60,00 µl	APS, 10 % (w/v)	11,25 µl
TEMED	6,00 µl	6,00 µl	6,00 µl	TEMED	3,75 µl

3.4.4 Western Blot und Immundetektion von Proteinen

Die im Vorfeld durch die SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennten Proteine wurden mittels Western Blot auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran transferiert und dort durch spezifische Antikörper nachgewiesen. Hierzu wurde das Tank-Blot-Verfahren angewandt, das einen schonenden und sehr effizienten Transfer ermöglicht und auch für die Detektion großer Proteine geeignet ist [148].

Zunächst wurde die PVDF-Membran (Immobilon®-FL, Porengröße 0,45 µM, Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) für 15 s in Methanol geschwenkt und in A. dest. äquilibriert. Der Blot-Stapel wurde daraufhin wie im Folgenden beschrieben in Transferpuffer [K] schwimmend aufgebaut: die Gel-Halte-Kassette wurde mit der grauen Seite nach unten positioniert und ein zuvor in Transferpuffer getränkter Schwamm, ein Filterpapier, das Gel, die PVDF-Membran, wiederum ein Filterpapier und ein Schwamm darauf gestapelt. Nach dem Verschließen der Kassette wurde diese in ein vertikales Modul eingesetzt und mit der Membran-Seite zur Anode ausgerichtet in die mit Transferpuffer befüllte Trans-Blot-Kammer (Mini-PROTEAN® Tetra Trans-Blot Cell, Bio-Rad, München) gestellt. Zusätzlich wurden eine Kühleinheit und ein Magnetrühr-

stäbchen in den Tank gegeben. Das Rühren diente einer gleichmäßigen Temperatur- und Ionenverteilung des Puffers im Tank. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die PVDF-Membran erfolgte über Nacht bei 4 °C und konstanten 30 V.

Am nächsten Morgen wurde das Blot-Sandwich auseinandergebaut und die PVDF-Membran zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für 1 h bei RT in Blocking-Puffer (1:3 in PBS, Rockland Immunochemicals, Limerick, Pennsylvania, USA) inkubiert. Daraufhin erfolgte die Inkubation der Membran mit den Primär-Antikörpern [siehe **Tabelle 6**] für 4 h bei RT. Da die gegen EGFP und SNX27 gerichteten Antikörper beide aus der Maus stammten, wurde die Membran zuvor anhand des Größenstandards (Protein Marker VI (10 - 245) prestained, AppliChem, Darmstadt) bei etwa 100 kDa zerschnitten. Der Blot wurde anschließend mindestens fünf Mal für 5 min mit 0,1 % (v/v) Tween-20 in PBS gewaschen und für 30 min bei RT mit den fluoreszierenden Sekundär-Antikörpern [siehe **Tabelle 6**] inkubiert. Nach einem weiteren Waschvorgang wurde die Membran mit PBS gespült. Abschließend wurden die Proteine mithilfe der Image Studio-Software (Version 5.2.5, LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA) am Odyssey® CLx Imaging-System (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA) detektiert. Die Quantifizierung erfolgte ebenfalls mithilfe der Image Studio-Software bzw. mit ImageJ (Version 1.46r, Rasband WS, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

Tabelle 6: Für den Western Blot verwendete Primär- und Sekundär-Antikörper.

Primär-Antikörper	Verdünnung	Sekundär-Antikörper	Verdünnung
anti-SNX27 (mouse monoclonal, (1C6), Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)	1:1.000	IRDye® 800CW goat (polyclonal) anti-mouse IgG (H+L) (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA)	1:5.000
anti-EGFP (mouse monoclonal, (JL-8), Living Colors®, Clontech Laboratories, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich)	1:500		
anti-β-Aktin (rabbit monoclonal, Cell Signaling Technology, Cambridge, Großbritannien)	1:1.000	IRDye® 680RD goat (polyclonal) anti-rabbit IgG (H+L) (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA)	1:5.000

3.4.5 Immunfluoreszenzfärbungen

Um die jeweiligen Proteine mikroskopisch nachzuweisen, wurden die 4C4-Zellen elf Tage zuvor mit einer Zellzahl von 0,2 x 10^6 Zellen/Well in einer 12-Well-Platte auf Deckgläschen eingesät. Die Zellen wurden zunächst mithilfe von 3,7 %igem (w/v) Paraformaldehyd für 10 min auf dem Schüttler bei RT fixiert. Anschließend wurden die

Zellen mindestens drei Mal für 5 min mit PBS gewaschen. Daraufhin folgten die Permeabilisierung der Zellen mit 1 % (v/v) Triton X-100 in PBS für 5 min bei -20 °C und ein weiterer Waschvorgang mit PBS. Nach dem Blockieren unspezifischer Bindungsstellen mit 1 % (w/v) BSA in PBS für 30 min bei RT auf dem Schüttler wurden die Zellen für 4 h mit den jeweiligen Primär-Antikörpern [siehe **Tabelle 7**] in 0,1 % (w/v) BSA in PBS inkubiert. Es folgten ein Waschvorgang und die Inkubation mit den entsprechenden Alexa Fluor®-Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundär-Antikörpern [siehe **Tabelle 7**] in 0,1 % (w/v) BSA in PBS im Dunkeln für 1 h. Nach einem weiteren Waschvorgang wurden die Zellkerne mithilfe von 4′,6-Diamidino-2-Phenylindol Dehydrochlorid (DAPI, Sigma-Aldrich, Steinheim) 1:2.000 in 0,1 % (w/v) BSA in PBS für 10 min bzw. mit TO-PRO®-3-Iodid (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) 1:200 in 0,1 % (w/v) BSA in PBS für 20 min im Dunkeln gefärbt. Abschließend wurden die Zellen drei Mal für 5 min mit PBS gewaschen und in Fluoreszenz-erhaltendem Mounting Medium (Dako North America, Carpinteria, Kalifornien, USA) eingebettet.

Tabelle 7: Für die Immunfluoreszenzfärbungen verwendete Primär- und Sekundär-Antikörper.

Primär-Antikörper	Verdünnung	Sekundär-Antikörper	Verdünnung
anti-SNX27 (mouse monoclonal, (1C6), Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)	1:250	Alexa Fluor® 647 (goat anti-mouse IgG (H+L), Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)	1:200
anti-GFP (rabbit polyclonal, Alexa Fluor® 488 conjugate, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)	1:250	-	-
anti-Rab5 (rabbit polyclonal IgG, (FL-215), Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)	1:30	Alexa Fluor® 594 (goat anti-rabbit IgG (H+L), Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)	1:200
anti-Rab7 (rabbit polyclonal IgG, (H-50), Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)	1:30		
anti-Rab11 (rabbit polyclonal IgG, (H-87), Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)	1:30		

3.4.6 Oberflächenbiotinylierung

Mithilfe der Oberflächenbiotinylierung erfolgte die Bestimmung von funktionell aktivem EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus in der Plasmamembran. Dazu wurden zunächst alle Oberflächenproteine über die als primäres Amin wirkende Aminosäure Lysin durch Biotinylierung markiert, an Avidin-gekoppelten Agarose-Beads isoliert und

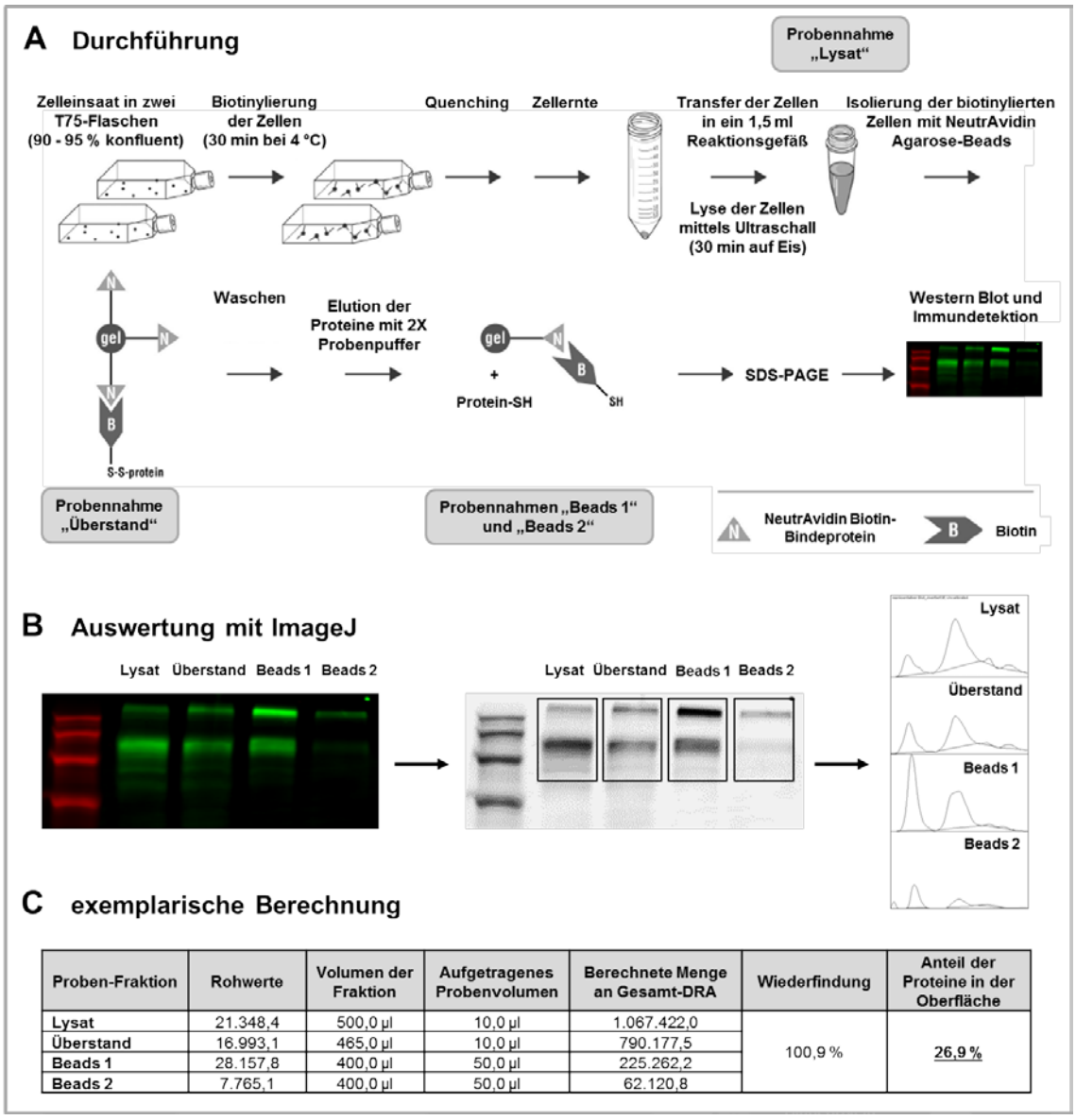
EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus anschließend mithilfe spezifischer Antikörper im Western Blot detektiert. Für diesen Versuch wurde das Pierce Cell Surface Protein Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) verwendet. Die Durchführung erfolgte anhand eines an die Angaben des Herstellers angepassten Protokolls.

Der Versuchsablauf der Oberflächenbiotinylierungs-Experimente ist schematisch in **Abbildung 5A** dargestellt. Von den zu untersuchenden Zelllinien wurden jeweils zwei T75-Zellkulturflaschen für den Versuch eingesetzt. Dazu wurden die Zellen drei Tage zuvor eingesät, sodass sie am Versuchstag zu etwa 90 - 95 % konfluent waren. Das Zellkulturmedium wurde abgenommen und der Zellrasen zwei Mal mit jeweils 8 ml eiskaltem PBS gespült, um Medium-Reste und insbesondere die darin enthaltenen Proteine zu entfernen.
Für die Biotinylierung der Oberflächenproteine wurde das im Kit enthaltene Membran-impermeable, an der Disulfidbrücke spaltbare Biotinylierungsreagenz Sulfo-NHS-SS-Biotin in 48 ml kaltem PBS gelöst, auf die Zellen gegeben und für 30 min auf einem Schüttler bei 4 °C inkubiert. Die Verwendung kalter Lösungen und die Durchführung der Inkubation bei 4 °C verhinderten die Endozytose und das Trafficking der Transmembranproteine während der Biotinylierungsreaktion. Zudem war darauf zu achten, dass während der Biotinylierung kein Tris oder andere primäre Amine verwendet wurden, um ein Quenching der Reaktion zu verhindern.
Anschließend wurden zur Inaktivierung des überschüssigen Biotinylierungsreagenzes jeweils 500 µl Quenching-Lösung zugegeben und durch leichtes Schwenken der Zellkulturflaschen gleichmäßig verteilt. Die Zellen wurden mithilfe eines Zellschabers abgelöst, die Suspensionen aus den beiden Zellkulturflaschen in einem 50 ml Falcon-Röhrchen zusammengeführt und für 6 min bei 1.500 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde daraufhin mit 5 ml TBS gewaschen und erneut zentrifugiert.
Im Anschluss erfolgte die Lyse der Zellen. Hierzu wurde das Zellpellet zunächst in 500 µl Lyse-Puffer und Protease-Inhibitor (cOmplete Mini, EDTA-free, Roche, Mannheim) resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte auf Eis mithilfe eines Ultraschallprozessors (UP100H, Sonotrode MS1, Cycle = 1, Amplitude = 100 %, Hielscher, Teltow). Dazu wurden fünf Ultraschall-Pulse von jeweils 1 s ausgeführt und der Vorgang drei Mal im Abstand von 10 min wiederholt. Zwischendurch erfolgte alle 5 min ein Vortexen der Zellen für 5 s. Nach 30 min wurde das Zelllysat bei 12.000 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert, um Zell- und Kernrückstände zu entfernen. Vom proteinhaltigen Überstand wurden 35 µl als Kontrolle

abgenommen, mit 35 µl zweifach-konzentriertem und 105 µl einfachem Probenpuffer [G] versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert (Fraktion „Lysat“).
Im nächsten Versuchsabschnitt erfolgte über eine Affinitätsreinigung die Isolation der biotinylierten Proteine. Dazu wurden zunächst 500 µl NeutrAvidin Agarose-Suspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben, für 1 min bei 1.000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die NeutrAvidin Agarose-Beads wurde daraufhin drei Mal mit jeweils 500 µl Wasch-Puffer gewaschen und anschließend mit dem Zelllysat für 60 min bei RT auf einem Rotator inkubiert. Nach einem Zentrifugieren der Suspension wurden erneut 35 µl des Überstandes als weitere Kontrolle abgenommen und wie oben beschrieben mit Probenpuffer versetzt (Fraktion „Überstand“). Der restliche Überstand wurde verworfen und die NeutrAvidin Agarose-Beads vier Mal mit 500 µl Wasch-Puffer und zugesetztem Protease-Inhibitor gewaschen.
Abschließend erfolgte die Elution der Proteine. Dazu wurden die NeutrAvidin Agarose-Beads in 400 µl zweifach-konzentriertem Probenpuffer bei 95 °C für 5 min inkubiert und für 2 min bei 1.000 x g zentrifugiert. Es folgte eine weitere Probennahme (Fraktion „Beads 1“), der restliche proteinhaltige Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dieser Elutionsschritt wurde wiederholt und eine erneute Probe entnommen (Fraktion „Beads 2“), um die vollständige Elution der an die NeutrAvidin Agarose-Beads gebundenen biotinylierten Proteine zu kontrollieren. Von den entnommenen Proben wurden je 50 µl für die SDS-PAGE eingesetzt. Der Nachweis und die Quantifizierung von Oberflächen-EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus erfolgte daraufhin anhand von Western Blots wie unter 3.4.3 und 3.4.4 beschrieben.

Mithilfe der Software ImageJ (Version 1.46r, Rasband WS, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) erfolgte die densitometrische Auswertung der Banden. Hierzu wurden die zuvor als TIFF-Bilder abgespeicherten Dateien in ImageJ geöffnet, in das 8-Bit-Format transformiert und invertiert [**Abbildung 5B**]. Die Banden wurden mit der Rechteck-Funktion umrandet und die Pixelintensität grafisch dargestellt. Daraufhin wurden die Peaks markiert und so unspezifisches Hintergrundsignal von der Quantifizierung ausgeschlossen. Nach der Bestimmung der Fläche der ausgewählten Peaks wurden die Rohwerte der Quantifizierung auf das insgesamt verfügbare Volumen der Fraktion im Verhältnis zum aufgetragenen Probenvolumen bezogen (Rohwert * Volumen der Fraktion / aufgetragenes Probenvolumen, exemplarische Berechnung siehe **Abbildung 5C**) und damit die Menge an Gesamt-DRA bzw. Gesamt-DRA-ETKFminus berechnet. Ausgewertet wurden Versuche, bei denen die Wiederfindungsrate (Summe von Gesamt-DRA bzw. Gesamt-DRA-ETKFminus der Fraktionen „Überstand“, „Beads 1“ und „Beads 2“ bezogen auf Gesamt-DRA bzw.

Gesamt-DRA-ETKFminus aus dem Zelllysat) 85 - 115 % betrug, einzelne Werte wurden entsprechend der Wiederfindungsrate korrigiert. Die Summe von Gesamt-DRA bzw. Gesamt-DRA-ETKFminus aus den Fraktionen „Beads 1“ und „Beads 2“ wurde auf die im Lysat detektierte Menge an Gesamt-DRA bzw. Gesamt-DRA-ETKFminus bezogen und entsprach dem Anteil des Proteins, der in der Plasmamembran exprimiert wurde.



Proben-Fraktion	Rohwerte	Volumen der Fraktion	Aufgetragenes Probenvolumen	Berechnete Menge an Gesamt-DRA	Wiederfindung	Anteil der Proteine in der Oberfläche
Lysat	21.348,4	500,0 µl	10,0 µl	1.067.422,0	100,9 %	26,9 %
Überstand	16.993,1	465,0 µl	10,0 µl	790.177,5		
Beads 1	28.157,8	400,0 µl	50,0 µl	225.262,2		
Beads 2	7.765,1	400,0 µl	50,0 µl	62.120,8		

Abbildung 5: Schema zur Durchführung (A) und Auswertung (B und C) der Oberflächenbiotinylierungs-Experimente. Die Durchführung erfolgte anhand eines an die Herstellerangaben angepassten Protokolls mit dem Pierce Cell Surface Protein Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) [149], Einzelheiten dazu sind im Text beschrieben. Für die Auswertung der Blots (hier repräsentativ) wurde die ImageJ-Software genutzt (B). Die Pixelintensitäten der Banden wurden grafisch dargestellt und die Fläche der Peaks unter Ausschluss des Hintergrundsignals quantifiziert. Anschließend erfolgte - wie exemplarisch dargestellt (C) - die Berechnung der in der Plasmamembran exprimierten Proteine anhand der Proben-Fraktionen [eigene Abbildung].

3.5 Fluorometrie

Die Messung des intrazellulären pH-Werts (pH_i) mittels pH-sensitiver Fluoreszenzfarbstoffe wurde bereits Ende der 1980er Jahre etabliert [150]. Im Rahmen der Promotionsarbeit wurde diese Methode für die Bestimmung der Aktivität von DRA und DRA-ETKFminus eingesetzt. DRA-vermittelte Veränderungen des pH_i werden dabei durch das Entfernen und die Wiederzugabe von extrazellulärem Chlorid induziert. Nach Chlorid-Entzug kommt es zu einer intrazellulären Alkalisierung, die erneute Chlorid-Zugabe führt zu einer Reazidifizierung des pH_i. Als spezifischer Fluoreszenzindikator dient dabei der Farbstoff BCECF (2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(6)-Carboxyfluorescein), der als Acetoxymethylester (BCECF-AM) eingesetzt wurde (Biomol, Hamburg). Die Modifizierung der Carbonsäure BCECF mit einer AM-Estergruppe dient der Aufnahme des membranpermeablen Derivats in die Zellen. Unspezifische intrazelluläre Esterasen hydrolysieren das nicht-fluoreszierende, lipophile BCECF-AM daraufhin in die geladene Form BCECF, die intrazellulär verbleibt und als fluoreszierender, pH-sensitiver Indikator fungiert.

In Vorbereitung des Versuchs wurden drei Tage zuvor 1 - 2 x 10^6 Zellen/Well auf speziellen Deckgläschen (11 x 22 mm, Thomas Scientific, Swedesboro, New Jersey, USA) in einer 6-Well-Platte eingesät, sodass sie am Versuchstag zu etwa 90 % konfluent waren. Unmittelbar vor dem Versuch wurden zudem die unterschiedlichen Puffer vorbereitet. Alle Puffer [M, N, O] wurden in einem Standardpuffer [L] angesetzt, mit Carbogen (5 % CO_2, 95 % O_2) bzw. mit Sauerstoff begast und daraufhin mittels 1 M HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-1-Ethansulfonsäure) bzw. 1 M Tris auf den gewünschten pH-Wert eingestellt. Die Temperatur der Puffer wurde mithilfe eines Wasserbades bei 37 °C konstant gehalten.

Die Zellen wurden mit 10 µM BCECF-AM in Puffer 3 [M] (mit HCO_3^- und mit Carbogen begast) für 20 min im Brutschrank bei 37 °C gefärbt. Daraufhin wurden die Deckgläschen in eine spezialangefertigte Perfusionsküvette (Volumen = 250 µl) eingespannt und mit einem kontinuierlichen Fluss von etwa 3 ml/min perfundiert. Die Messungen wurden nach einer Vorlaufzeit von 2 min in Chlorid-haltigem Puffer 3 gestartet. Nach exakt 300 s wurde durch ein Umschalten auf Puffer 4 [N] (mit HCO_3^- und mit Carbogen begast) das extrazelluläre Chlorid entzogen und die Zellen ebenfalls für 300 s perfundiert. Daraufhin erfolgte eine erneute Perfusion für 300 s mit Puffer 3. Am Ende des Experiments wurden die aufgenommenen Ratios normalisiert, indem der pH_i mithilfe von Kalibrationspuffern mit Nigericin-Natriumsalz (Sigma-Aldrich, Steinheim) [O] (ohne HCO_3^- und mit Sauerstoff begast) auf einen pH-Wert von 7,0 und anschließend von 7,5 eingestellt wurde. Diese als „high-K plus nigericin technique" bezeichnete Methode

wurde erstmals von Boyarsky et al. beschrieben und ist in der Arbeitsgruppe etabliert [48, 150].

Das BCECF wurde in den Proben abwechselnd bei einer Wellenlänge von 440 nm (pH-unabhängig zur Kontrolle der Farbstoffbeladung) und 490 nm (pH-abhängig) angeregt. Die Messung der Emissions-Intensitäten erfolgte alle 3,2 s bei einer Wellenlänge von 530 nm. Hierfür wurden ein Spektrophotometer (LS55, Perkin Elmer, Waltham, Massachussetts, USA) und die Software FL WinLab (Version 4, Perkin Elmer) genutzt. Für die statistische Auswertung wurden nicht-lineare Kurvenanpassungen vorgenommen und Kinetiken berechnet [siehe 3.7]. Analysiert wurden neben dem basalen intrazellulären pH (pH_{basal}) auch die Änderung des pH_i nach Chloridentzug (ΔpH) und der Protonen-Flux (bzw. Bicarbonat-Flux), der nach Lamprecht et al. durch einen Abgleich des ΔpH mit der Pufferkapazität der Zellen bei 5 % CO_2 und dem entsprechenden pH-Wert errechnet wurde [151].

3.6 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie und Superresolution Mikroskopie

Die mikroskopischen Untersuchungen der Zellen erfolgten am LSM 780 (Carl Zeiss, Oberkochen), einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (confocal laser scanning microscopy, CLSM), das mit einem zusätzlichen Hochauflösungssystem (ELYRA PS.1, Carl Zeiss, Oberkochen) kombiniert ist. Dieses System ermöglicht die Durchführung der Technik der dreidimensionalen hochauflösenden strukturierten Beleuchtung (Superresolution Structured Illumination Microscopy, SR-SIM). Bei der SR-SIM werden Raster auf die Bildebene projiziert, die mit der Probenstruktur interferieren und sogenannte Moiré-Muster entstehen lassen. Die darin enthaltenen hochauflösenden Informationen werden mit niedrigeren räumlichen Frequenzen durch das optische System erfasst [152]. Diese geringeren Frequenzen lassen sich im finalen Bild auf die wahren Werte zurückrechnen, wodurch sich die Auflösung in allen drei Ebenen verdoppelt [153]. Somit lassen sich mithilfe der SR-SIM sehr feine strukturelle Details mit einer Auflösung von etwa 100 nm abbilden und die Anordnung von Proteinen in einem strukturellen Kontext untersuchen [154].

Die SR-SIM wurde für die Untersuchung der Colokalisation in den 4C4-Zellen angewandt. Als Voraussetzung für diese hochauflösende Methodik wurden hochspezifische Färbungen mit geringem Hintergrundsignal und minimaler spektraler Überlappung angefertigt. Die Spezifität der Färbungen wurde anhand von Einzelfärbungen und Negativkontrollen, bei denen die Zellen lediglich mit den Sekundär-Antikörpern inkubiert wurden, sichergestellt. Die Anregung von DAPI, Alexa Fluor® 488, Alexa Fluor® 594 und Alexa Fluor® 647 erfolgte mithilfe spezieller Laser (405, 488, 561 und

642 nm). Für jede Bildaufnahme wurden fünf Rotationen des Rasters genutzt (Grating) und ein Mittelwert (MW) aus 4 Einzelaufnahmen verrechnet (Averaging). Darüber hinaus wurden Z-Stapel, bestehend aus 6 - 12 Einzelbildern, aufgenommen. Alle SR-SIM-Aufnahmen erfolgten mit einem 40x Plan-Neofluar Objektiv (numerische Apertur = 1.3, Carl Zeiss, Oberkochen) unter Verwendung von Immersionsöl. Die anschließende Verarbeitung und Auswertung der SR-SIM Daten erfolgte mithilfe des Structured Illumination Moduls der ZEN-Software (2011, SP3, black edition, Carl Zeiss, Oberkochen).

Für jedes der durchgeführten Experimente (Untersuchung der Colokalisation von SNX27 und EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus in Rab5-, Rab7- und Rab11-positiven Endosomen) wurden zehn *regions of interest* (ROIs) untersucht, die als einzelne Zellen definiert wurden. Die 4C4-Zellen bilden einen konfluenten Monolayer, sind in Bezug auf bestimmte morphologische Parameter jedoch heterogen [155] und die einzelnen Zellen weisen häufig eine unterschiedliche Zellhöhe auf. Um unterschiedliche Bildausschnitte und Proben vergleichen und die subzelluläre Verteilung der Proteine in den 4C4-Zellen untersuchen zu können, wurden die Z-Ebenen daher zunächst auf die relative Zellhöhe von basal (0 %) bis apikal (100 %) bezogen [**Abbildung 6**].

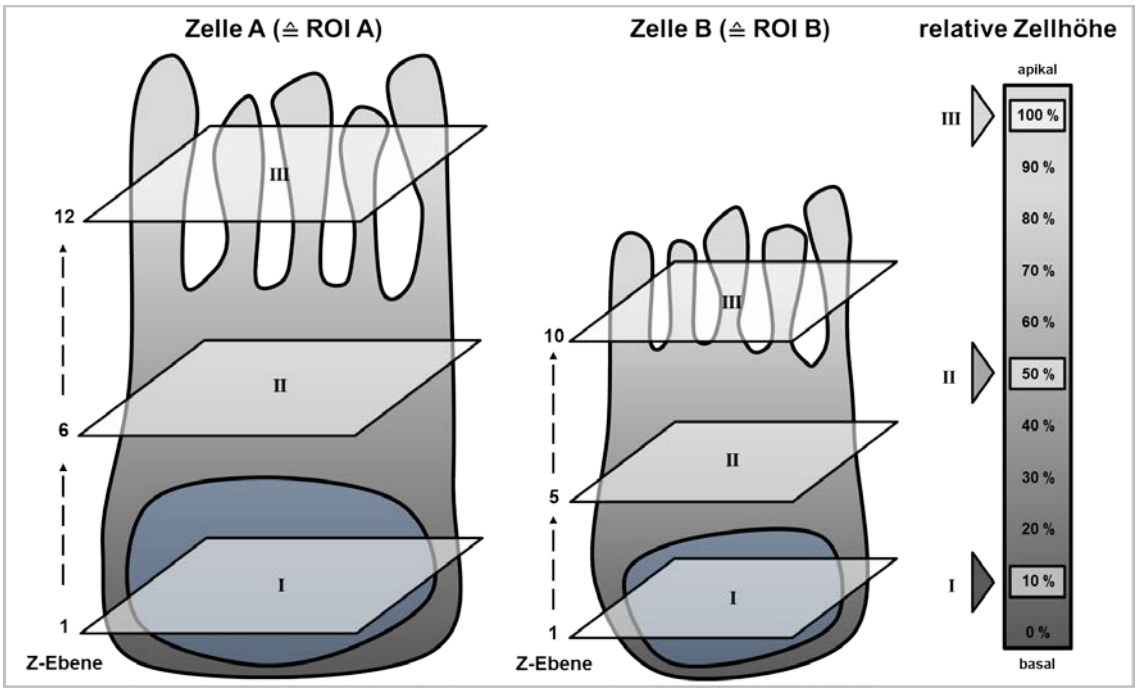


Abbildung 6: Schematische Darstellung zum Bezug der Z-Ebenen unterschiedlich hoher Zellen auf die relative Zellhöhe von basal (0 %) bis apikal (100 %). Um die Lokalisation und die Colokalisation der untersuchten Proteine in den heterogenen 4C4-Zellen vergleichen zu können, wurden die mittels Superresolution-Mikroskopie aufgenommenen Z-Stapel auf die relative Zellhöhe normiert. Dazu erfolgte die Definierung einzelner Zellen als *regions of interest* (ROIs). Mithilfe dieser Normierung wurden die subzelluläre Lokalisation und die Colokalisation von Proteinen in den einzelnen Ebenen entlang der Zellhöhe betrachtet [eigene Abbildung].

Für die Betrachtung der subzellulären Verteilung der untersuchten Proteine wurde die relative Fluoreszenz-Intensität (Produkt aus der Anzahl der Pixel und der mittleren Intensität in dem entsprechenden Fluoreszenz-Kanal, bezogen auf den maximalen Wert (=1) entlang der Z-Achse) in Abhängigkeit der relativen Zellhöhe dargestellt. Die Auswertung der Colokalisation erfolgte für je zwei untersuchte Proteine mithilfe der Manders-Colokalisations-Koeffizienten [156]. Diese wurden ebenfalls in Abhängigkeit der relativen Zellhöhe und somit in den einzelnen Ebenen der 4C4-Zellen betrachtet.

Für die rein qualitative Darstellung der induzierbaren Expression von BFP-SNX27 in den EcR293-Zellen wurde die klassische konfokale Fluoreszenzmikroskopie angewandt. BFP, EGFP und TO-PRO-3 wurden mit den 405, 488 bzw. 633 nm Lasern angeregt. Die LSM-Aufnahmen erfolgten mit dem 40x Plan-Neofluar Objektiv unter Verwendung von Immersionsöl. Für die Darstellung und Bildbearbeitung wurde ebenfalls die ZEN-Software genutzt.

3.7 Statistische Auswertungen

Die statistische Auswertung der Fluorometrie-Daten erfolgte mithilfe der JMP-Software (Version 11, SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA) nach Algorithmen, die in der Arbeitsgruppe etabliert sind [151]. Unter Annahme einer Normalverteilung der Stichproben wurden T-Tests für unabhängige Stichproben durchgeführt.

Darüber hinaus wurde die Software SPSS Statistics (Version 22, IBM, Ehningen) für die statistische Analyse der Ergebnisse der Oberflächenbiotinylierung und der SR-SIM genutzt. Das Vorliegen von statistisch signifikanten Unterschieden wurde aufgrund des zum Teil geringen Stichprobenumfangs anhand von Rangsummentests (Mann-Whitney U-Tests) überprüft. Zuvor erfolgten die Darstellung der Datenverteilung anhand von Boxplots und die Identifizierung von Extremwerten. Datenpunkte, die außerhalb des dreifachen Interquartilsabstand lagen, wurden aus den Analysen ausgeschlossen.

Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ (*) wurden Unterschiede in den Ergebnissen als statistisch signifikant angenommen. Abgebildet sind Mittelwerte (MW) ± Standardabweichungen (standard deviation, SD) bzw. Standardfehler (standard error of the mean, SEM). Die Darstellung der gewonnenen Daten erfolgte mittels OriginPro (2016G, OriginLab Corporation, Northampton, Massachusetts, USA).

4 Ergebnisse

4.1 Induzierbare Expression von BFP-SNX27 in EcR293-Zellen

Um die funktionelle Bedeutung der Interaktion von DRA mit SNX27 zu untersuchen, wurde SNX27 in einem ersten Versuchsabschnitt induzierbar in EcR293-Zellen exprimiert. Die zu Beginn der Promotionsarbeiten zur Verfügung gestellten Zelllinien wiesen bereits eine stabile Expression von EGFP-DRA bzw. der mutierten Form ohne PDZ-Interaktionsmotiv (EGFP-DRA-ETKFminus) auf. Darüber hinaus wurden diese Zelllinien mit einem zuvor klonierten Vektor (pIND[hygro]/BFP-SNX27) transfiziert, der die induzierbare Expression von SNX27 als BFP-markiertes Fusionsprotein ermöglichte. In den etablierten monoklonalen Zelllinien wurde die Expression von BFP-SNX27 durch die Zugabe von PonA zum Zellkulturmedium reguliert. Im Folgenden sind die Untersuchungen zur Induktion der SNX27-Gen- [Abbildung 7] und Proteinexpression [Abbildung 8 und Abbildung 9] in den transfizierten, monoklonalen Zelllinien dargestellt.

Abbildung 7 zeigt die Ergebnisse der qPCR zur SNX27-Genexpression in den Zelllinien EcR293/EGFP-DRA/BFP-SNX27 [Abbildung 7A] und EcR293/EGFP-DRA-ETKFminus/BFP-SNX27 [Abbildung 7B] in Abhängigkeit der Konzentration von PonA. Darüber hinaus ist im unteren Teil der Abbildung zusätzlich die Genexpression von DRA bzw. DRA-ETKFminus dargestellt. Die Quantifizierung erfolgte anhand der $2^{-\Delta\Delta cT}$-Methode durch einen Abgleich der Werte auf die Expression des Haushaltsgens GAPDH sowie auf Kontroll-Zellen, die nicht mit PonA behandelt wurden.

In beiden Zelllinien war ein deutlicher konzentrationsabhängiger Effekt von PonA zu beobachten. Mit zunehmender PonA-Konzentration kam es zu einer vermehrten Genexpression von SNX27. Im Vergleich zu den Kontroll-Zellen (0 µM PonA) kam es nach der Induktion mit 10 µM PonA zu einer etwa achtfachen Genexpressionssteigerung von SNX27 in den DRA-exprimierenden Zellen. In den DRA-ETKFminus-exprimierenden Zellen war das Ausmaß dieser Expressionssteigerung noch stärker ausgeprägt. Hier wurde die SNX27-Genexpression durch die Induktion der Zellen mit 10 µM PonA auf das etwa 45-fache gesteigert. Im Gegensatz zur SNX27-Genexpression wurde die Genexpression von DRA bzw. DRA-ETKFminus erwartungsgemäß nicht durch PonA beeinflusst.

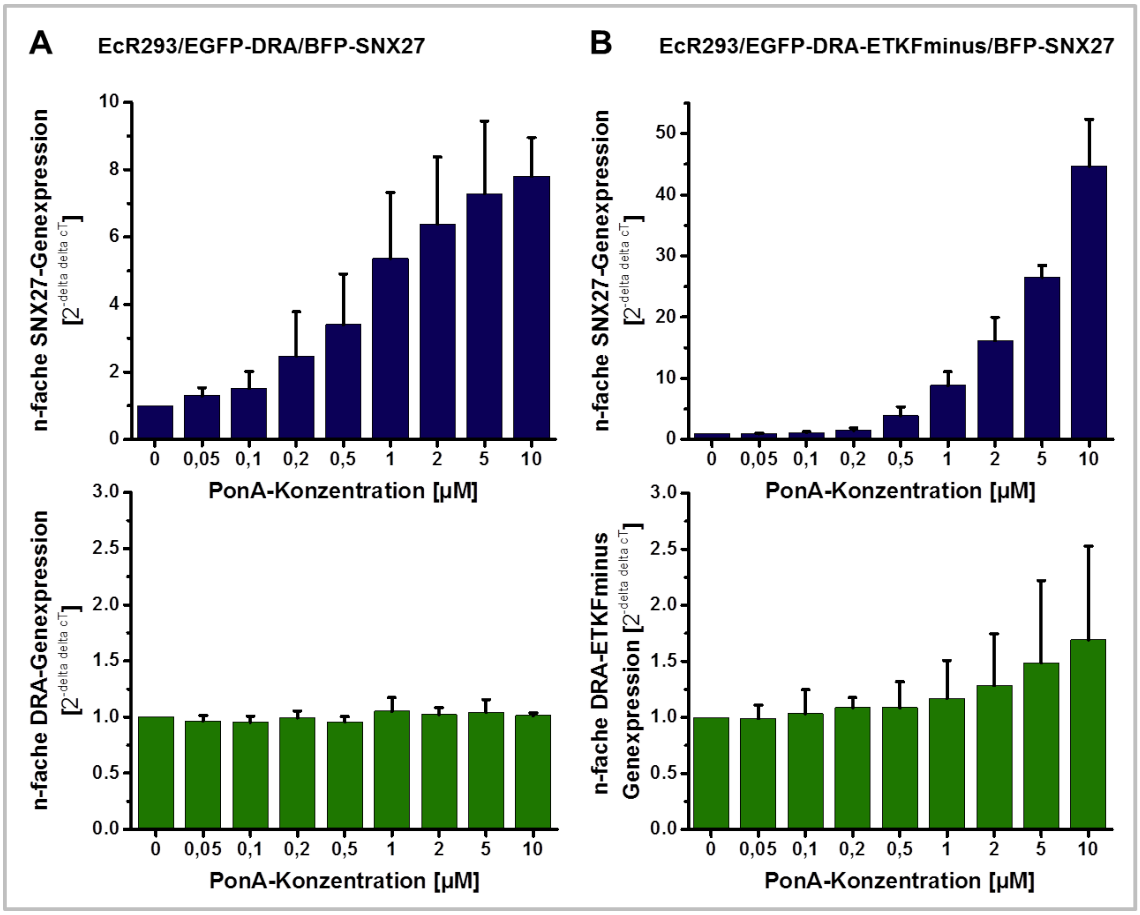


Abbildung 7: Induzierbare Genexpression von SNX27. Die Genexpressionen von SNX27 (oben) und DRA bzw. DRA-ETKFminus (unten) wurden in den Zelllinien EcR293/EGFP-DRA/BFP-SNX27 (A) bzw. EcR293/EGFP-DRA-ETKFminus/BFP-SNX27 (B) in Abhängigkeit der Konzentration von Ponasteron A (PonA) untersucht. Dargestellt sind $2^{-\Delta\Delta cT}$-Werte, bezogen auf KontrolI-Zellen (0 µM PonA), normalisiert auf GAPDH, MW + SD, n ≥ 3.

Darüber hinaus wurde auch die Proteinexpression von SNX27 in Abhängigkeit der PonA-Konzentration mittels Western Blot untersucht [**Abbildung 8**]. Im oberen Teil der Abbildung sind repräsentative Western Blots dargestellt. In beiden Zelllinien (EcR-293/EGFP-DRA/BFP-SNX27 [Abbildung 8A] und EcR293/EGFP-DRA-ETKFminus/ BFP-SNX27 [Abbildung 8B]) konnte mithilfe eines spezifischen SNX27-Antikörpers eine endogene Expression des Proteins (Molekulargewicht (MW) = 61 kDa) detektiert werden. Bei steigender PonA-Konzentration wurde zudem auch das transfizierte Fusionsprotein BFP-SNX27 (MW = 87 kDa) nachgewiesen. Außerdem wurden bei einer Zunahme der PonA-Konzentration das Auftreten von Doppelbanden und einer weiteren Bande von etwa 51 kDa deutlich, die mutmaßlich auf Fragmente des Fusionsproteins zurückzuführen sind. Durch den Abgleich des SNX27-Signals auf die Expression von β-Aktin erfolgte die Quantifizierung der SNX27-Proteinexpression, die im unteren Teil der Abbildung dargestellt ist. In Übereinstimmung mit den oben dargestellten Ergebnissen der Genexpression kam es mit steigender PonA-Konzentration zu einer Zunahme der SNX27-Proteinexpression in beiden Zelllinien. Das Ausmaß der

Expressionssteigerung war in der Zelllinie EcR293/EGFP-DRA-ETKFminus/BFP-SNX27 größer. Während es nach Induktion mit 10 µM PonA in den DRA-exprimierenden Zellen [Abbildung 8A] zu einer zehnfachen Zunahme der SNX27-Expression kam, erfolgte in den DRA-ETKFminus-exprimierenden Zellen [Abbildung 8B] eine 21-fache Zunahme der SNX27-Proteinexpression.

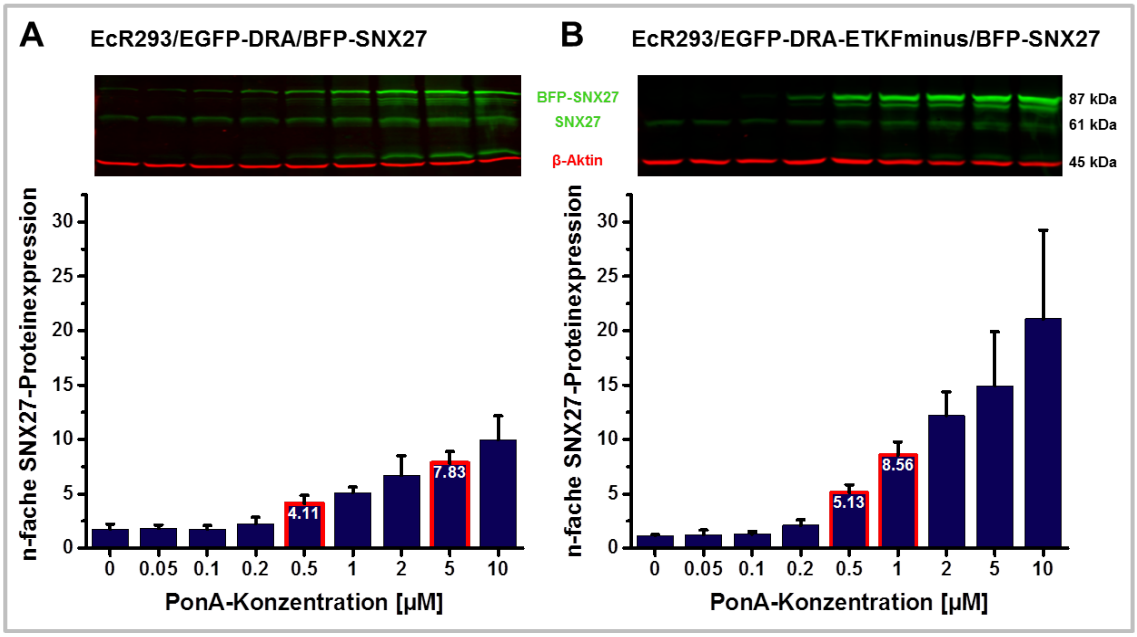


Abbildung 8: Induzierbare Proteinexpression von SNX27. Die SNX27-Proteinexpression wurde in den Zelllinien EcR293/EGFP-DRA/BFP-SNX27 (A) bzw. EcR293/EGFP-DRA-ETKFminus/BFP-SNX27 (B) in Abhängigkeit der Konzentration von Ponasteron A (PonA) untersucht. Dargestellt ist die relative Proteinexpression bezogen auf die endogene SNX27-Expression in KontrolI-Zellen (0 µM PonA), normalisiert auf β-Aktin, MW + SD, n = 4.

Für die folgenden Untersuchungen wurden daraufhin zwei unterschiedliche PonA-Konzentrationen gewählt, die in beiden Zelllinien zu einer vergleichbaren SNX27-Proteinexpression führten. Zum einen wurde eine Konzentration bestimmt, die nur eine geringe Zunahme der Expression bewirkte, von der endogenen SNX27-Expression jedoch zu unterscheiden war. Hierzu wurden in beiden Zelllinien 0,5 µM PonA verwendet. Diese Konzentration führte zu einer leichten, etwa fünffachen SNX27-Überexpression. Zum anderen wurde eine weitere PonA-Konzentration ausgewählt, die zu einer mäßigen Überexpression von etwa doppeltem Ausmaß führte. Dafür wurden in der Zelllinie EcR293/EGFP-DRA/BFP-SNX27 5 µM PonA und in der Zelllinie EcR293/EGFP-DRA-ETKFminus/BFP-SNX27 1 µM PonA eingesetzt. In beiden Zelllinien kam es daraufhin zu einer etwa achtfachen SNX27-Überexpression. In den folgenden Darstellungen der Ergebnisse werden die mithilfe dieser ausgewählten PonA-Konzentrationen hervorgerufenen Induktionszustände zur Vereinfachung und besseren Anschaulichkeit mit „5fach SNX27“ bzw. „8fach SNX27“ bezeichnet.

Die mit den ausgewählten PonA-Konzentrationen induzierten Zellen wurden mithilfe der CLSM visualisiert. Zusätzlich zur stabilen Expression der Fusionsproteine BFP-SNX27 und EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus wurden die Zellkerne zur Kontrolle der Intaktheit der Zellen mit TO-PRO-3 gefärbt. Repräsentative Aufnahmen beider Zelllinien sind in **Abbildung 9** dargestellt.

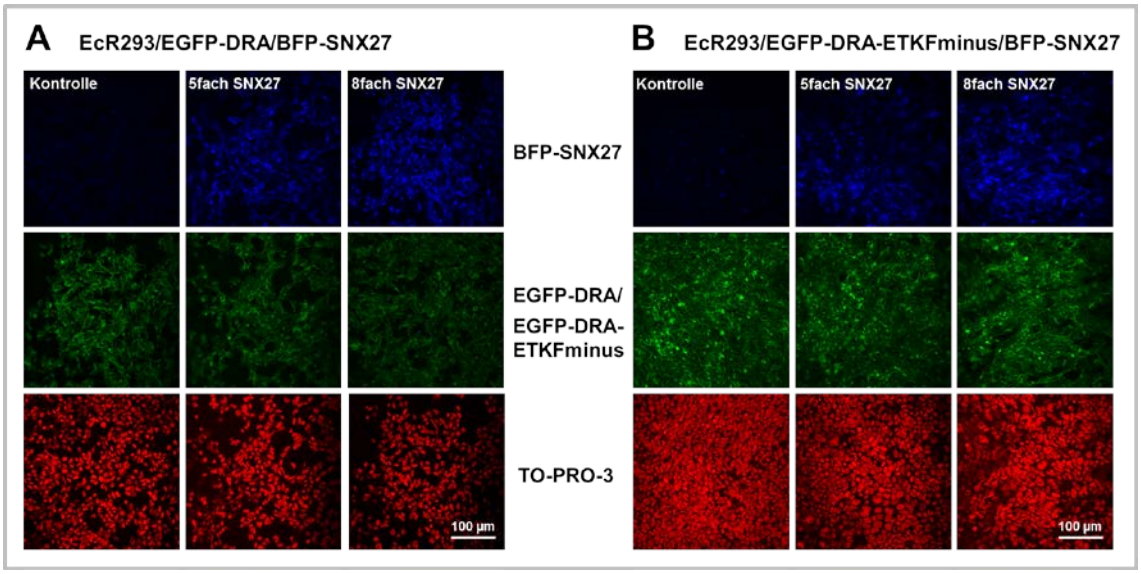


Abbildung 9: Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen der induzierbaren Expression von SNX27. Dargestellt sind die Proteinexpressionen von BFP-SNX27 und EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus sowie die mittels TO-PRO-3 angefärbten Zellkerne in den Zelllinien EcR293/EGFP-DRA/BFP-SNX27 (A) bzw. EcR293/EGFP-DRA-ETKFminus/BFP-SNX27 (B) nach Induktion einer fünf- bzw. achtfachen SNX27-Überexpression. Die Aufnahmen erfolgten am LSM 780 (Carl Zeiss).

In den Kontroll-Zellen, die nicht mit PonA behandelt wurden, konnte keine Expression von transfiziertem BFP-SNX27 nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte das BFP-markierte Fusionsprotein nach der Induktion mit PonA in beiden Zelllinien detektiert werden. Darüber hinaus war der mittels qPCR und Western Blot ermittelte Unterschied im Expressionsniveau von BFP-SNX27 auch mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie erkennbar. In den mit der höheren PonA-Konzentration behandelten Zellen (8fach SNX27) wurde mehr BFP-SNX27 nachgewiesen, als nach Verwendung der geringeren PonA-Konzentration (5fach SNX27).

Weiterhin wurden auch EGFP-DRA [Abbildung 9A] und EGFP-DRA-ETKFminus [Abbildung 9B] mikroskopisch nachgewiesen. Das jeweilige Expressionsniveau änderte sich jedoch nicht bei den verschiedenen SNX27-Expressionsbedingungen. Unabhängig von der PonA-Induktion wurde allerdings ein Expressions-Unterschied zwischen den Zelllinien festgestellt. Die DRA-exprimierende Zelllinie wies im Vergleich zu der DRA-ETKFminus-exprimierenden Zelllinie eine geringere Expression des Ionenaustauschers auf, was auch für die folgenden Untersuchungen von Bedeutung ist.

4.2 SNX27 Knockdown in EcR293-Zellen

Neben Untersuchungen der unterschiedlichen Überexpressionsbedingungen von SNX27 wurden auch Versuche mit einem SNX27 KD durchgeführt. Hierzu erfolgten die Transfektion der Zelllinien EcR293/EGFP-DRA bzw. EcR293/EGFP-DRA-ETKFminus mit SNX27-spezifischen shRNA-Konstrukten und die anschließende Selektion der transfizierten Zellen mithilfe von Puromycin. Die erhaltenen polyklonalen Zelllinien (EcR293/EGFP-DRA/SNX27 KD und EcR293/EGFP-DRA-ETKFminus/SNX27 KD) wurden daraufhin hinsichtlich ihrer SNX27-Gen- und Proteinexpression untersucht [**Abbildung 10**].

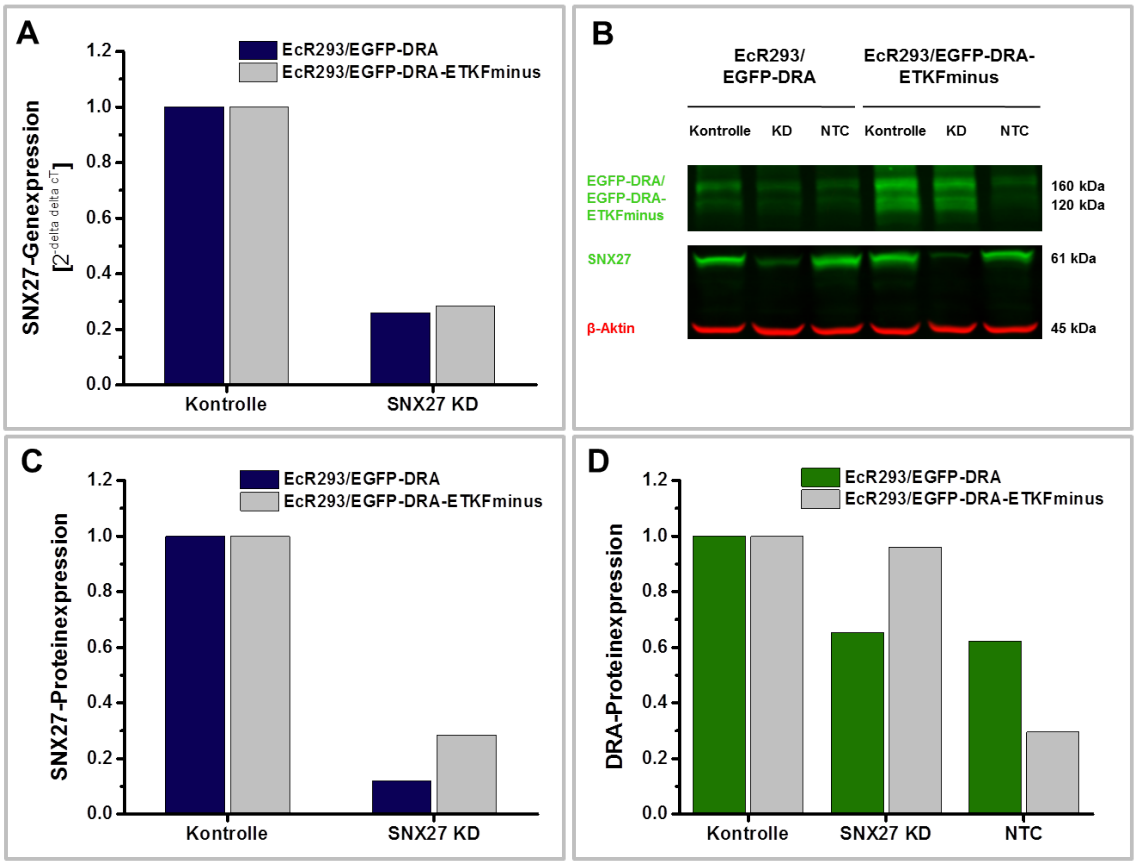


Abbildung 10: Knockdown (KD) von SNX27 in den Zelllinien EcR293/EGFP-DRA und EcR293/EGFP-DRA-ETKFminus. (A) SNX27-Genexpression. Dargestellt sind $2^{-\Delta\Delta cT}$-Werte, bezogen auf nicht-transfizierte Kontroll-Zellen, normalisiert auf GAPDH. (B) Western-Blot-Nachweis von SNX27 sowie EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus und β-Aktin in nicht-transfizierten Kontroll-Zellen, nach SNX27 KD und nach Transfektion mit nicht-bindender shRNA (NTC). (C und D) Quantifizierung der SNX27- bzw. DRA-Proteinexpression. Dargestellt ist die relative Proteinexpression, bezogen auf nicht-transfizierte Kontroll-Zellen, normalisiert auf β-Aktin.

In Abbildung 10A ist die mithilfe der qPCR ermittelte Genexpression von SNX27 nach dem KD im Vergleich zu nicht mit shRNA transfizierten Kontroll-Zellen dargestellt. Sowohl in den DRA- als auch in den DRA-ETKFminus-exprimierenden Zellen war die SNX27-Genexpression nach dem SNX27 KD deutlich verringert. In beiden Zelllinien

konnte eine um mehr als 70 % reduzierte SNX27-Genexpression nachgewiesen werden.

Mithilfe eines Western Blots wurde zudem die Proteinexpression von SNX27 sowie von EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus untersucht [Abbildung 10B-D]. In beiden Zelllinien war eine Bande von 61 kDa nachweisbar, die dem endogen exprimierten SNX27 entspricht (Kontrolle) [Abbildung 10B]. Diese endogene Expression konnte durch den KD deutlich reduziert werden. Darüber hinaus hatte die Transfektion der Zellen mit einer nicht-bindenden shRNA (NTC) keinen Einfluss auf die SNX27-Proteinexpression. Die Quantifizierung der SNX27-Proteinexpression [Abbildung 10C] zeigte eine Reduktion von mehr als 70 % in der DRA-ETKFminus-exprimierenden Zelllinie und sogar von mehr als 90 % in der DRA-exprimierenden Zelllinie.

Weiterhin wurde auch die Proteinexpression von EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus nachgewiesen und quantifiziert. Der Proteinnachweis erfolgte mithilfe eines anti-EGFP-Antikörpers und führte zur Detektion einer Doppelbande mit einem MW von etwa 120 kDa und einer weiteren Bande mit einem MW von etwa 160 kDa [Abbildung 10B]. Das im Vergleich zu den DRA-exprimierenden Zellen größere Ausmaß der Expression in den DRA-ETKFminus-exprimierenden Zellen wurde bereits weiter oben anhand der repräsentativen CLSM-Bilder dargestellt [vgl. Abbildung 9] und konnte mithilfe der Western Blot-Ergebnisse bestätigt werden. Der SNX27 KD hatte keinen Einfluss auf die Expression von DRA-ETKFminus. Es wurde jedoch eine leichte Abnahme der DRA-Expression nach dem KD von SNX27 detektiert. Zudem war eine deutliche Reduktion der DRA-ETKFminus-Expression von etwa 70 % nach der Transfektion der Zellen mit dem nicht-bindenden Kontroll-Konstrukt zu beobachten (NTC) [Abbildung 10D]. Aus diesem Grund wurden für die folgenden Untersuchungen der Funktion und Oberflächenexpression von DRA nach SNX27 KD nicht-transfizierte Zellen als Kontrolle verwendet.

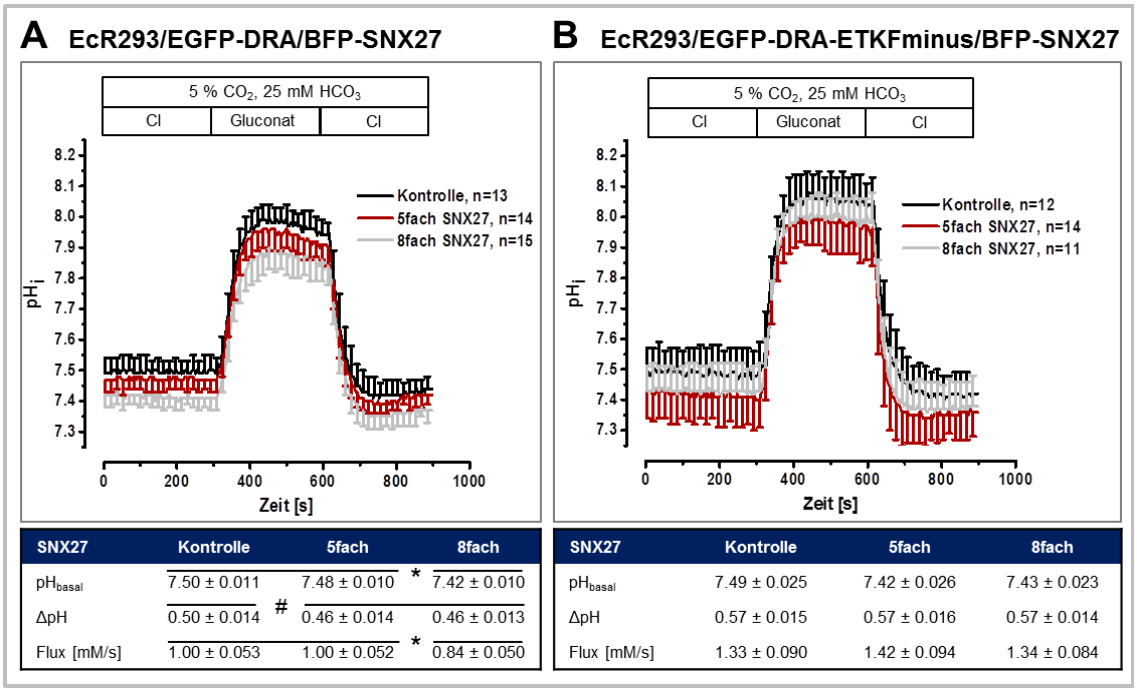
4.3 Einfluss der SNX27-Expression auf die Aktivität von DRA in EcR293-Zellen

Mithilfe fluorometrischer Messungen des pH_i wurden der Einfluss der SNX27-Überexpression [siehe 4.3.1] und des SNX27 KD [siehe 4.3.2] auf die Aktivität von DRA in EcR293-Zellen bestimmt. Darüber hinaus wurde zur Kontrolle der Spezifität der Interaktion auch der Einfluss der unterschiedlichen SNX27-Expressionszustände auf die mutierte Form des Anionenaustauschers ohne PDZ-Interaktionsmotiv (DRA-ETKFminus) untersucht. Für die Versuche wurden die Zellen auf Deckgläschen eingesät, mit

BCECF-AM gefärbt und anschließend mit verschiedenen Puffern überspült. Dadurch konnten die intrazelluläre Alkalisierung nach Entzug von extrazellulärem Chlorid und die Reazidifizierung nach der Wiederzugabe von Chlorid gemessen werden. Die Ergebnisse der Messungen des pH_i werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

4.3.1 Aktivität von DRA nach Induktion der Expression von BFP-SNX27 in EcR293-Zellen

Für die Untersuchung einer regulierbaren SNX27-Expression wurden mithilfe der zwei zuvor festgelegten PonA-Konzentrationen die etwa fünf- und achtfache SNX27-Überexpression in den etablierten monoklonalen Zelllinien (EcR293/EGFP-DRA/BFP-SNX27 bzw. EcR293/EGFP-DRA-ETKFminus/BFP-SNX27) induziert [vgl. 4.1]. Die Auswirkungen der unterschiedlichen SNX27-Expressionsniveaus auf die Funktion von DRA und DRA-ETKFminus sind in **Abbildung 11** dargestellt.



SNX27	Kontrolle	5fach	8fach
pH_{basal}	7.50 ± 0.011	7.48 ± 0.010 *	7.42 ± 0.010
ΔpH	0.50 ± 0.014 #	0.46 ± 0.014	0.46 ± 0.013
Flux [mM/s]	1.00 ± 0.053	1.00 ± 0.052 *	0.84 ± 0.050

SNX27	Kontrolle	5fach	8fach
pH_{basal}	7.49 ± 0.025	7.42 ± 0.026	7.43 ± 0.023
ΔpH	0.57 ± 0.015	0.57 ± 0.016	0.57 ± 0.014
Flux [mM/s]	1.33 ± 0.090	1.42 ± 0.094	1.34 ± 0.084

Abbildung 11: Aktivität von DRA bzw. DRA-ETKFminus nach Induktion der SNX27-Expression. Untersucht wurde der Einfluss der fünffachen und der achtfachen SNX27-Überexpression auf den basalen pH-Wert (pH_{basal}), die Änderung des intrazellulären pH-Wertes (ΔpH) und den Protonen- bzw. Bicarbonat-Flux in den Zelllinien EcR293/EGFP-DRA/BFP-SNX27 (A) bzw. EcR293/EGFP-DRA-ETKFminus/BFP-SNX27 (B). MW ± SD; T-Test; * p < 0,05; # p = 0,0547.

In der Zelllinie EcR293/EGFP-DRA/BFP-SNX27 [Abbildung 11A] wurde - wie erwartet - ein Anstieg des pH_i nach Entzug von extrazellulärem Chlorid nach 300 s verzeichnet. Diese pH_i-Zunahme und die anschließende Abnahme durch erneute Perfusion mit dem Chlorid-haltigen Puffer wurden sowohl in den nicht-transfizierten Kontroll-Zellen, als auch nach fünffacher und nach achtfacher SNX27-Überexpression gemessen.

Allerdings wurden Unterschiede des basalen pH-Wertes (pH_{basal}) festgestellt. Mit zunehmender SNX27-Expression kam es zu einer Abnahme des pH_{basal}. Nach achtfacher SNX27-Überexpression wurde ein geringer, jedoch statistisch signifikant verringerter pH_{basal} ermittelt (Kontrolle: 7,50 ± 0,011 vs. 8fach SNX27: 7,42 ± 0,010; $p < 0,05$). Darüber hinaus konnte auch die Tendenz zu einer verringerten pH_i-Änderung (Differenz aus maximalem und basalem pH-Wert, ΔpH) nach Überexpression von SNX27 festgestellt werden (Kontrolle: 0,50 ± 0,014 vs. 5fach SNX27: 0,46 ± 0,014 bzw. 8fach SNX27: 0,46 ± 0,013; $p = 0,0547$). Nach achtfacher SNX27-Überexpression wurde zudem ein statistisch signifikant verringerter Protonen- bzw. Bicarbonat-Flux berechnet, der durch einen Abgleich des ΔpH mit der Pufferkapazität der Zellen bei dem entsprechenden pH-Wert bestimmt wurde (Kontrolle: 1,00 ± 0,053 bzw. 5fach SNX27: 1,00 ± 0,052 vs. 8fach SNX27: 0,84 ± 0,050; $p < 0,05$). Diese Daten zeigen, dass die Aktivität von DRA durch die SNX27-Überexpression abnimmt.

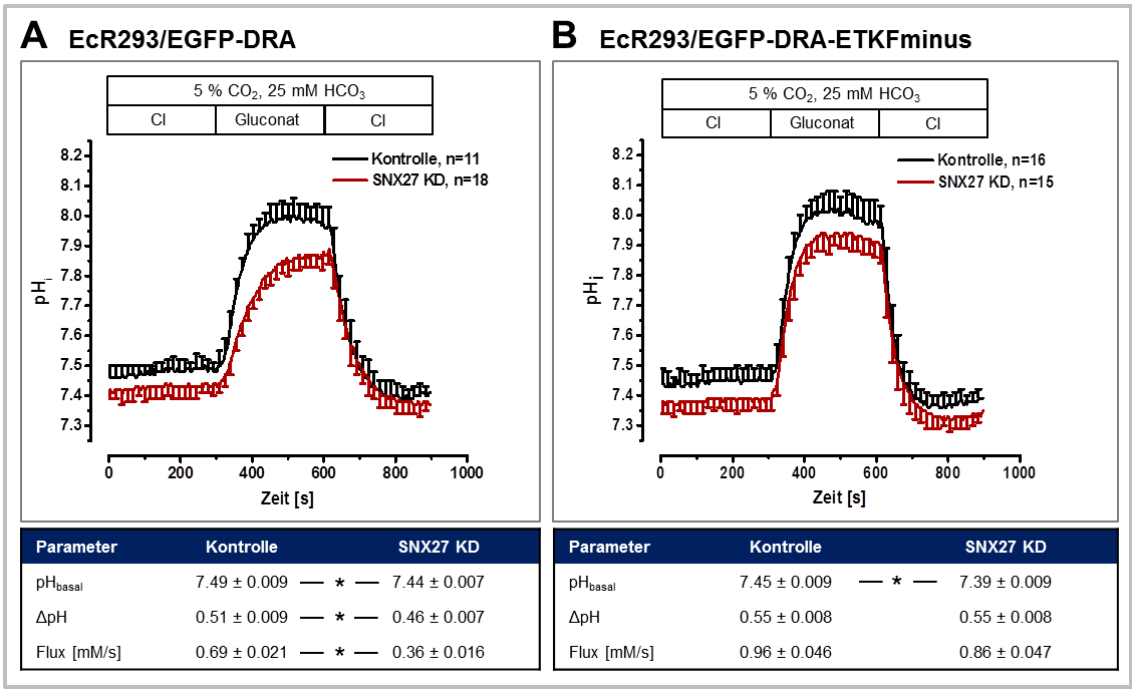
In Abbildung 11B sind die Ergebnisse der Messungen in der Zelllinie EcR293/EGFP-DRA-ETKFminus/BFP-SNX27 zusammengefasst. Im Gegensatz zu den DRA-exprimierenden Zellen waren in dieser Zelllinie keine statistisch signifikanten Unterschiede erkennbar. Nach Überexpression von SNX27 wurde zwar ebenfalls eine Abnahme des pH_{basal} beobachtet, die jedoch statistisch nicht signifikant war. Allerdings war der Flux in den DRA-ETKFminus-exprimierenden Zellen etwa ein Drittel höher als in den DRA-exprimierenden Zellen (Kontrolle DRA: 1,00 ± 0,053 vs. Kontrolle DRA-ETKFminus: 1,33 ± 0,090). Demzufolge wies diese Zelllinie eine höhere basale DRA-Aktivität auf, die vermutlich auf die höhere Expression von DRA-ETKFminus im Vergleich zu DRA in den EcR293-Zellen zurückzuführen ist [vgl. Abbildung 9 und Abbildung 10B].

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die kontrollierte Überexpression von SNX27 einen Einfluss auf die Funktion von DRA besitzt. Nach achtfacher Überexpression von SNX27 wurde eine signifikant verringerte Aktivität von DRA, jedoch nicht von DRA-ETKFminus nachgewiesen. Diese Ergebnisse zeigen eine funktionelle Bedeutung der spezifischen, PDZ-vermittelten Interaktion von SNX27 mit dem entsprechenden Interaktionsmotiv von DRA und belegen damit die Spezifität des verwendeten Zellmodels.

4.3.2 Aktivität von DRA nach SNX27 Knockdown in EcR293-Zellen

In einem weiteren Versuchsabschnitt wurde der Einfluss des SNX27 KD auf die Aktivität von DRA untersucht. Die Transfektion mit shRNA führte zu einer Reduktion der SNX27-Proteinexpression um mehr als 70 % in den etablierten polyklonalen Zelllinien [vgl. 4.2].

Die mithilfe der fluorometrischen pH_i-Messungen gewonnenen Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung von DRA bzw. DRA-ETKFminus nach dem SNX27 KD sind in **Abbildung 12** dargestellt.



Parameter	Kontrolle		SNX27 KD
pH_{basal}	7.49 ± 0.009	*	7.44 ± 0.007
ΔpH	0.51 ± 0.009	*	0.46 ± 0.007
Flux [mM/s]	0.69 ± 0.021	*	0.36 ± 0.016

Parameter	Kontrolle		SNX27 KD
pH_{basal}	7.45 ± 0.009	*	7.39 ± 0.009
ΔpH	0.55 ± 0.008		0.55 ± 0.008
Flux [mM/s]	0.96 ± 0.046		0.86 ± 0.047

Abbildung 12: Aktivität von DRA bzw. DRA-ETKFminus nach dem Knockdown (KD) von SNX27. Untersucht wurde der Einfluss des SNX27 KD auf den basalen pH-Wert (pH_{basal}), die Änderung des intrazellulären pH-Wertes (ΔpH) und den Protonen- bzw. Bicarbonat-Flux in den Zelllinien EcR293/EGFP-DRA (A) bzw. EcR293/EGFP-DRA-ETKFminus (B). MW ± SD; T-Test; * p < 0,05.

Abbildung 12A zeigt die Auswirkungen des SNX27 KD auf die EcR293/EGFP-DRA-Zellen. Im Vergleich zu den nicht-transfizierten Kontroll-Zellen wurde nach dem SNX27 KD ein statistisch signifikant reduzierter pH_{basal} ermittelt (Kontrolle: 7,49 ± 0,009 vs. SNX27 KD: 7,44 ± 0,007; $p < 0,05$). Darüber hinaus war auch die Änderung des pH_i (ΔpH) signifikant verringert (Kontrolle: 0,51 ± 0,009 vs. SNX27 KD: 0,46 ± 0,007; $p < 0,05$). Durch Berücksichtigung der Pufferkapazität bei dem entsprechenden pH-Wert der Zellen wurde zudem der Protonen- bzw. Bicarbonat-Flux berechnet. Nach dem SNX27 KD wurde eine besonders starke Abnahme des Fluxes beobachtet (Kontrolle: 0,69 ± 0,021 vs. SNX27 KD: 0,36 ± 0,016; $p < 0,05$). Diese Daten zeigen, dass der KD von SNX27 zu einer etwa um die Hälfte reduzierten Aktivität von DRA führt.

In den EcR293/EGFP-DRA-ETKFminus-Zellen [Abbildung 12B] wurde nach dem KD von SNX27 zwar ebenfalls ein verringerter pH_{basal} nachgewiesen (Kontrolle: 7,45 ± 0,009 vs. SNX27 KD: 7,39 ± 0,009; $p < 0,05$), für den ΔpH (Kontrolle und SNX27 KD: 0,55 ± 0,008) und den Flux (Kontrolle: 0,96 ± 0,046 vs. SNX27 KD: 0,86 ± 0,047) wurden jedoch keine Unterschiede zwischen nicht-transfizierten Kontroll-Zellen und

Zellen mit einem SNX27 KD ermittelt. Somit wurde die Aktivität von DRA-ETKFminus nicht durch den SNX27 KD beeinflusst. Diese Ergebnisse bestätigen damit erneut die Spezifität des Modells.

Zusammenfassend kam es durch den SNX27 KD zu einer starken Aktivitätsminderung von DRA. Demnach besitzt SNX27 eine entscheidende Bedeutung für die Funktion des Anionenaustauschers. Eine ausreichende Expression des Proteins ist für die Aktivität von DRA mit intakter PDZ-Interaktion erforderlich.

4.4 Oberflächenexpression von DRA nach Induktion der Expression von SNX27 und nach SNX27 Knockdown in EcR293-Zellen

Im Anschluss an die funktionellen Untersuchungen wurde die Expression des Anionenaustauschers DRA in der Plasmamembran in Abhängigkeit von der SNX27-Expression untersucht. Ziel dieser Versuche war es, herauszufinden, ob die leicht verringerte DRA-Aktivität nach achtfacher SNX27-Überexpression und vor allem die starke Aktivitätsminderung von DRA nach SNX27 KD durch eine verminderte Oberflächenexpression des Transporters zustande kommen. Hierzu wurde eine Oberflächenbiotinylierung durchgeführt, bei der zunächst alle an der Zelloberfläche exprimierten Proteine durch Biotinylierung markiert wurden. Daraufhin folgten die Lyse der Zellen und die Isolation der biotinylierten Proteine mithilfe einer Avidin-gekoppelten Agarose. Schließlich wurden EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus mithilfe eines EGFP-Antikörpers spezifisch aus der Summe der biotinylierten und präzipitierten Oberflächenproteine im Western Blot detektiert. Durch den Bezug auf das im Lysat nachgewiesene Gesamtprotein konnte der relative Anteil von DRA bzw. DRA-ETKFminus quantifiziert werden, der in der Plasmamembran exprimiert wurde.

Die Ergebnisse der Oberflächenbiotinylierungs-Experimente sind in **Abbildung 13** dargestellt. Zunächst wurde die Oberflächenexpression von DRA bzw. DRA-ETKFminus nach Überexpression von SNX27 untersucht [Abbildung 13A]. Dazu wurden durch Zugabe von PonA zum Zellkulturmedium eine fünffache und eine achtfache Überexpression von SNX27 in den monoklonalen Zelllinien EcR293/EGFP-DRA/BFP-SNX27 bzw. EcR293/EGFP-DRA-ETKFminus/BFP-SNX27 induziert [vgl. 4.1].

Im Vergleich zu Kontroll-Zellen, die nicht mit PonA behandelt wurden und daher lediglich endogenes SNX27 exprimierten, war kein Unterschied in der Oberflächenexpression von DRA nach SNX27-Überexpression nachweisbar. Weder nach fünffacher noch nach achtfacher SNX27-Expression wurde eine veränderte Oberflächenexpression von DRA gefunden (Kontrolle: 22,5 ± 6,6 %; 5fach SNX27: 19,0 ± 5,2 %;

8fach SNX27: 21,4 ± 3,5 %). Auch die in der Zelllinie EcR293/EGFP-DRA-ETKF-minus/BFP-SNX27 untersuchte Oberflächenexpression von DRA-ETKFminus unterschied sich nach SNX27-Überexpression nicht von den Kontroll-Zellen (Kontrolle: 15,4 ± 5,4 %; 5fach SNX27: 17,2 ± 5,4 %; 8fach SNX27: 12,9 ± 4,8 %).

Allerdings konnte im Vergleich von DRA und DRA-ETKFminus eine etwas höhere Oberflächenexpression von DRA nachgewiesen werden, die nach achtfacher SNX27-Überexpression auch statistisch signifikant war (DRA: 21,4 % ± 3,5 % vs. DRA-ETKFminus: 12,9 % ± 4,8 %; $p < 0,05$).

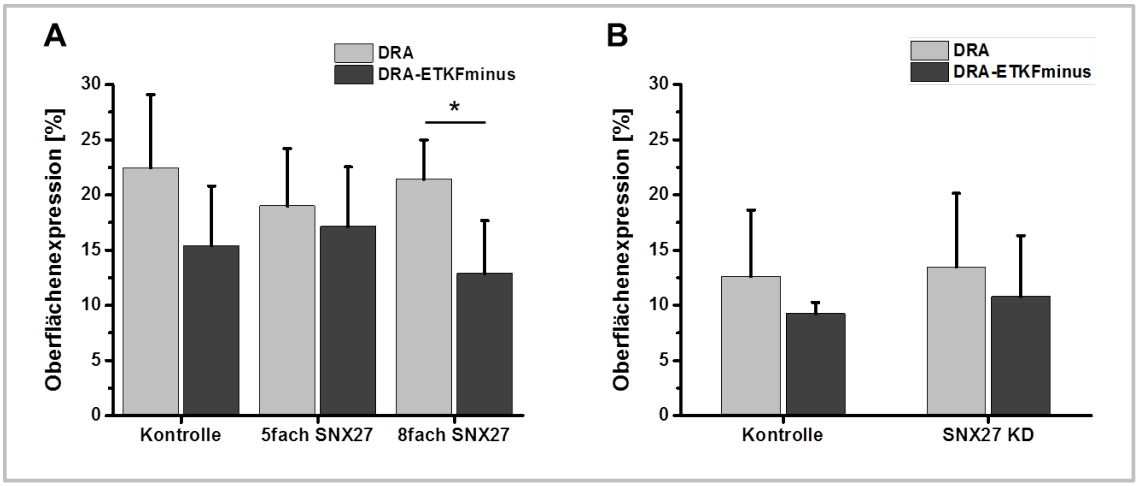


Abbildung 13: Oberflächenexpression von DRA bzw. DRA-ETKFminus. Die Oberflächenexpressionen wurden nach fünffacher und achtfacher SNX27-Überexpression in den Zelllinien EcR293/EGFP-DRA/BFP-SNX27 bzw. EcR293/EGFP-DRA-ETKFminus/BFP-SNX27 (A) und nach dem Knockdown (KD) von SNX27 in den Zelllinien EcR293/EGFP-DRA bzw. EcR293/EGFP-DRA-ETKFminus (B) untersucht. Dargestellt ist die relative Oberflächenexpression, bezogen auf Gesamt-DRA bzw. Gesamt-DRA-ETKFminus aus Zelllysat. MW ± SD; Mann-Whitney-U-Test; * $p < 0,05$, $n = 5 - 6$.

Darüber hinaus wurde auch die Oberflächenexpression von DRA und DRA-ETKFminus nach SNX27 KD untersucht [Abbildung 13B]. In den stabil mit shRNA transfizierten, polyklonalen Zelllinien (EcR293/EGFP-DRA/SNX27 KD und EcR293/EGFP-DRA-ETKFminus/SNX27 KD) war die SNX27-Expression um mehr als 70 % reduziert [vgl. 4.2].

In keiner der beiden Zelllinien wurde nach dem KD von SNX27 im Vergleich zu nicht-transfizierten Kontroll-Zellen ein Unterschied in der Oberflächenexpression von DRA festgestellt (DRA: Kontrolle: 12,6 ± 6,0 %; SNX27 KD: 13,5 ± 6,7 % bzw. DRA-ETKF-minus: Kontrolle: 9,3 ± 1,0 %; SNX27 KD: 10,8 ± 5,5 %). Dennoch war auch in diesen Zelllinien die Tendenz einer etwas höheren Oberflächenexpression von DRA gegenüber DRA-ETKFminus zu beobachten (DRA: 12,6 % ± 6,0 % vs. DRA-ETKFminus: 9,3 % ± 1,0 % in den nicht-transfizierten Kontroll-Zellen).

Darüber hinaus war die Oberflächenexpression von DRA bzw. DRA-ETKFminus in den SNX27 KD-Zelllinien [Abbildung 13B] generell etwas geringer als in den Zelllinien, die für die Untersuchung der SNX27-Überexpression verwendet wurden [Abbildung 13A]. Dieser Unterschied ist auf die verschiedenen Zelllinien monoklonalen bzw. polyklonalen Ursprungs zurückzuführen, die für die unterschiedlichen Versuche etabliert wurden.

Zusammenfassend wurde kein Einfluss einer SNX27-Überexpression oder eines SNX27 KD auf die Oberflächenexpression von DRA oder DRA-ETKFminus nachgewiesen. Die im Rahmen der funktionellen Untersuchungen gezeigte Aktivitätsminderung von DRA ist folglich nicht durch eine reduzierte Expression des Anionenaustauschers in der Plasmamembran erklärbar. Darüber hinaus wurde die Tendenz zu einer etwas höheren relativen Oberflächenexpression von DRA im Vergleich zu DRA-ETKFminus in beiden Versuchsansätzen ermittelt, die allerdings nur nach achtfacher SNX27-Überexpression statistisch signifikant war. Gleichzeitig ist die Gesamtexpression von DRA-ETKFminus in allen von uns untersuchten Zelllinien deutlich höher als die von DRA [vgl. Abbildung 9 und Abbildung 10B]. Mutmaßlich erreicht bei einer so starken Überexpression relativ weniger DRA-ETKFminus die Oberfläche, wodurch eine geringere relative Oberflächenexpression gemessen wurde.

4.5 Lokalisation von SNX27 und Colokalisation mit DRA in 4C4-Zellen

Ein weiterer Untersuchungsschwerpunkt, der die bisherigen in EcR293-Zellen erhobenen Daten ergänzen sollte, stellte die mikroskopische Analyse von SNX27 und DRA in 4C4-Zellen dar. In dieser intestinalen Epithelzelllinie wurde zum einen die Lokalisation von SNX27 untersucht, zum anderen wurde auch die Colokalisation von DRA mit SNX27 in verschiedenen endosomalen Kompartimenten analysiert. Die Untersuchungen der 4C4-Zellen fanden elf Tage nach Erreichen der Konfluenz statt, da die Zellen zu diesem Zeitpunkt eine optimale Differenzierung aufweisen. Die verwendeten 4C4-Zellen verfügen über eine stabile, induzierbare Expression von EGFP-DRA bzw. EGFP-DRA-ETKFminus. Zusätzlich zur Identifizierung von DRA anhand seines EGFP-Tags wurden mithilfe der Immunfluoreszenz endogenes SNX27 und Rab5, Rab7 sowie Rab11 als Marker für frühe, späte und Recycling-Endosomen mit spezifischen Antikörpern angefärbt. Die Lokalisations- und Colokalisations-Untersuchungen erfolgten mithilfe der dreidimensionalen SR-SIM. Diese Mikroskopie-Technik ermöglicht eine besonders hohe Auflösung der Anordnung der Proteine in ihrem strukturellen intrazellulären Kontext.

4.5.1 Darstellung der Lokalisation von SNX27 und Colokalisation mit DRA in 4C4-Zellen anhand repräsentativer Aufnahmen

Zunächst erfolgte eine qualitative Begutachtung der mikroskopischen Aufnahmen hinsichtlich der in der Literatur beschriebenen Lokalisation von SNX27 in frühen Endosomen [siehe 1.4] und einer möglichen Colokalisation mit DRA. In **Abbildung 14** sind repräsentative SR-SIM-Aufnahmen der Zelllinien 4C4/EGFP-DRA [Abbildung 14A] und 4C4/EGFP-DRA-ETKFminus [Abbildung 14B] dargestellt. In diesen Zelllinien erfolgte zusätzlich ein Anfärben der endogen-exprimierten Proteine SNX27 und Rab5, einem Marker für frühe Endosomen.

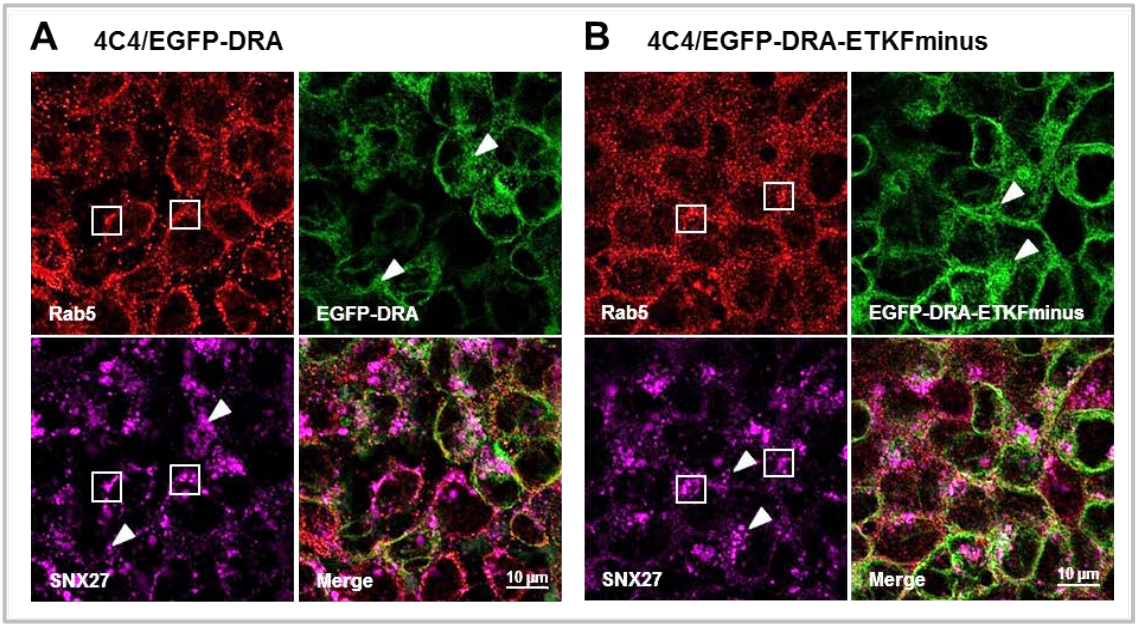


Abbildung 14: Repräsentative Superresolution Mikroskopie-Aufnahmen. In den Zelllinien 4C4/-EGFP-DRA (A) bzw. 4C4/EGFP-DRA-ETKFminus (B) wurden SNX27 sowie Rab5 als Marker für frühe Endosomen mittels Immunfluoreszenz angefärbt. Es ist jeweils die Lokalisation von SNX27 in Rab5-positiven Endosomen (Kästchen) und die Colokalisation mit DRA bzw. DRA-ETKFminus (Pfeile) zu erkennen. Die Bilder wurden mit dem LSM 780 ELYRA PS.1 (Carl Zeiss) aufgenommen.

Sowohl DRA als auch DRA-ETKFminus wurden in der Plasmamembran exprimiert. Darüber hinaus konnte ein großer Anteil des Anionenaustauschers bzw. der mutierten Form ohne PDZ-Interaktionsmotiv unterhalb der Zellmembran in intrazellulären Kompartimenten nachgewiesen werden. Weiterhin wurden auch Rab5 und SNX27 in beiden untersuchten Zelllinien intrazellulär lokalisiert. Anhand der dargestellten Kästchen ist darüber hinaus zu erkennen, dass SNX27 und Rab5 an der gleichen Stelle innerhalb der Zelle exprimiert wurden. Demzufolge konnte in beiden Zelllinien eine Lokalisation von SNX27 in Rab5-positiven frühen Endosomen nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigen die Pfeile, dass auch SNX27 und DRA [Abbildung 14A] intrazellulär an der gleichen Stelle nachweisbar waren. Folglich wurde eine Colokalisation

von DRA und SNX27 festgestellt. Obwohl in 4C4/EGFP-DRA-ETKFminus-Zellen aufgrund des fehlenden PDZ-Interaktionsmotivs von DRA keine Interaktion mit SNX27 stattfinden kann, wurde auch in dieser Zelllinie eine Colokalisation von DRA-ETKFminus und SNX27 beobachtet [Abbildung 14B].

Zusammenfassend zeigen die repräsentativen SR-SIM-Aufnahmen, dass sowohl DRA als auch DRA-ETKFminus mit SNX27 in frühen Endosomen colokalisieren.

4.5.2 Subzelluläre Verteilung von SNX27, DRA bzw. DRA-ETKFminus und Rab5, Rab7 sowie Rab11 in 4C4-Zellen

Bei der zuvor angewandten Form der Auswertung handelte es sich um eine rein qualitative Beurteilung der SR-SIM-Aufnahmen. Hierzu wurde eine einzelne, repräsentative Ebene des zuvor in den 4C4-Zellen aufgenommenen Z-Stapels ausgewählt, in der alle untersuchten Proteine exprimiert wurden. Mithilfe des Z-Stapel-Moduls wurden jedoch im Mittel elf Ebenen bei einer mittleren Gesamthöhe der Zellen von etwa 11 µm aufgenommen. Um zusätzliche, räumliche Informationen innerhalb der 4C4-Zellen zu erhalten, wurde daher in einem weiteren Ansatz die subzelluläre Lokalisation von SNX27, DRA bzw. DRA-ETKFminus sowie der Rab-Proteine und der Zellkerne untersucht. Hierzu erfolgte die Analyse der Verteilung der genannten Proteine und der mittels DAPI gefärbten Zellkerne entlang der Z-Achse in definierten ROIs, die einzelnen Zellen entsprachen und in denen alle untersuchten Proteine exprimiert wurden. Für jedes der sechs Experimente pro Zelllinie (Untersuchung von SNX27 und DRA bzw. DRA-ETKFminus in Rab5-, Rab7- und Rab11-positiven Endosomen) wurden zehn ROIs ausgewertet, die einzelnen Zellen entsprachen. Insgesamt wurden dadurch in jeder der beiden Zelllinien 30 Zellen hinsichtlich der Verteilung von SNX27, DRA bzw. DRA-ETKFminus und DAPI untersucht. Die Verteilung der unterschiedlichen Rab-Proteine wurde in je zehn Zellen analysiert. Dazu wurde zunächst die Position im Z-Stapel auf die relative Zellhöhe von basal bis apikal bezogen [vgl. Abbildung 6 auf Seite 43]. Anschließend erfolgte die auf die Zellhöhe bezogene Darstellung der relativen Fluoreszenz-Intensität.

In **Abbildung 15** ist die subzelluläre Verteilung der untersuchten Proteine und der Zellkerne entlang der relativen Zellhöhe im Vergleich der Zelllinien 4C4/EGFP-DRA und 4C4/EGFP-DRA-ETKFminus zusammengefasst.

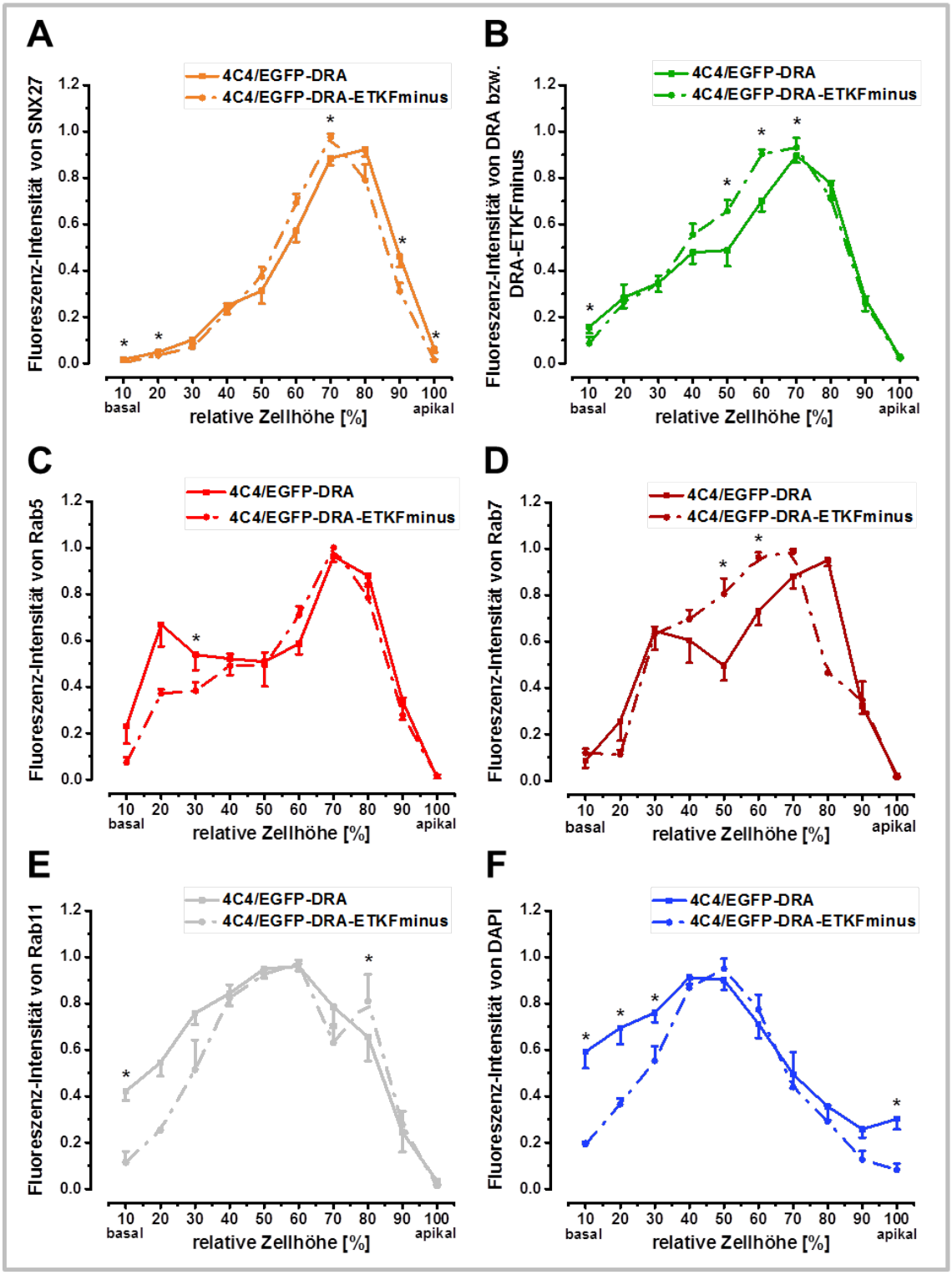


Abbildung 15: Subzelluläre Verteilung von SNX27 (A), DRA bzw. DRA-ETKFminus (B), der endosomalen Marker Rab5 (C), Rab7 (D) und Rab11 (E) sowie DAPI (F). Die Verteilung der Proteine wurde in den Zelllinien 4C4/EGFP-DRA und 4C4/EGFP-DRA-ETKFminus verglichen. Dargestellt ist die relative Fluoreszenz-Intensität in Abhängigkeit der relativen Zellhöhe von basal bis apikal nach Auswertung von zehn (C, D und E) bzw. 30 ROIs (A, B und F) pro Experiment. MW ± SEM; Mann-Whitney-U-Test; * $p < 0,05$.

Für endogenes SNX27 [Abbildung 15A] wurde in beiden Zelllinien eine weitgehend übereinstimmende subzelluläre Verteilung nachgewiesen. Dabei wurde im basalen

Bereich der Zellen nur eine geringe Fluoreszenz-Intensität des Proteins detektiert, die mit steigender relativer Zellhöhe zunahm. Bei einer relativen Zellhöhe von 70 - 80 % wurde in beiden Zelllinien das stärkste Fluoreszenz-Signal von SNX27 ermittelt, sodass von einer vorrangigen Expression des Proteins im apikalen Bereich der Zellen ausgegangen werden kann. Zwischen den Zelllinien existierten in erster Linie an den Zellpolen signifikante Unterschiede. In Nähe der basalen und auch der apikalen Zellmembran wurde mehr SNX27 in DRA-exprimierenden Zellen nachgewiesen (4C4/EGFP-DRA: 0,05 ± 0,01 bzw. 0,46 ± 0,05 vs. 4C4/EGFP-DRA-ETKFminus: 0,03 ± 0,02 bzw. 0,31 ± 0,04; exemplarisch bei 20 % bzw. 90 % der relativen Zellhöhe; $p < 0,05$). Zudem wurde eine etwas höhere Fluoreszenz-Intensität von SNX27 bei 70 % der Zellhöhe in DRA-ETKFminus-exprimierenden Zellen detektiert, die jedoch kein eindeutiges Muster erkennen ließ und mutmaßlich nicht biologisch relevant war (4C4/EGFP-DRA: 0,88 ± 0,03 vs. 4C4/EGFP-DRA-ETKFminus: 0,98 ± 0,01; $p < 0,05$).

Eine ähnliche Verteilung wurde auch für DRA und DRA-ETKFminus ermittelt [Abbildung 15B]. Die Fluoreszenz-Signale dieser Proteine waren in der Nähe des basalen Zellpols ebenfalls gering, während das Maximum der Intensitäten bei 70 % der relativen Zellhöhe lag. Im Vergleich zu DRA wurde mehr DRA-ETKFminus bei 50 - 70 % der relativen Zellhöhe nachgewiesen (4C4/EGFP-DRA: 0,49 ± 0,07; 0,70 ± 0,05 bzw. 0,90 ± 0,03 vs. 4C4/EGFP-DRA-ETKFminus: 0,66 ± 0,05; 0,90 ± 0,02 bzw. 0,93 ± 0,04 bei 50 %; 60 % bzw. 70 % der relativen Zellhöhe; $p < 0,05$). Allerdings wurden sowohl DRA als auch DRA-ETKFminus gleichermaßen in der Nähe der apikalen Zellmembran detektiert. Diese Daten stimmen mit den Beobachtungen in den repräsentativen SR-SIM-Aufnahmen zur Expression von DRA in der apikalen Membran sowie in intrazellulären Kompartimenten unterhalb der Plasmamembran überein.

Die Rab5-positiven frühen Endosomen [Abbildung 15C], Rab7-positiven späten Endosomen [Abbildung 15D] und Rab11-positiven Recycling-Endosomen [Abbildung 15E] waren hingegen etwas breiter entlang der Zellhöhe verteilt. Bereits in den basalen Abschnitten, aber auch in den apikalen Bereichen beider Zelllinien konnten alle drei endosomalen Marker nachgewiesen werden.

Die maximale Fluoreszenz-Intensität von Rab5 wurde in beiden Zelllinien bei einer relativen Zellhöhe von 70 % detektiert. Darüber hinaus wurde auch Fluoreszenz-Signal in basal gelegenen Zellabschnitten nachgewiesen. Die subzelluläre Verteilung der Rab5-positiven frühen Endosomen war in den untersuchten Zelllinien annähernd gleich. Ein statistisch signifikanter und höchstwahrscheinlich biologisch nicht bedeutsamer Unterschied wurde lediglich bei 30 % der relativen Zellhöhe festgestellt (4C4/EGFP-DRA: 0,54 ± 0,07 vs. 4C4/EGFP-DRA-ETKFminus: 0,38 ± 0,04; $p < 0,05$).

Im Gegensatz dazu wurden für Rab7 biologisch relevante Unterschiede zwischen den Zelllinien ermittelt. Bei 50 % und 60 % der relativen Zellhöhe wurde eine höhere Fluoreszenz-Intensität der Rab7-positiven späten Endosomen in den DRA-ETKFminus-exprimierenden Zellen detektiert (4C4/EGFP-DRA: 0,50 ± 0,06 bzw. 0,73 ± 0,06 vs. 4C4/EGFP-DRA-ETKFminus: 0,80 ± 0,07 bzw. 0,96 ± 0,02 bei 50 % bzw. 60 % der relativen Zellhöhe; $p < 0,05$). Rab7 konnte darüber hinaus ebenfalls in basalen Bereichen der DRA- und DRA-ETKFminus-exprimierenden Zellen nachgewiesen werden, die maximale Fluoreszenz-Intensität wurde jedoch bei einer relativen Zellhöhe von 70 - 80 % detektiert.

Die subzelluläre Verteilung der Rab11-positiven Recycling-Endosomen stimmte in beiden Zelllinien weitgehend überein. Das Maximum der Fluoreszenz-Intensität lag bei 60 % der relativen Zellhöhe. Einzelne Unterschiede zwischen den Zelllinien wurden lediglich am basalen Zellpol und bei 80 % der relativen Zellhöhe detektiert und sind mutmaßlich ohne biologische Relevanz (4C4/EGFP-DRA: 0,42 ± 0,04 bzw. 0,66 ± 0,10 vs. 4C4/EGFP-DRA-ETKFminus: 0,12 ± 0,05 bzw. 0,81 ± 0,11 bei 10 % bzw. 80 % der relativen Zellhöhe; $p < 0,05$).

Zusätzlich zu diesen Proteinen wurden die Zellkerne als interne Kontrolle mit DAPI angefärbt und deren Lokalisation entlang der Z-Achse ebenfalls mithilfe dieser Methode ausgewertet [Abbildung 15F]. Für die Zellkerne war ein von den bisher beschriebenen Proteinen abweichendes Verteilungs-Muster zu beobachten. Das Maximum der DAPI-Fluoreszenz-Intensität lag in beiden untersuchten Zelllinien bei 40 - 50 % der relativen Zellhöhe. Bereits im basalen Bereich der Zellen wurden die Kerne detektiert. Bei 10 - 30 % der relativen Zellhöhe wurde allerdings eine statistisch signifikant größere DAPI-Fluoreszenz-Intensität in der DRA-exprimierenden Zelllinie nachgewiesen (4C4/EGFP-DRA: 0,59 ± 0,07; 0,69 ± 0,07 bzw. 0,76 ± 0,04 vs. 4C4/EGFP-DRA-ETKFminus 0,19 ± 0,01; 0,37 ± 0,02 bzw. 0,55 ± 0,06 bei 10 %; 20 % bzw. 30 % der relativen Zellhöhe). In apikalen Bereichen der Zelle war hingegen wie erwartet deutlich weniger Fluoreszenz-Signal der gefärbten Zellkerne nachweisbar. Dennoch wurde am apikalen Zellpol ein statistisch signifikanter Unterschied detektiert (4C4/EGFP-DRA: 0,30 ± 0,05 vs. 4C4/EGFP-DRA-ETKFminus 0,08 ± 0,03; $p < 0,05$). Die Kernfärbung mit DAPI ist sehr effektiv und resultiert in einem sehr starken Signal. Obwohl die Färbungen parallel angefertigt und für die Aufnahmen stets die gleichen Einstellungen verwendet wurden, war DAPI in den 4C4/EGFP-DRA-Zellen möglicherweise überexponiert. Diese Überstrahlung des Signals hat mutmaßlich zu den hohen basalen und apikalen Fluoreszenz-Intensitäten geführt.

Im Allgemeinen war anhand der Darstellung auffällig, dass statistisch signifikante Unterschiede besonders an den Zellgrenzen detektiert wurden. In diesen Bereichen der Zellen wurden meist nur sehr geringe Fluoreszenz-Intensitäten detektiert, die vermutlich keine biologische Relevanz besitzen.
Insgesamt konnte eine sehr ähnliche subzelluläre Verteilung der untersuchten Proteine in beiden Zelllinien festgestellt werden. Unterschiede waren lediglich für DRA-ETKF-minus (im Vergleich zu DRA) und Rab7 nachweisbar. Beide Proteine wiesen im mittleren Bereich höhere Fluoreszenz-Intensitäten in den DRA-ETKFminus-exprimierenden Zellen auf.

In **Abbildung 16** sind die zuvor gezeigten Ergebnisse erneut dargestellt, um zusätzlich zu der subzellulären Verteilung jedes Proteins in den beiden unterschiedlichen Zelllinien [vgl. Abbildung 15] auch die verschiedenen untersuchten Proteine innerhalb der jeweiligen Zelllinie (4C4/EGFP-DRA [Abbildung 16A] bzw. 4C4/EGFP-DRA-ETKF-minus [Abbildung 16B]) zu vergleichen.

In beiden Zelllinien wurde eine unterschiedliche subzelluläre Verteilung von SNX27, DRA bzw. DRA-ETKFminus und DAPI nachgewiesen [oberer Teil von Abbildung 16A bzw. B]. Die zur Kontrolle angefärbten Zellkerne wiesen im basalen Bereich der Zellen wie erwartet statistisch signifikant höhere Fluoreszenz-Intensitäten auf als SNX27 und DRA bzw. DRA-ETKFminus, auf die jedoch nicht im Einzelnen eingegangen werden soll. Auch die Verteilung von SNX27 und DRA bzw. DRA-ETKFminus unterschied sich bereits in der basalen Zellhälfte. Bis zu einer relativen Zellhöhe von 50 % wurde im Vergleich zu SNX27 eine signifikant höhere Fluoreszenz-Intensität von DRA detektiert [Abbildung 16A] (SNX27: 0,10 ± 0,02; 0,25 ± 0,04 bzw. 0,31 ± 0,06 vs. DRA: 0,35 ± 0,04; 0,48 ± 0,05 bzw. 0,49 ± 0,07; exemplarisch bei 30 %; 40 % bzw. 50 % der relativen Zellhöhe; $p < 0,05$). In der DRA-ETKFminus-exprimierenden Zelllinie wurde ebenfalls bis zu einer relativen Zellhöhe von 60 % mehr DRA-ETKFminus als SNX27 nachgewiesen [Abbildung 16B] (SNX27: 0,22 ± 0,04; 0,37 ± 0,04 bzw. 0,69 ± 0,04 vs. DRA-ETKFminus: 0,55 ± 0,05; 0,66 ± 0,05 bzw. 0,90 ± 0,02; exemplarisch bei 40 %; 50 % bzw. 60 % der relativen Zellhöhe; $p < 0,05$). Allerdings wurden sowohl DRA bzw. DRA-ETKFminus als auch SNX27 vorrangig in apikalen Abschnitten beider Zelllinien detektiert. Das Maximum beider Proteine lag bei 70 - 80 % der relativen Zellhöhe und unterschied sich in diesem Bereich nicht voneinander. In den weiter oben gelegenen Zellabschnitten und am apikalen Zellpol gab es ebenfalls signifikante Unterschiede in den Fluoreszenz-Intensitäten von SNX27 und DRA (SNX27: 0,92 ± 0,03; 0,46 ± 0,05 bzw. 0,06 ± 0,01 vs. DRA: 0,77 ± 0,05; 0,28 ± 0,05 bzw. 0,03 ± 0,01 bei 80 %; 90 %

bzw. 100 % der relativen Zellhöhe; $p < 0,05$) bzw. DRA-ETKFminus (SNX27: 0,01 ± 0,00 vs. DRA-ETKFminus: 0,02 ± 0,01 bei 100 % der relativen Zellhöhe; $p < 0,05$). Allerdings waren die numerischen Unterschiede in diesem Bereich der Zellen deutlich geringer im Vergleich zu den basalen Bereichen.

Besonders im apikalen Teil der Zellen wurden somit übereinstimmende bzw. ähnliche subzelluläre Verteilungen von SNX27 und DRA bzw. DRA-ETKFminus nachgewiesen. Diese Ergebnisse liefern einen Hinweis darauf, dass SNX27 und DRA möglicherweise in diesem Teil der Zellen und damit in unmittelbarer Nähe der Plasmamembran interagieren.

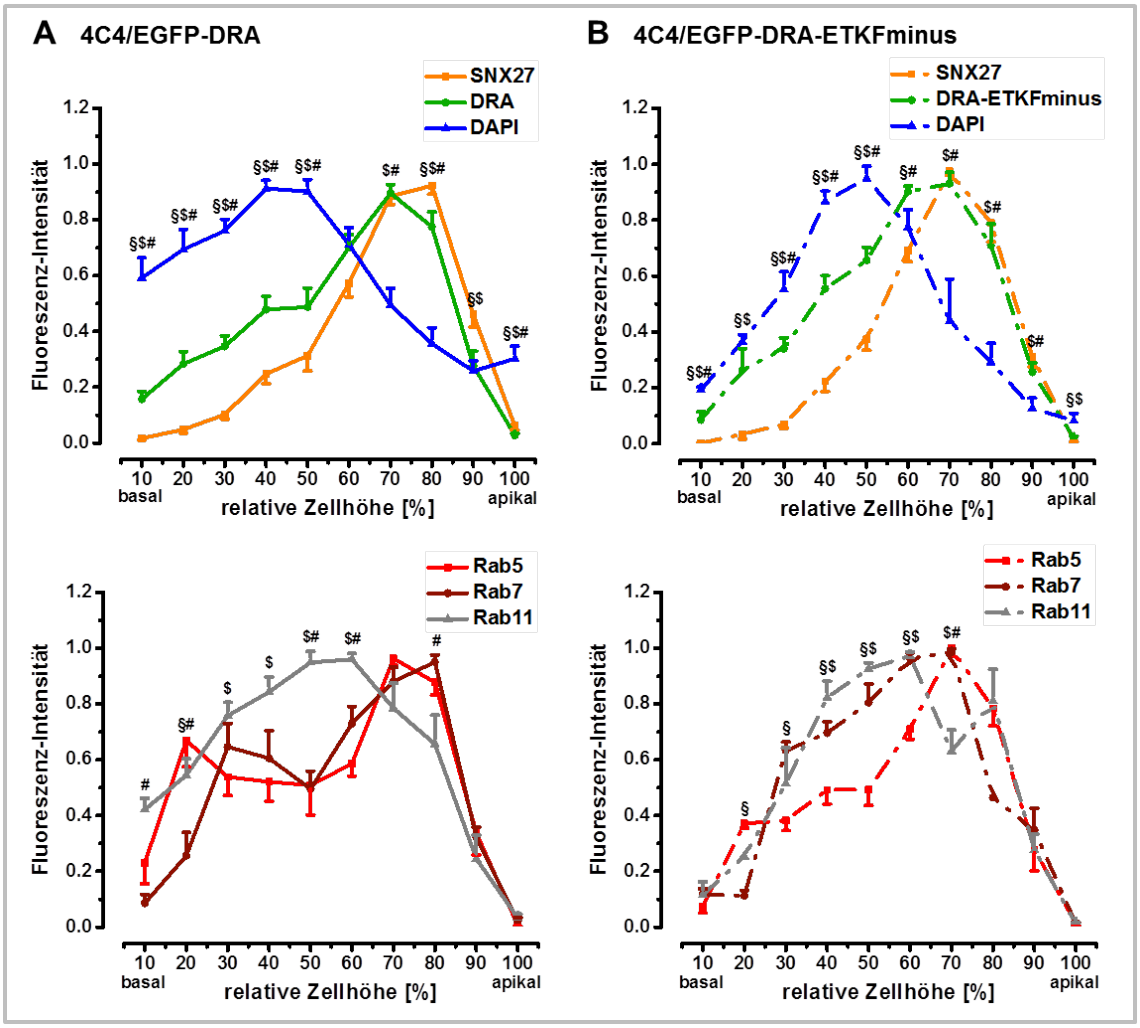


Abbildung 16: Vergleich der subzellulären Verteilung von SNX27, DRA bzw. DRA-ETKFminus und DAPI (oben) bzw. Rab5, Rab7 und Rab11 (unten) innerhalb der Zelllinien 4C4/EGFP-DRA (A) bzw. 4C4/EGFP-DRA-ETKFminus (B). Dargestellt ist die relative Fluoreszenz-Intensität in Abhängigkeit der relativen Zellhöhe von basal bis apikal nach Auswertung von zehn (oben) bzw. 30 (unten) ROIs pro Experiment. MW ± SEM; Mann-Whitney-U-Test; $^{§,\$}$ bzw. $^{\#}$ $p < 0,05$ [§: SNX27/DRA (oben) bzw. Rab5/Rab7 (unten); $: SNX27/DAPI (oben) bzw. Rab5/Rab11 (unten); #: DRA/DAPI (oben) bzw. Rab7/Rab11 (unten)].

Darüber hinaus wurden die subzellulären Verteilungen von Rab5-, Rab7- und Rab11-positiven Endosomen verglichen. Die Ergebnisse der DRA-exprimierenden Zelllinie

sind im unteren Teil von Abbildung 16A dargestellt. Nur bei 20 % der relativen Zellhöhe wurde eine einzelne und vermutlich biologisch irrelevante signifikant höhere Fluoreszenz-Intensität von Rab5 gegenüber Rab7 nachgewiesen (Rab5: 0,67 ± 0,09 vs. Rab7: 0,26 ± 0,08; $p < 0,05$). Im übrigen Teil der Zellen stimmte die Verteilung der Rab5-positiven frühen und der Rab7-positiven späten Endosomen überein. Einen deutlichen Unterschied gab es allerdings im Vergleich zu der Verteilung der Rab11-positiven Recycling-Endosomen. Im mittleren Bereich der Zellen wurde signifikant mehr Fluoreszenz-Intensität von Rab11 gegenüber Rab5 und Rab7 detektiert (Rab5: 0,51 ± 0,11 bzw. 0,59 ± 0,05 und Rab7: 0,50 ± 0,06 bzw. 0,73 ± 0,06 vs. Rab11: 0,95 ± 0,04 bzw. 0,96 ± 0,02; exemplarisch bei 50 % bzw. 60 % der relativen Zellhöhe; $p < 0,05$). Bei 80 % der relativen Zellhöhe war hingegen einmalig die Rab7- gegenüber der Rab11-Fluoreszenz-Intensität erhöht (Rab7: 0,95 ± 0,03 vs. Rab11: 0,66 ± 0,10; $p < 0,05$).

Folglich ist anhand der in der DRA-exprimierenden Zelllinie erhobenen Daten für Rab5-positive frühe Endosomen und Rab7-positive späte Endosomen von einer gleichartigen subzellulären Verteilung mit vorrangiger Expression im apikalen Bereich der Zellen auszugehen. Rab11-positive Recycling-Endosomen werden ebenfalls apikal exprimiert, sind allerdings auch vermehrt im mittleren Bereich der Zellen lokalisiert.

Im unteren Teil von Abbildung 16B ist darüber hinaus die subzelluläre Verteilung der Rab-Proteine in der DRA-ETKFminus-exprimierenden Zelllinie dargestellt. Im Bereich der relativen Zellhöhe von 30 - 60 % wurden signifikant höhere Fluoreszenz-Intensitäten von Rab7 im Vergleich zu Rab5 bestimmt (Rab5: 0,49 ± 0,05; 0,49 ± 0,06 bzw. 0,71 ± 0,04 vs. Rab7: 0,70 ± 0,04; 0,80 ± 0,07 bzw. 0,96 ± 0,02; exemplarisch bei 40 %; 50 % bzw. 60 % der relativen Zellhöhe; $p < 0,05$). Die subzelluläre Verteilung von Rab7- und Rab11-positiven Endosomen stimmte mit einer einzelnen, mutmaßlich biologisch nicht relevanten, Ausnahme bei einer relativen Zellhöhe von 70 % überein (Rab7: 0,99 ± 0,01 vs. Rab11: 0,63 ± 0,08; $p < 0,05$). Diese Unterschiede zu den Ergebnissen der DRA-exprimierenden Zellen sind auf die unterschiedliche Verteilung von Rab7 in den beiden Zelllinien zurückzuführen [vgl. Abbildung 15D]. Darüber hinaus wurden in den mittleren Abschnitten der Zellen (40 - 60 %) in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der 4C4/EGFP-DRA-Zellen signifikant höhere Fluoreszenz-Intensitäten von Rab11 im Vergleich zu Rab5 nachgewiesen (Rab5: 0,49 ± 0,05; 0,49 ± 0,06 bzw. 0,71 ± 0,04 vs. Rab11: 0,82 ± 0,06; 0,93 ± 0,02 bzw. 0,97 ± 0,02 bei 40 %; 50 % bzw. 60 % der relativen Zellhöhe; $p < 0,05$).

Demzufolge wurde in der DRA-ETKFminus-exprimierenden Zelllinie eine ähnliche subzelluläre Verteilung von Rab7-positiven späten Endosomen und Rab11-positiven

Recycling-Endosomen ermittelt. Im mittleren Bereich der Zellen wurden weniger Rab5-positive frühe Endosomen lokalisiert. Wie auch in der anderen Zelllinie gab es im apikalen Bereich der Zellen allerdings keine differente Verteilung der Rab-Proteine.

Aus den erhobenen Daten lassen sich folgende Aussagen für die subzelluläre Lokalisation der untersuchten Proteine in den 4C4-Zellen zusammenfassen:

- SNX27 und DRA bzw. DRA-ETKFminus weisen eine vergleichbare Lokalisation im apikalen Bereich der Zellen auf.
- Im Vergleich zu DRA-ETKFminus-exprimierenden Zellen ist in DRA-exprimierenden Zellen mehr SNX27 in der Nähe der apikalen Membran zu finden. Damit scheint die Lokalisation von SNX27 von einem verfügbaren Interaktionspartner abhängig zu sein.
- Im mittleren Bereich der Zellen befindet sich mehr DRA-ETKFminus als DRA.
- Rab5-positive frühe Endosomen, Rab7-positive späte Endosomen und Rab11-positive Recycling-Endosomen sind in DRA- und DRA-ETKFminus-exprimierenden Zellen vergleichbar im apikalen Bereich lokalisiert.
- Rab7-positive späte Endosomen weisen in DRA-exprimierenden Zellen eine ähnliche subzelluläre Verteilung wie Rab5-positive frühe Endosomen vorrangig im apikalen Bereich der Zellen auf.
- In DRA-ETKFminus-exprimierenden Zellen sind Rab7-positive späte Endosomen ähnlich wie Rab11-positive Recycling-Endosomen auch im mittleren Bereich der Zellen lokalisiert.

4.5.3 Colokalisation von SNX27 und DRA in Rab5-, Rab7- und Rab11-positiven Endosomen in 4C4-Zellen

Nachdem zunächst die qualitative Begutachtung der SR-SIM-Aufnahmen und die quantitative Analyse der subzellulären Verteilung von SNX27, DRA bzw. DRA-ETKFminus und den Rab-Proteinen erfolgt waren, wurde anschließend die Colokalisation der Proteine untersucht. Nach eigenem Kenntnisstand wurde damit erstmalig eine Quantifizierung der Colokalisation von SR-SIM-Daten in 4C4-Zellen durchgeführt. Dazu wurden zunächst mithilfe des entsprechenden Moduls der ZEN-Software von Carl Zeiss die Manders Colokalisations-Koeffizienten als Parameter für die Colokalisation von jeweils zwei Proteinen in jeder Ebene des aufgenommenen Z-Stapels bestimmt. In Anlehnung an das unter 3.6 beschriebene Verfahren erfolgte ein Bezug der aufgenommenen Z-Stapel auf die relative Zellhöhe [vgl. Abbildung 6 auf Seite 43]. Die Manders Colokalisations-Koeffizienten wurden anschließend in Abhängigkeit der relativen Zell-

höhe aufgetragen. Für jedes der durchgeführten Experimente erfolgte eine Auswertung von zehn ROIs, die als einzelne Zellen definiert wurden. Da die Colokalisation von DRA mit SNX27 sowohl in Rab5- als auch Rab7- und Rab11-gefärbten Zellen untersucht werden konnte, wurden in jeder der beiden Zelllinien hierfür insgesamt 30 ROIs ausgewertet.

Die Ergebnisse der Colokalisations-Experimente sind in **Abbildung 17** dargestellt. Gezeigt ist die Colokalisation von SNX27 mit den Rab-Proteinen [Abbildung 17A], von DRA bzw. DRA-ETKFminus mit den Rab-Proteinen [Abbildung 17B] und von DRA bzw. DRA-ETKFminus mit SNX27 [Abbildung 17C]. Die Ergebnisse wurden in den Zelllinien 4C4/EGFP-DRA und 4C4/EGFP-DRA-ETKFminus gewonnen.

Zunächst wurde die Colokalisation von SNX27 mit jeweils Rab5-, Rab7- und Rab11-positiven Endosomen ermittelt und damit die intrazelluläre Lokalisation von SNX27 bestimmt. Diese Daten wurden in DRA- und DRA-ETKFminus-exprimierenden Zellen verglichen, um außerdem einen möglichen Einfluss von DRA als verfügbarem Interaktionspartner auf die Lokalisation von SNX27 zu bestimmen [Abbildung 17A].
SNX27 colokalisierte in beiden Zelllinien gleichermaßen mit Rab5-positiven Endosomen. Die Colokalisation der Proteine war dabei entlang der gesamten relativen Zellhöhe nachweisbar. In den DRA-ETKFminus-exprimierenden Zellen wurden in den apikalen Zellabschnitten etwas höhere Manders Colokalisations-Koeffizienten detektiert, wobei die Unterschiede im Vergleich zu den DRA-exprimierenden Zellen jedoch nicht statistisch signifikant waren.
Die Manders Colokalisations-Koeffizienten für SNX27 und Rab7 waren ebenfalls gleichmäßig entlang der Zellachse verteilt. Allerdings wurden höhere Manders Colokalisations-Koeffizienten in den DRA-ETKFminus-exprimierenden Zellen nachgewiesen (4C4/EGFP-DRA: 0,04 ± 0,01; 0,04 ± 0,01 bzw. 0,04 ± 0,01 vs. 4C4/EGFP-DRA-ETKFminus: 0,09 ± 0,01; 0,17 ± 0,02 bzw. 0,13 ± 0,01; exemplarisch bei 50 %; 60 % bzw. 70 % der relativen Zellhöhe; $p < 0,05$).
Ein vergleichbares Ergebnis wurde auch für die Colokalisation von SNX27 mit Rab11-positiven Endosomen ermittelt. Hier wurden entlang der gesamten Zellhöhe ebenfalls höhere Manders-Colokalisations-Koeffizienten in den DRA-ETKFminus-exprimierenden Zellen detektiert (4C4/EGFP-DRA: 0,08 ± 0,01; 0,06 ± 0,01 bzw. 0,04 ± 0,00 vs. 4C4/EGFP-DRA-ETKFminus: 0,18 ± 0,01; 0,15 ± 0,02 bzw. 0,15 ± 0,02; exemplarisch bei 60 %; 70 % bzw. 80 % der relativen Zellhöhe; $p < 0,05$).
Folglich konnte SNX27 in beiden Zelllinien gleichermaßen in Rab5-positiven frühen Endosomen lokalisiert werden. In DRA-ETKFminus-exprimierenden Zellen wurde

hingegen auch eine vermehrte Colokalisation von SNX27 mit Rab7-positiven späten Endosomen und Rab11-positiven Recycling-Endosomen nachgewiesen.

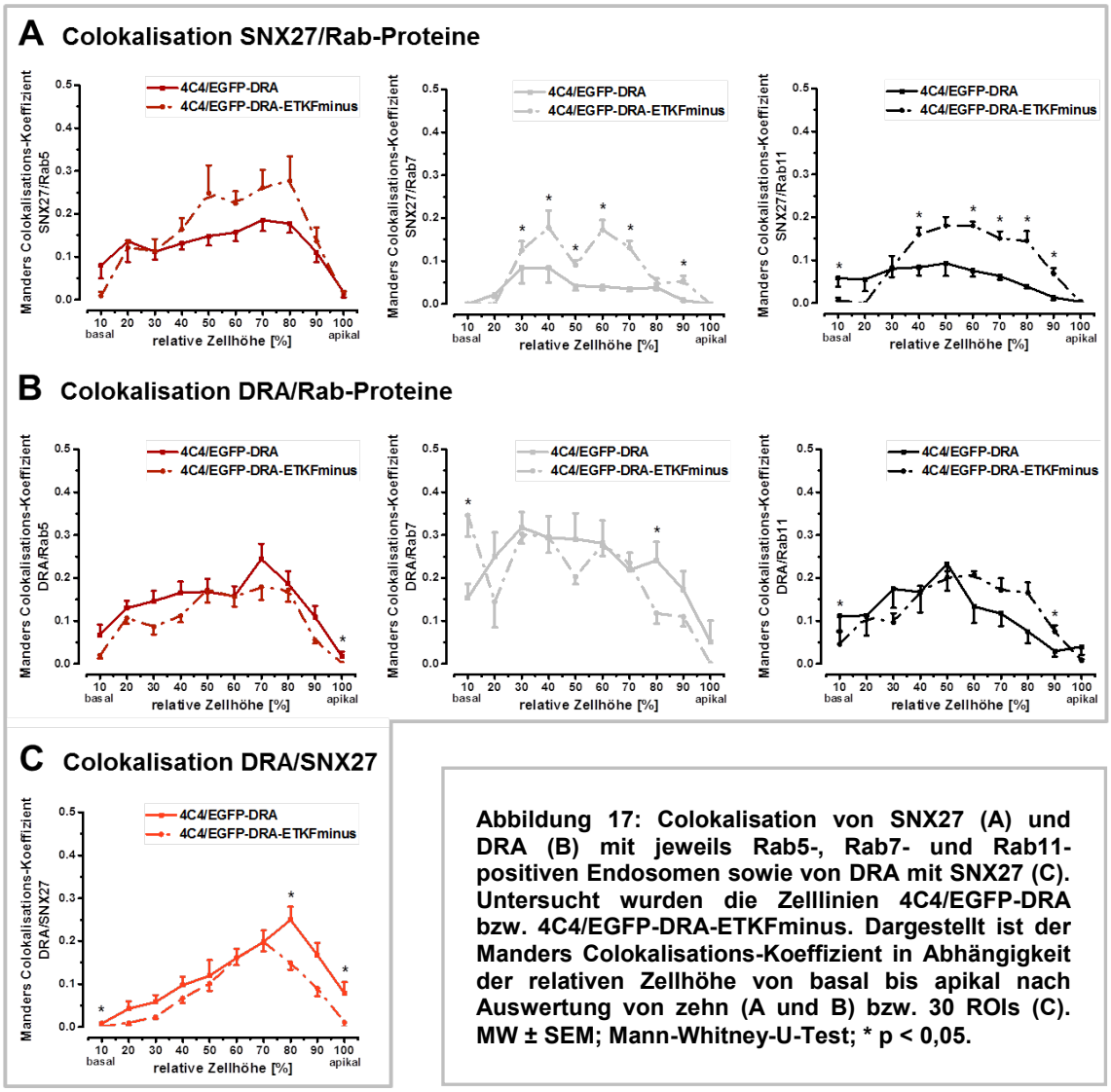


Abbildung 17: Colokalisation von SNX27 (A) und DRA (B) mit jeweils Rab5-, Rab7- und Rab11-positiven Endosomen sowie von DRA mit SNX27 (C). Untersucht wurden die Zelllinien 4C4/EGFP-DRA bzw. 4C4/EGFP-DRA-ETKFminus. Dargestellt ist der Manders Colokalisations-Koeffizient in Abhängigkeit der relativen Zellhöhe von basal bis apikal nach Auswertung von zehn (A und B) bzw. 30 ROIs (C). MW ± SEM; Mann-Whitney-U-Test; * p < 0,05.

Abbildung 17B zeigt die Colokalisation von DRA bzw. DRA-ETKFminus mit jeweils Rab5-, Rab7- und Rab11-positiven Endosomen. Die Daten wurden in den Zelllinien 4C4/EGFP-DRA und 4C4/EGFP-DRA-ETKFminus gewonnen.

DRA und DRA-ETKFminus colokalisierten entlang der gesamten Zellhöhe gleichermaßen mit Rab5-positiven frühen Endosomen. Lediglich am apikalen Zellpol wurde ein numerisch signifikant höherer Manders Colokalisations-Koeffizient von DRA im Vergleich zu DRA-ETKFminus festgestellt (4C4/EGFP-DRA: 0,02 ± 0,01 vs. 4C4/EGFP-DRA-ETKFminus: 0,00 ± 0,00; $p < 0,05$). Diese häufig an den Zellgrenzen detektierten Unterschiede basieren vermutlich auf den nur noch sehr geringen Manders Colokalisations-Koeffizienten und werden daher im Folgenden nicht mehr gesondert beschrieben.

Weiterhin waren in beiden Zelllinien ähnliche Manders Colokalisations-Koeffizienten für DRA und Rab7-positive späte Endosomen nachweisbar. Die Colokalisation war bereits in basalen Zellabschnitten zu beobachten und besonders im mittleren Bereich der Zellen ausgeprägt. In Richtung des apikalen Zellpols kam es in beiden Zelllinien zu einer leichten Abnahme der Manders Colokalisations-Koeffizienten. Lediglich bei 80 % der relativen Zellhöhe wurde eine stärkere Colokalisation von DRA im Vergleich zu DRA-ETKFminus ermittelt (4C4/EGFP-DRA: 0,24 ± 0,04 vs. 4C4/EGFP-DRA-ETKF-minus: 0,12 ± 0,02; $p < 0,05$).
Für die Colokalisation von DRA mit Rab11-positiven Recycling-Endosomen gab es im basalen Bereich der Zellen ebenfalls keine wesentlichen Unterschiede in den beiden Zelllinien. In den apikalen Zellabschnitten wurde jedoch eine etwas stärkere Colokalisation von DRA-ETKFminus mit Rab11 beobachtet. Allerdings wurde nur bei 90 % der relativen Zellhöhe ein signifikant höherer Manders Colokalisations-Koeffizient in den DRA-ETKFminus-exprimierenden Zellen nachgewiesen (4C4/EGFP-DRA: 0,03 ± 0,01 vs. 4C4/EGFP-DRA-ETKFminus: 0,08 ± 0,01; $p < 0,05$).
Demnach wurde nur in einzelnen, apikalen Zellabschnitten eine höhere Colokalisation von DRA in Rab7-positiven späten Endosomen und von DRA-ETKFminus in Rab11-positiven Recycling-Endosomen gefunden.

Darüber hinaus wurde auch die Colokalisation von DRA bzw. DRA-ETKFminus mit SNX27 in den beiden Zelllinien bestimmt [Abbildung 17C]. Abgesehen vom basalen Zellpol gab es bis zu einer relativen Zellhöhe von 70 % keinen Unterschied in der Colokalisation von DRA bzw. DRA-ETKFminus mit SNX27. In den apikalen Zellabschnitten konnte allerdings eine signifikant stärkere Colokalisation von DRA mit SNX27 im Vergleich zu DRA-ETKFminus nachgewiesen werden (4C4/EGFP-DRA: 0,25 ± 0,03 bzw. 0,08 ± 0,03 vs. 4C4/EGFP-DRA-ETKFminus: 0,15 ± 0,02 bzw. 0,01 ± 0,01 bei 80 % bzw. 100 % der relativen Zellhöhe; $p < 0,05$).
Als wesentlicher Befund wurde somit die stärkere Colokalisation von DRA mit SNX27 im Vergleich zu DRA-ETKFminus im apikalen Bereich der Zellen beobachtet.

Zusätzlich erfolgte die Darstellung dieser Ergebnisse als Vergleich der Colokalisation von SNX27 bzw. DRA oder DRA-ETKFminus mit Rab5-, Rab7- und Rab11-positiven Endosomen innerhalb der Zelllinien 4C4/EGFP-DRA und 4C4/EGFP-DRA-ETKFminus [**Abbildung 18**].

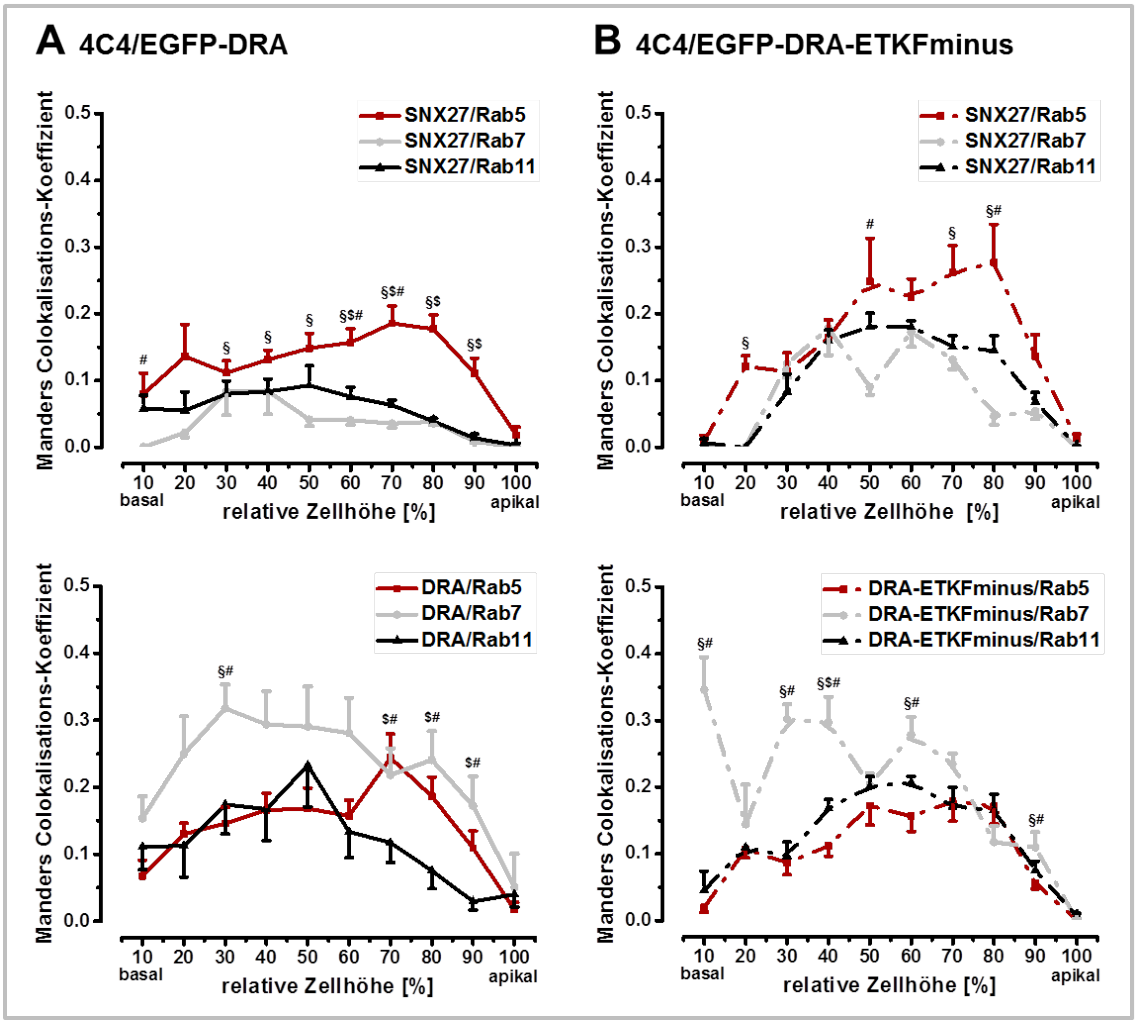


Abbildung 18: Vergleich der Colokalisation von SNX27 (oben) und DRA bzw. DRA-ETKFminus (unten) mit jeweils Rab5-, Rab7- und Rab11-positiven Endosomen innerhalb der Zelllinien 4C4/EGFP-DRA (A) und 4C4/EGFP-DRA-ETKFminus (B). Dargestellt ist der Manders Colokalisations-Koeffizient in Abhängigkeit der relativen Zellhöhe von basal bis apikal nach Auswertung von zehn ROIs. MW ± SEM; Mann-Whitney-U-Test; $^{§,\$}$ bzw. $^{\#}$ $p < 0,05$ [§: SNX27/Rab5 und SNX27/Rab7 (oben) bzw. DRA/Rab5 und DRA/Rab7 (unten); $: SNX27/Rab5 und SNX27/Rab11 (oben) bzw. DRA/Rab5 und DRA/Rab11 (unten); #: SNX27/Rab7 und SNX27/Rab11 (oben) bzw. DRA/Rab7 und DRA/Rab11 (unten)].

Im oberen Teil der Abbildung ist zunächst der Vergleich der Colokalisation von SNX27 mit Rab5-, Rab7- und Rab11-positiven Endosomen in den DRA- [Abbildung 18A] bzw. DRA-ETKFminus-exprimierenden Zellen [Abbildung 18B] dargestellt.

In den DRA-exprimierenden Zellen wurde entlang der gesamten Zellhöhe eine signifikant stärkere Colokalisation von SNX27 mit Rab5 im Vergleich zu Rab7 ermittelt. Darüber hinaus war in den apikalen Zellabschnitten auch eine vermehrte Colokalisation von SNX27 mit Rab5 im Vergleich zu Rab11 nachweisbar. Zudem colokalisierte SNX27 mehr mit Rab11 im Vergleich zu Rab7 bei 60 % und 70 % der relativen Zellhöhe (SNX27/Rab5: 0,16 ± 0,02 bzw. 0,19 ± 0,03; SNX27/Rab7: 0,04 ± 0,01 bzw. 0,04 ± 0,01 vs. SNX27/Rab11: 0,08 ± 0,01 bzw. 0,06 ± 0,01; exemplarisch bei 60 % bzw. 70 % der relativen Zellhöhe; $p < 0,05$).

In den DRA-ETKFminus-exprimierenden Zellen wurde ebenfalls eine signifikant höhere Colokalisation von SNX27 mit Rab5 gegenüber Rab7 detektiert (SNX27/Rab5: 0,12 ± 0,02; 0,26 ± 0,04 bzw. 0,28 ± 0,06 vs. SNX27/Rab7: 0,00 ± 0,00; 0,13 ± 0,01 bzw. 0,05 ± 0,01 bei 20 %; 70 % bzw. 80 % der relativen Zellhöhe; $p < 0,05$). Allerdings war kein Unterschied in der Colokalisation von SNX27 mit Rab5 im Vergleich zu Rab11 nachweisbar. Weiterhin wurden bei 50 % und 80 % der relativen Zellhöhe signifikant höhere Manders Colokalisations-Koeffizienten von SNX27 mit Rab11 im Vergleich zu Rab7 ermittelt (SNX27/Rab7: 0,09 ± 0,01 bzw. 0,05 ± 0,01 vs. SNX27/Rab11: 0,18 ± 0,02 bzw. 0,15 ± 0,02 bei 50 % bzw. 80 % der relativen Zellhöhe; $p < 0,05$).
Zusammenfassend war SNX27 in der Zelllinie 4C4/EGFP-DRA mehr mit Rab5- als mit Rab7-positiven Endosomen und in apikalen Zellabschnitten auch mehr als mit Rab11-positiven Endosomen colokalisiert. Demzufolge ist von einer vorrangigen Colokalisation von SNX27 mit Rab5-positiven frühen Endosomen auszugehen.
In den 4C4/EGFP-DRA-ETKFminus-Zellen war besonders im apikalen Bereich ebenfalls eine signifikant stärkere Colokalisation von SNX27 mit Rab5- im Vergleich zu Rab7-positiven Endosomen, jedoch nicht im Vergleich zu Rab11-positiven Endosomen nachweisbar. Somit ist SNX27 in der DRA-ETKFminus-exprimierenden Zelllinie vorrangig mit Rab5-positiven frühen Endosomen, aber auch in Rab11-positiven Recycling-Endosomen colokalisiert.

Der untere Teil von Abbildung 18 zeigt darüber hinaus die Colokalisation von DRA bzw. DRA-ETKFminus mit Rab5-, Rab7- und Rab11-positiven Endosomen in den Zelllinien 4C4/EGFP-DRA [Abbildung 18A] und 4C4/EGFP-DRA-ETKFminus [Abbildung 18B].
In den DRA-exprimierenden Zellen wurden im apikalen Bereich signifikant höhere Manders Colokalisations-Koeffizienten von DRA mit Rab5 und mit Rab7 im Vergleich zu Rab11 nachgewiesen (DRA/Rab5: 0,24 ± 0,04; 0,19 ± 0,03 bzw. 0,11 ± 0,03 vs. DRA/Rab7: 0,22 ± 0,04; 0,24 ± 0,04 bzw. 0,17 ± 0,04 vs. DRA/Rab11: 0,12 ± 0,03; 0,08 ± 0,03 bzw. 0,03 ± 0,01 bei 70 %; 80 % bzw. 90 % der relativen Zellhöhe; $p < 0,05$). DRA colokalisierte mit einer Ausnahme bei 30 % der relativen Zellhöhe gleichermaßen mit Rab5 und Rab7 (DRA/Rab5: 0,15 ± 0,02 vs. DRA/Rab7: 0,32 ± 0,04; $p < 0,05$).
In den DRA-ETKFminus-exprimierenden Zellen waren die Manders Colokalisations-Koeffizienten von DRA-ETKFminus mit Rab7-positiven Endosomen besonders in den basalen und mittleren Anteilen der Zellen unregelmäßig. In diesem Bereich und auch bei 90 % der relativen Zellhöhe wurde eine signifikant stärkere Colokalisation von DRA-ETKFminus mit Rab7 im Vergleich zu Rab5 und Rab11 detektiert (DRA-

ETKFminus/Rab5: 0,09 ± 0,02; 0,16 ± 0,02 bzw. 0,06 ± 0,01 vs. DRA-ETKFminus/ Rab7: 0,30 ± 0,02; 0,28 ± 0,03 bzw. 0,11 ± 0,02 vs. DRA-ETKFminus/Rab11: 0,10 ± 0,02; 0,21 ± 0,01 bzw. 0,08 ± 0,01; exemplarisch bei 30 %; 60 % bzw. 90 % der relativen Zellhöhe; $p < 0,05$). Für die Colokalisation von DRA-ETKFminus mit Rab5 und mit Rab11 gab es mit einer einzelnen Ausnahme bei 40 % der relativen Zellhöhe keinen Unterschied (DRA-ETKFminus/Rab5: 0,11 ± 0,02 vs. DRA-ETKFminus/Rab11: 0,17 ± 0,01; $p < 0,05$).
Folglich colokalisiert DRA im apikalen Bereich der Zellen gleichermaßen mit Rab5-positiven frühen Endosomen und Rab7-positiven späten Endosomen, jedoch nicht mit Rab11-positiven Recycling-Endosomen.
Im Gegensatz dazu fand in vielen Abschnitten der Zellen eine vorrangige Colokalisation von DRA-ETKFminus mit Rab7-positiven späten Endosomen statt. Darüber hinaus gibt es keinen Unterschied in der Colokalisation von DRA-ETKFminus mit Rab5-positiven frühen Endosomen und Rab11-positiven Recycling-Endosomen.

Zusammenfassend ergeben die Daten der Colokalisations-Untersuchungen in den 4C4-Zellen folgendes Bild:

- In apikalen Bereichen der Zellen findet eine Colokalisation von DRA mit SNX27 statt.
- SNX27 colokalisiert mit Rab5-positiven frühen Endosomen.
- In DRA-ETKFminus-exprimierenden Zellen findet im Vergleich zu DRA-exprimierenden Zellen darüber hinaus auch eine geringe Colokalisation von SNX27 mit Rab7-positiven späten Endosomen und vor allem mit Rab11-positiven Recycling-Endosomen statt.
- DRA colokalisiert gleichermaßen mit Rab5-positiven frühen Endosomen und Rab7-positiven späten Endosomen im apikalen Bereich der Zellen.
- DRA-ETKFminus kommt vergleichbar in Rab5- und Rab11-positiven Kompartimenten vor und ist in vielen Zellabschnitten vorrangig mit Rab7-positiven späten Endosomen colokalisiert.

5 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit war es, die funktionelle Bedeutung der Interaktion des Anionenaustauschers DRA mit dem intrazellulären PDZ-Adapterprotein SNX27 zu charakterisieren. DRA ist ein Cl^-/HCO_3^--Austauscher, der gemeinsam mit NHE3 die elektroneutrale Absorption von NaCl im Ileum und im proximalen Kolon vermittelt [13]. Die Interaktion von DRA mit den PDZ-Adapterproteinen der NHERF-Familie ist für dessen Regulation entscheidend [55, 65, 72]. In einer vorangegangenen Masterarbeit wurde SNX27 als NHERF-Familienmitglied identifiziert [122]. SNX27 ist ein physiologisch relevantes und strukturell einzigartiges Protein, das als einziges Sorting Nexin eine PDZ-Domäne besitzt [108, 157]. Anhand der eigenen Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass die PDZ-Domäne von SNX27 spezifisch an das C-terminale PDZ-Bindemotiv von DRA bindet, das sich aus den Aminosäuren Glutamat, Threonin, Lysin und Phenylalanin (ETKF) zusammensetzt. Diese Interaktion besitzt eine vergleichbare Affinität wie mit den bereits bekannten NHERF-Familienmitgliedern [122].

In der Literatur wurden für SNX27 die Lokalisation in frühen Endosomen, einer entscheidenden Schnittstelle bei der Sortierung von Proteinen, und eine Funktion beim Recycling gebundener Proteine beschrieben [112, 126]. Hieraus lässt sich als Hypothese eine mögliche Bedeutung von SNX27 für das Recycling von DRA ableiten. Daher wurde der Einfluss von SNX27 auf die Aktivität und die Oberflächenexpression des Anionenaustauschers analysiert. Zusätzlich erfolgten Untersuchungen zur Lokalisation und Colokalisation von DRA und SNX27 sowie von Rab5, Rab7 und Rab11 als Marker unterschiedlicher endosomaler Kompartimente. In den folgenden Abschnitten werden methodische Aspekte und die Ergebnisse der vorliegenden Promotionsarbeit diskutiert.

5.1 Zellmodelle und SNX27-Expressionsbedingungen

SNX27 besitzt eine wichtige Funktion bei der Sortierung und dem Recycling von Interaktionspartnern. Allerdings existiert in der Literatur eine Unstimmigkeit hinsichtlich der Funktion von nativem und überexprimiertem SNX27 [112]. In unterschiedlichen Arbeiten wurden eine gesteigerte Endozytose und der Abbau gebundener Proteine unter Überexpressionsbedingungen von SNX27 beschrieben [112, 115, 124, 127]. Im Gegensatz dazu führte die Depletion von nativem SNX27 zu einem gestörten Recycling, einer verringerten Oberflächenexpression und einer reduzierten Aktivität der Proteine [112, 119, 126].

Basierend auf diesen kontroversen Ergebnissen wurden in der vorliegenden Promotionsarbeit verschiedene Expressionsbedingungen von SNX27 betrachtet. Die Untersuchung der Bedeutung von SNX27 für die Funktion von DRA erfolgte *in vitro* in unterschiedlichen Zellmodellen mit regulierbaren Expressionssystemen.

Zum einen wurde ein Ecdyson-induzierbares System genutzt, das eine enge Regulation der Expression von SNX27 in EcR293-Zellen ermöglichte. Weiterhin diente diese Modellzelllinie der stabilen Expression und funktionellen Untersuchung von DRA. Mithilfe des induzierbaren Expressionssystems wurde der Einfluss von SNX27 auf die Aktivität und die Oberflächenexpression von DRA anhand einer leichten und einer mäßigen SNX27-Überexpression untersucht. Darüber hinaus wurde die funktionelle Bedeutung eines Knockdowns (KD) von SNX27 in den EcR293-Zellen analysiert.

Die RNAi stellt ein bedeutendes Werkzeug für die Untersuchung der Funktion von Genen dar. Für den SNX27 KD wurde Vektor-basierte shRNA verwendet, die eine hohe Transfektionseffizienz sowie die Etablierung eines stabilen und beständigen KD in den EcR293-Zellen erlaubte [147]. Im Gegensatz zu der häufig eingesetzten und chemisch synthetisierten small interfering RNA (siRNA) reichen zudem verhältnismäßig geringe Dosen der endogen prozessierten shRNA, um ein *gene silencing* zu erzielen. Durch die hohe und potentiell toxische Konzentration der zytoplasmatischen siRNAs kommt es hingegen häufig zu sogenannten Off-Target-Effekten [158]. Ein weiterer Vorteil der shRNA-vermittelten RNAi war, dass der genetische Code nicht verändert und das endogene SNX27 nicht komplett ausgeschaltet wurde. Anhand eines KO-Mausmodells konnte bereits gezeigt werden, dass SNX27 für das postnatale Überleben und Wachstum essentiell ist [114]. Demzufolge wurde in dem verwendeten Zellmodell lediglich eine partielle Reduktion der Funktion von SNX27 untersucht und damit eine mögliche Schädigung der Zellen vermieden.

Zum anderen wurde mit dem Tet-Off®-System ein weiteres gut charakterisiertes, hoch spezifisches und zuverlässiges regulierbares Genexpressionssystem eingesetzt, das für die induzierbare Expression von EGFP-DRA in den 4C4-Zellen genutzt wurde. Diese auf einem Caco2-Zellklon basierende intestinale Epithelzelllinie besitzt die besondere Eigenschaft einer spontanen Differenzierung und weist morphologische sowie funktionelle Charakteristika auf, die mit einem normalen humanen Dünndarm vergleichbar sind [155]. Daher sind die 4C4-Zellen für Untersuchungen intestinaler Funktionen geeignet und wurden in der vorliegenden Arbeit für die Lokalisations- und Colokalisations-Versuche verwendet. Hierbei wurde in Ergänzung zur Überexpression und zum SNX27 KD in EcR293-Zellen die endogene Expression von SNX27 in intestinalen Epithelzellen untersucht und damit weitgehend physiologische Bedingungen betrachtet.

Sowohl die EcR293- als auch die 4C4-Zellen wiesen zu Beginn der Arbeiten bereits eine stabile Expression von EGFP-markiertem DRA bzw. DRA-ETKFminus auf. Darüber hinaus erfolgte in den EcR293-Zellen eine zusätzliche stabile Transfektion mit BFP-SNX27 bzw. mit shRNA.

Transiente und stabile Transfektionen mit Expressionsvektoren sind von großer Bedeutung für die Aufdeckung von Gen- bzw. Protein-Funktionen. Allerdings gibt es im Rahmen solcher Transfektionen eine Vielzahl an Einflussfaktoren, die zelluläre Ereignisse hervorrufen und dadurch biochemische Prozesse beeinflussen können [159]. Bei experimentellen Manipulationen der Zellen können der Vektor selbst, das Transfektions-Reagenz, die Expression eines Resistenzgens und die Antibiotika-Selektion zellulären Stress auslösen. Dadurch können neben der Funktion der manipulierten Gene selbst auch weitere unspezifische und ungewollte genomische, epigenetische oder phänotypische Veränderungen auftreten [159]. Möglicherweise kommt es deshalb zu den oben bereits erwähnten Veränderungen der SNX27-Funktion unter Überexpressionsbedingungen, die sich grundlegend von den publizierten Erkenntnissen zur Funktion von nativem SNX27 unterscheidet.

Der entscheidende Vorteil der verwendeten Zellkultursysteme ist die Expression der mutierten Form von DRA ohne PDZ-Interaktionsmotiv (DRA-ETKFminus). Mit DRA-ETKFminus ist eine Negativkontrolle verfügbar, die in der Plasmamembran exprimiert wird und funktionell aktiv ist. Der Vergleich von DRA und DRA-ETKFminus ermöglicht somit die spezifische Betrachtung der PDZ-Interaktion und nachfolgend der PDZ-abhängigen Funktion des Transporters.

Insgesamt wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Zellmodelle und Expressionsbedingungen von SNX27 kombiniert. In EcR293-Zellen wurden der Einfluss einer leichten sowie einer mäßigen SNX27-Überexpression und eines SNX27 KD auf die Aktivität und Oberflächenexpression von DRA untersucht. Zudem wurde in 4C4-Zellen die Lokalisation von endogen exprimiertem SNX27 analysiert und die Colokalisation von DRA mit SNX27 in unterschiedlichen endosomalen Kompartimenten bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden im Folgenden diskutiert.

5.2 Einfluss von SNX27 auf die Aktivität und die Oberflächenexpression von DRA

Für die Gesamtaktivität eines Transporters spielt neben der individuellen Aktivität der einzelnen Transportermoleküle auch die Anzahl der Transporter in der Plasmamembran eine Rolle [21]. Darüber hinaus kann die Expression der Transporter in

funktionellen Domänen der Plasmamembran einen Einfluss auf die Aktivität haben. Aus diesem Grund wurde der Einfluss der verschiedenen SNX27-Expressionsbedingungen auf die Aktivität und die Oberflächenexpression von DRA untersucht. Die Ergebnisse hierzu werden in den folgenden Abschnitten 5.2.1 und 5.2.2 diskutiert und im Abschnitt 5.2.3 in einen gemeinsamen Kontext gebracht.

5.2.1 Einfluss von SNX27 auf die Aktivität von DRA

Mithilfe der fluorometrischen Messung des intrazellulären pH-Wertes (pH_i) wurde die Aktivität von DRA und DRA-ETKFminus in Abhängigkeit der SNX27-Expression bestimmt. Die DRA-vermittelten Veränderungen des pH_i wurden durch das Entfernen und die Wiederzugabe von extrazellulärem Chlorid induziert und mithilfe des grün fluoreszierenden, pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffs BCECF gemessen. Ein unspezifischer Effekt der stabil exprimierten und ebenfalls grün fluoreszierenden Fusionsproteine EGFP-DRA sowie EGFP-DRA-ETKFminus auf die pH_i-Messungen konnte bereits in Voruntersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe ausgeschlossen werden. Die Intensität der EGFP-Fluoreszenz betrug weniger als 5 % der BCECF-Fluoreszenz [48].

Um den Einfluss von SNX27 auf die Aktivität von DRA zu untersuchen, wurde SNX27 induzierbar in EcR293-Zellen exprimiert. Die kontrollierte SNX27-Expression ermöglichte einen Vergleich der endogenen Expression von SNX27 mit einer leichten und einer mäßigen Überexpression. Darüber hinaus wurde der SNX27 KD in EcR293-Zellen untersucht. Somit wurden die in der Literatur beschriebenen verschiedenen Funktionen von SNX27 bei unterschiedlichen Expressionsbedingungen adressiert [siehe 5.1].

Mithilfe der pH_i-Messungen wurde zunächst eine Verringerung des basalen pH-Wertes der Zellen sowohl nach SNX27-Überexpression als auch nach dem SNX27 KD und sowohl in DRA- als auch in DRA-ETKFminus-exprimierenden Zellen beobachtet. Diese Reduktion kommt möglicherweise durch die Interaktion von SNX27 mit sogenannten H^+-ATPasen zustande, die an der Regulation der pH-Homöostase beteiligt sind [160]. Für die Fragestellung der Funktion von DRA war dieser Befund jedoch nicht relevant und wurde daher nicht weiter untersucht.

Die leichte Überexpression von SNX27 hatte keinen Einfluss auf die Aktivität von DRA. Allerdings konnte nach mäßiger SNX27-Überexpression ein signifikant verringerter Protonen- bzw. Bicarbonat-Flux und somit eine reduzierte Aktivität von DRA nachgewiesen werden. Zudem führte der SNX27 KD zu einer um die Hälfte reduzierten DRA-Aktivität und damit dem stärksten Effekt auf den Anionenaustauscher, der bislang in

der eigenen Arbeitsgruppe gemessen wurde. Dementsprechend ist SNX27 für die Aktivität von DRA entscheidend.

Diese Befunde reihen sich in die Erkenntnisse verschiedener publizierter Arbeiten ein. Durch einige Arbeitsgruppen wurde eine gesteigerte Endozytose und eine Degradation gebundener Proteine nach Überexpression von SNX27 beschrieben [112, 115, 124, 127]. Allerdings wurden auch nach Depletion von nativem SNX27 ein gestörtes Recycling, eine verringerte Oberflächenexpression und eine verminderte Aktivität unterschiedlicher Interaktionspartner gezeigt [112, 119, 126].
Lauffer et al. konnten nachweisen, dass die Deletion der PDZ-Domäne von SNX27 ebenso wie der SNX27 KD zu einer ausgeprägten Inhibition des β_2-Adrenorezeptor(β_2-AR)-Recyclings führte. Nach dem KD von SNX27 kam es zu einer vermehrten Internalisierung, einer verringerten Oberflächenexpression und einer verminderten Aktivität des Rezeptors [112]. Allerdings wurde in der gleichen Arbeitsgruppe auch eine endosomale Akkumulierung von β_2-ARs nach Überexpression von GFP-SNX27 beobachtet, die im Vergleich zum SNX27 KD allerdings weniger stark ausgeprägt war [112].
Auch für andere Sorting Nexine wurden je nach Ausmaß der Expression unterschiedliche Effekte beschrieben, die von Carlton et al. zusammengefasst wurden. Während die Überexpression von SNX1 zur Degradation des epidermal growth factor receptor (EGFR) führte, hatte die RNAi-vermittelte SNX1-Suppression keine Auswirkungen auf das Trafficking des Rezeptors. Eine mögliche Erklärung ist die gesteigerte Formation von Tubuli nach SNX1-Überexpression, die zu einer Störung der endosomalen Funktion und damit zu einer Beeinträchtigung des EGFR-Recyclings führen kann. Weiterhin verursachten auch Überexpressionen von SNX3, SNX15 und SNX17 Defekte beim Trafficking von Proteinen, die durch eine Retention in Sortierungs-Endosomen hervorgerufen wurden [157].

Basierend auf diesen in der Literatur beschriebenen Erkenntnissen und den eigenen Daten scheint die Überexpression von SNX27 eine Retention von DRA in frühen Endosomen zu bewirken, die eine verminderte Aktivität des Transporters zur Folge hat. Möglicherweise kommt diese Retention durch die Interaktion der FERM-Domäne von SNX27 mit dem WASH-Komplex zustande [132], der über die Bildung Aktin-stabilisierter Mikrodomänen zur Verdichtung gebundener Proteine und Formation von Tubuli beiträgt [130]. Der SNX27 KD wiederum bewirkt mutmaßlich durch eine Verhinderung des Recyclings von DRA eine starke Reduktion der Transportaktivität.

Die Aktivität von DRA-ETKFminus, der mutierten Form von DRA ohne PDZ-Interaktionsmotiv, wurde hingegen nicht durch die unterschiedlichen SNX27-Expressionsbedingungen beeinflusst. Weder nach der Überexpression noch nach dem KD von

SNX27 wurde eine Veränderung der Transportaktivität festgestellt. Demzufolge ist die PDZ-Interaktion von SNX27 und DRA für die Funktion des Anionenaustauschers von Bedeutung. Dennoch wird auch DRA-ETKFminus unter basalen Bedingungen in der Plasmamembran exprimiert und ist dort funktionell aktiv.

Möglicherweise hängen die gewonnenen Erkenntnisse zum Einfluss von SNX27 auf die Aktivität von DRA und DRA-ETKFminus mit einer unterschiedlichen Expression der Transporter in der Plasmamembran zusammen. Aus diesem Grund wurde zusätzlich zu den funktionellen Untersuchungen auch die Bedeutung von SNX27 für die Oberflächenexpression von DRA und DRA-ETKFminus analysiert.

5.2.2 Einfluss von SNX27 auf die Oberflächenexpression von DRA

Mithilfe von Oberflächenbiotinylierungen wurde der Anteil von DRA bzw. DRA-ETKFminus bestimmt, der in der Plasmamembran exprimiert wird. Hierbei zeigte sich, dass die unterschiedlichen SNX27-Expressionsbedingungen keinen Einfluss auf die Oberflächenexpression von DRA und DRA-ETKFminus hatten. Weder nach leichter bzw. mäßiger Überexpression noch nach SNX27 KD konnte ein Unterschied der Expression von DRA bzw. DRA-ETKFminus in der Plasmamembran im Vergleich zur endogenen SNX27-Expression ausgemacht werden. Infolgedessen kann die zuvor anhand der pH_i-Messungen beobachtete Aktivitätsminderung von DRA nach SNX27-Überexpression und besonders nach dem SNX27 KD nicht durch eine reduzierte Oberflächenexpression von DRA begründet werden. Die weiter oben beschriebenen möglichen Auswirkungen einer SNX27-Überexpression auf die Retention von DRA in frühen Endosomen und das durch den SNX27 KD gestörte Recycling können somit nicht die alleinigen Ursachen für die verringerte Aktivität des Transporters sein.

Besonders in den polyklonalen Zelllinien war der quantitative Nachweis der Oberflächenproteine aufgrund der relativ geringen Gesamtexpression von DRA schwierig. Das Signal im Western Blot lag an der Detektionsgrenze und die Quantifizierung damit an der Grenze der Auflösungsfähigkeit. Allerdings sollten Veränderungen der Oberflächenexpression, die - wie nach dem SNX27 KD beobachtet - eine 50 %ige Verringerung der Aktivität von DRA bewirken, auch trotz der geringen Gesamtexpression detektierbar sein.

In einer Reihe von Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen ging die Überexpression von SNX27 mit Veränderungen der Oberflächenexpression interagierender Proteine einher [112, 120, 124]. Hayashi et al. beschrieben außerdem eine gesteigerte Oberflächenexpression von MRP4 nach einem SNX27 KD in HEK293-Zellen [125]. Im Gegensatz dazu konnte in weiteren Studien mit einer Depletion von SNX27 nicht nur

eine verringerte Aktivität gebundener Proteine, sondern auch eine reduzierte Oberflächenexpression nachgewiesen werden [112, 120, 123, 126].

Die bereits 2010 von Lissner et al. aus der eigenen Arbeitsgruppe publizierten quantitativen Daten zur Expression von DRA in der Plasmamembran stimmen mit den eigenen Ergebnissen der monoklonalen Zelllinien überein, die für die regulierbare SNX27-Überexpression verwendet wurden. In beiden Arbeiten konnte ein relativer Oberflächen-Anteil von DRA von etwa 21 % ermittelt werden. Allerdings wurde in den eigenen Untersuchungen mit rund 15 % ein geringerer relativer Anteil von DRA-ETKFminus ermittelt, der zuvor mit etwa 24 % beschrieben wurde [56]. Die beschriebene Abweichung kann durch unterschiedliche experimentelle Bedingungen entstanden sein. Dennoch gab es in beiden Arbeiten keinen statistisch signifikanten Unterschied in der relativen Oberflächenexpression von DRA und DRA-ETKFminus.
In Kontrollzellen der polyklonalen Zelllinien, die für den SNX27 KD eingesetzt wurden, war die relative Oberflächenexpression von DRA und DRA-ETKFminus etwas geringer. Die detektierten Abweichungen zu den monoklonalen Zelllinien lassen sich vermutlich auf klonale Unterschiede zurückführen.

In beiden Versuchsansätzen wurde eine tendenziell geringere relative Oberflächenexpression von DRA-ETKFminus im Vergleich zu DRA ermittelt, die allerdings nur nach mäßiger SNX27-Überexpression statistisch signifikant war. Im Gegensatz dazu war die Gesamtexpression von DRA-ETKFminus in den verwendeten Zelllinien stets höher, was anhand der mikroskopischen Aufnahmen visualisiert und im Western Blot bestätigt werden konnte. Vermutlich erreicht aufgrund der vergleichsweise starken Überexpression oder aufgrund des fehlenden PDZ-Interaktionsmotives bezogen auf die Gesamtexpression weniger DRA-ETKFminus die Plasmamembran. Für zukünftige Untersuchungen wären prinzipiell Zelllinien von Vorteil, die eine vergleichbare Expression von DRA und DRA-ETKFminus aufweisen, um solche Klon-spezifischen Unterschiede zu minimieren. Die Erfahrungen der Arbeitsgruppe zeigen jedoch, dass in diversen experimentellen Ansätzen immer wieder eine stärkere Expression von DRA-ETKFminus im Vergleich zu DRA beobachtet wurde. Bisher konnte allerdings keine erklärende Hypothese für diesen Effekt aufgestellt werden.

5.2.3 Einfluss von SNX27 auf die Aktivität und Oberflächenexpression von DRA im gemeinsamen Kontext

Die Expression von Transportern in speziellen funktionellen Domänen der Plasmamembran kann eine Modulation ihrer Funktion bewirken. Eine mögliche Erklärung dafür, dass DRA nach Überexpression bzw. KD von SNX27 trotz gleichbleibender

Oberflächenexpression weniger aktiv ist, stellt die Expression von DRA in speziellen Teilen der Plasmamembran mit einer an dieser Stelle spezifisch verringerten Aktivität dar.
NHE3 konnte innerhalb der apikalen Plasmamembran in unterschiedlichen Subpopulationen nachgewiesen werden [21]. Neben einer sehr aktiven NHE3-Fraktion existiert auch eine weniger aktive bzw. inaktive Population.
In der eigenen Arbeitsgruppe konnte zudem bereits gezeigt werden, dass DRA in sogenannten Lipid Rafts lokalisiert ist und dort mit PDZ-Adapterproteinen der NHERF-Familie interagiert [56]. Lipid Rafts sind Cholesterol- und Sphingolipid-reiche Mikrodomänen von Membranen, in denen Komplexe aus Signal-, Adapter- und Transmembranproteinen vorkommen [161, 162]. Die Zerstörung der Lipid Rafts durch Methyl-β-Cyclodextrin (MβCD) führte in EcR293-Zellen zu einer ausgeprägten Inhibition der Transportaktivität von DRA, die Aktivität von DRA-ETKFminus wurde hingegen nicht beeinflusst [56].
Diese Daten deuten darauf hin, dass DRA möglicherweise in Abhängigkeit von SNX27 in Lipid Rafts gelangt und dort durch die Interaktion mit weiteren PDZ-Adapterproteinen besonders aktiv ist. DRA-ETKFminus ist basierend auf den genannten Voruntersuchungen zwar ebenfalls in Lipid Rafts lokalisiert, scheint hier jedoch nicht aktiv zu sein. Dieser Aspekt ist unter anderem in Abbildung 19 auf Seite 87 dargestellt.

Die mutierte Form des Anionenaustauschers zeigt trotz der fehlenden PDZ-Interaktion Transportaktivität und wird ebenfalls in der Plasmamembran exprimiert, und zwar unbeeinflusst von den unterschiedlichen SNX27-Expressionsbedingungen. Demzufolge gibt es eine alternative oder zusätzliche Möglichkeit, durch die DRA-ETKFminus unabhängig von einer Interaktion mit PDZ-Adapterproteinen in die Plasmamembran eingebaut wird und dort funktionell aktiv ist.
Verschiedene Arbeitsgruppen konnten bereits zeigen, dass die apikale Expression und die Aktivität von CFTR nicht von seinem C-terminalen PDZ-Interaktionsmotiv abhängen [163, 164]. Das legt die Vermutung nahe, dass es einen PDZ-unabhängigen Recycling-Weg gibt, über den sowohl DRA-ETKFminus als auch die mutierte Form von CFTR ohne PDZ-Interaktionsmotiv in der Plasmamembran exprimiert werden. Diese Hypothese wird in Abschnitt 5.4 weiter ausgeführt und ist anhand eines Modells in Abbildung 19 auf Seite 87 veranschaulicht.

Singh et al. beschrieben eine verringerte Aktivität und Oberflächenexpression von NHE3 nach dem SNX27 KD in HEK293-Zellen und der intestinalen Epithelzelllinie SK-CO15 [126]. Allerdings zeigte sich in Degradations-Assays, dass zwar die Stabilität von NHE3 in der Plasmamembran, jedoch nicht die Stabilität von Gesamt-NHE3 durch

die SNX27 Depletion reduziert war. In diesem Zusammenhang wurde eine mögliche Beteiligung weiterer Proteine in Betracht gezogen, die den lysosomalen Abbau von NHE3 verhindern oder NHE3 in intrazellulären Kompartimenten festhalten [126].
Das lässt die Vermutung zu, dass neben SNX27 auch weitere PDZ-Adapterproteine oder weitere Proteine des Retromer-Komplexes die Aktivität und Oberflächenexpression von NHE3 und DRA beeinflussen. Auch dieser Hypothese wird in Abschnitt 5.4 weiter nachgegangen.

5.3 Intrazelluläre Lokalisation und Colokalisation von SNX27 und DRA

Ergänzend zu den funktionellen Untersuchungen in EcR293-Zellen wurden die intrazelluläre Lokalisation von SNX27 und die Colokalisation von DRA mit SNX27 in 4C4-Zellen untersucht. Diese differenzierten intestinalen Epithelzelllinien wiesen eine stabile und induzierte Expression von EGFP-markiertem DRA bzw. DRA-ETKFminus auf. SNX27 und die unterschiedlichen Rab-Proteine als Marker für frühe, späte und Recycling-Endosomen wurden als endogen exprimierte Proteine angefärbt.

Die mikroskopische Analyse der Zellen erfolgte mithilfe der Superresolution Structured Illumination Microscopy (SR-SIM). Die SR-SIM stellt eine Methode dar, die verglichen mit der konventionellen CLSM eine doppelt so hohe laterale und axiale Auflösung bietet [165]. Dadurch können die subzellulären Lokalisation und die Colokalisation der Proteine genauer beurteilt werden. Weiterhin wurden im Rahmen dieser Arbeit axiale Bildstapel aufgenommen, um zusätzliche räumliche Informationen entlang der Zellachse dieser differenzierten intestinalen Epithelzellen zu gewinnen. Anhand eines neuartigen methodischen Ansatzes wurden die Verteilung und die Colokalisation von SNX27, DRA und den unterschiedlichen Rab-Proteinen entlang der Z-Achse der 4C4-Zellen betrachtet.

Obwohl der Vergleich der subzellulären Lokalisation von zwei Proteinen die wohl häufigste fluoreszenzmikroskopische Anwendung der biomedizinischen Forschung darstellt, erfolgt nur selten eine quantitative Auswertung der Colokalisation [166]. Oftmals findet eine rein qualitative und damit subjektive Colokalisations-Bestimmung statt. Zudem ist in der Literatur bislang keine Quantifizierung der Colokalisation anhand von SR-SIM-Aufnahmen beschrieben. Im Kontext dieser Arbeit wurden somit erstmalig die SR-SIM-Technologie, die spezielle, axiale Betrachtung der 4C4-Zellen und die Quantifizierung der Colokalisation kombiniert.

Die Quantifizierung der Colokalisation erfolgte mithilfe der Manders Colokalisations-Koeffizienten, die Werte zwischen 0 (Ausschluss einer Colokalisation) und 1 (totale

Colokalisation) annehmen können. Die Manders Colokalisations-Koeffizienten liefern zwei Komponenten - die Colokalisation von A mit B sowie die Colokalisation von B mit A. Somit wird durch diese Koeffizienten der Anteil eines Proteins quantifiziert, der mit einem zweiten Protein interagiert. Das ist besonders von Bedeutung, wenn Proteine in unterschiedlichen Kompartimenten verteilt sind oder sich die Anzahl der gefärbten Strukturen unterscheidet [166]. Darüber hinaus besitzen die Manders Colokalisations-Koeffizienten weitere theoretische und auch praktische Vorteile gegenüber dem häufig angewandten Pearson Korrelations-Koeffizienten. Für die vorliegende Fragestellung war das Hauptargument, dass für die Manders Colokalisations-Koeffizienten keine proportionale Verteilung der Signalintensitäten der zwei untersuchten Proteine vorliegen muss. Zudem sind die Manders Colokalisations-Koeffizienten auch nach der Definition von ROIs zuverlässig. Im Gegensatz dazu misst der Koeffizient nach Pearson die Assoziation zweier Proteine anhand eines einfachen linearen Zusammenhangs im gesamten Bild [166].
Analysiert wurde jeweils nur der Manders Colokalisations-Koeffizient mit der biologisch relevanten Bedeutung für die jeweilige Fragestellung. Von Interesse waren die Colokalisation von SNX27 bzw. DRA mit den Rab-Proteinen und von DRA mit SNX27. Die detektierten Werte waren numerisch vergleichsweise niedrig. Allerdings wurde erstmalig eine Quantifizierung der Colokalisation von SR-SIM-Daten in einer differenzierten, intestinalen Zelllinie durchgeführt. Für diesen Anwendungsfall sind keine Referenzwerte verfügbar. Zudem ergab die Auswertung trotz geringer numerischer Werte statistisch signifikante Unterschiede.
Darüber hinaus wurden die Colokalisation und die Verteilung von SNX27, DRA und den Rab-Proteinen zum ersten Mal differenziert entlang der Z-Achse von 4C4-Zellen betrachtet. Die Aussagekraft dieses Ansatzes wurde anhand der subzellulären Verteilung der mittels DAPI angefärbten Zellkerne gezeigt. An den basalen und apikalen Zellgrenzen war die Methode aufgrund der geringen Fluoreszenz-Intensitäten und Manders Colokalisations-Koeffizienten allerdings weniger geeignet.

Die Ergebnisse der Lokalisations- und Colokalisations-Untersuchungen werden im Folgenden diskutiert.

5.3.1 Intrazelluläre Lokalisation von SNX27

In zahlreichen Publikationen ist die Lokalisation von SNX27 in frühen Endosomen beschrieben [110, 112–115]. Diese kommt durch die Interaktion der für Sorting Nexine charakteristischen PX-Domäne mit PI3P-angereicherten Membranen des endosomalen Systems zustande, die besonders in frühen Endosomen vorkommen [73].

Eine Studie von Merino-Trigo et al. konnte allerdings zeigen, dass SNX5 mit verschiedenen Kompartimenten assoziiert ist [167]. Zum einen wurde eine Lokalisierung des Proteins in einer Subdomäne von frühen Endosomen beschrieben. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass die PX-Domäne von SNX5 nicht nur mit PI3P, sondern auch mit Phosphatidylinositol-3,4-Bisphosphat interagiert, welches vorrangig an der zytosolischen Seite der Plasmamembran vorkommt. Passend hierzu konnte SNX5 ebenfalls in der Plasmamembran lokalisiert werden und ist vermutlich auch an anderen Mechanismen als der endosomalen Sortierung beteiligt [167].
Auch für SNX1 und SNX9 konnten in Abhängigkeit ihrer PX-Domäne Bindungen an unterschiedlich phosphorylierte PIs nachgewiesen werden [157]. Demzufolge ist die PX-vermittelte Lokalisation der Sorting Nexine nicht einzig auf die Bindung an PI3P und damit auf frühe Endosomen beschränkt. Durch zusätzliche Membran-Bindemotive einiger Sorting Nexine, beispielsweise die BAR-Domäne, ist auch eine Lokalisation der Proteine in anderen Kompartimenten als frühen Endosomen und folglich auch eine unterschiedliche Funktion der verschiedenen Sorting Nexine denkbar [157].

SNX27 besitzt eine PX-Domäne, eine Ras-assoziierende Domäne, eine atypische FERM-Domäne und eine N-terminale PDZ-Domäne. Aufgrund dieser verschiedenen Proteindomänen ist SNX27 möglicherweise in unterschiedlichen subzellulären Strukturen lokalisiert. Darüber hinaus sind aufgrund der verschiedenen Bindemotive Interaktionen mit unterschiedlichen Interaktionspartnern in unterschiedlichen Kompartimenten vorstellbar.
Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die Lokalisation von SNX27 in intestinalen Epithelzellen untersucht. Hierzu wurde endogen exprimiertes SNX27 in 4C4-Zellen angefärbt und mithilfe der SR-SIM visualisiert. Sowohl die qualitative Beurteilung der Aufnahmen als auch die quantitative Auswertung ergaben, dass SNX27 intrazellulär lokalisiert ist und mit Rab5 colokalisiert. In Übereinstimmung mit den oben zitierten Arbeiten kann somit von einer Expression des Proteins in frühen Endosomen ausgegangen werden.
Darüber hinaus wurde die Colokalisation von SNX27 mit Rab7 und mit Rab11 als Marker für späte und Recycling-Endosomen analysiert. Hierbei wurde ein Unterschied in Abhängigkeit der Expression von DRA bzw. DRA-ETKFminus ermittelt. In den DRA-exprimierenden Zellen wurde keine Colokalisation von SNX27 mit Rab7 oder Rab11 nachgewiesen. Im Gegensatz dazu kam es in DRA-ETKFminus-exprimierenden Zellen auch zu einer geringen Colokalisation mit Rab7 und vor allem mit Rab11. Folglich scheint die Lokalisation des Proteins von einem verfügbaren Interaktionspartner

abhängig zu sein. Die Interaktion von SNX27 mit DRA führt offensichtlich zu einer Verschiebung der Lokalisation von SNX27 hin zu frühen Endosomen.

Rincón et al. beschrieben ebenfalls eine Lokalisation von SNX27 in Rab11-positiven Recycling-Endosomen [168]. Darüber hinaus wurde in einer Studie der Arbeitsgruppe um Lauffer et al. neben der vorrangigen Lokalisation in frühen Endosomen auch eine geringe Lokalisation von SNX27 in Recycling-Endosomen und in Lysosomen detektiert [112]. Somit scheint SNX27 neben seiner vorrangigen Lokalisation in frühen Endosomen auch in anderen endosomalen Kompartimenten vorzukommen. Einen indirekten Nachweis liefern auch einige Studien, die gezeigt haben, dass Rab7 für die Rekrutierung des Retromer-Komplexes benötigt wird und dabei zusammen mit Rab5 agiert [169, 170].

Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit anhand eines neuartigen Ansatzes die Verteilung von SNX27 entlang der Z-Achse von 4C4-Zellen charakterisiert. Hierbei zeigte sich, dass SNX27 vorrangig im apikalen Bereich der Zellen und damit in unmittelbarer Nähe zum Bürstensaum exprimiert wird. Zudem wurde in DRA-exprimierenden Zellen in den apikalen Abschnitten etwas mehr SNX27 detektiert als in DRA-ETKFminus-exprimierenden Zellen. Folglich kommt es möglicherweise in der Nähe der Plasmamembran zur Interaktion von SNX27 mit DRA. Das lässt eine Beteiligung von SXN27 am Einbau von DRA in die Plasmamembran vermuten. Außerdem scheint die Plasmamembran-nahe Lokalisation von SNX27 durch verfügbare Interaktionspartner beeinflusst zu werden. Hinweise darauf liefert auch eine Veröffentlichung von Tello-Lafoz. Die Arbeitsgruppe entdeckte in der FERM-ähnlichen Domäne von SNX27 ebenfalls eine PI-Bindestelle mit deutlicher Präferenz für bi- und triphosphorylierte PIs. In diesem Zusammenhang wurde eine Akkumulierung von SNX27 in der Plasmamembran bei der T-Zell-Aktivierung beschrieben. Darüber hinaus vermittelte die FERM-Domäne auch die Endozytose von SNX27 zurück zum endosomalen Recycling-Kompartiment [111].

Insgesamt ergeben diese Daten ein Bild, bei dem SNX27 neben seiner vorrangigen Lokalisation in frühen Endosomen auch in anderen endosomalen Kompartimenten und in der Plasmamembran zu finden ist. Hierfür sind einerseits Interaktionen mit unterschiedlichen Membran-Bestandteilen über die PX- und die FERM-Domäne von SNX27 verantwortlich. Andererseits ist auch die PDZ-vermittelte Interaktion mit weiteren Proteinen für die Lokalisation von SNX27 von Bedeutung. Die Relevanz dieser Erkenntnisse für die Interaktion mit DRA wird im Folgenden erläutert.

5.3.2 Intrazelluläre Lokalisation von DRA

Mithilfe der repräsentativen SR-SIM-Aufnahmen wurden DRA und DRA-ETKFminus in der Plasmamembran nachgewiesen. In Übereinstimmung mit Ergebnissen der eigenen Arbeitsgruppe, die in HEK293-Zellen gewonnen wurden, konnten DRA und DRA-ETKFminus darüber hinaus auch in intrazellulären Kompartimenten unterhalb der apikalen Membran in 4C4-Zellen detektiert werden [48].
Zudem ergab die quantitative Auswertung der SR-SIM-Aufnahmen, dass im Vergleich zu DRA mehr DRA-ETKFminus im mittleren Bereich der Zellen exprimiert wird. Sowohl die in dieser Arbeit verwendeten EcR293- als auch die 4C4-Zellen wiesen eine höhere Gesamtexpression von DRA-ETKFminus auf. Dennoch zeigten die Ergebnisse der Oberflächenbiotinylierung, dass der relative Anteil von DRA-ETKFminus in der Plasmamembran etwas geringer als der von DRA ist. Somit lassen diese Ergebnisse vermuten, dass es aufgrund der stärkeren Expression und möglicherweise auch durch die fehlenden PDZ-Interaktionen von DRA-ETKFminus zu einer Verschiebung des Transporters in subapikale Kompartimente kommt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde DRA weiterhin im apikalen Bereich der 4C4-Zellen mit Rab5-positiven frühen Endosomen und Rab7-positiven späten Endosomen, jedoch nicht mit Rab11-positiven Recycling-Endosomen colokalisiert. Im Gegensatz dazu war DRA-ETKFminus gleichermaßen in Rab5- und Rab11-positiven Kompartimenten und in vielen Zellabschnitten vorrangig in Rab7-positiven späten Endosomen zu finden. Demzufolge wird das intrazelluläre Trafficking von DRA von seiner Interaktion mit PDZ-Adapterproteinen beeinflusst.

Lissner et al. haben das Trafficking und Recycling von DRA anhand von Colokalisations-Analysen und Immunisolationen in transfizierten EcR293-Zellen untersucht [65]. Dabei wurde übereinstimmend mit den eigenen Ergebnissen eine gleichartige Colokalisation von DRA und DRA-ETKFminus in frühen Endosomen beschrieben. Allerdings war DRA in den EcR293-Zellen vorrangig in Recycling-Endosomen nachweisbar, während DRA-ETKFminus primär in späten Endosomen detektiert wurde. Daher wurde ein Mechanismus postuliert, bei dem DRA durch seine Interaktionen mit PDZ-Adapterproteinen von Rab5-positiven frühen Endosomen in Rab11-positive Recycling-Endosomen gelangt und von dort aus in die Plasmamembran eingebaut wird [65].
Diese zum Teil von den eigenen Ergebnissen abweichenden Erkenntnisse wurden in einem anderen Zellmodell, unter anderen experimentellen Bedingungen und mit einem anderen Ansatz zur Auswertung der Colokalisation generiert. Lissner et al. quantifizierten die Colokalisation anhand des Pearson Korrelations-Koeffizienten in transfizierten HEK293-Zellen, die eine Überexpression der Rab-Proteine aufwiesen. Möglicherweise

gibt es zellspezifische Unterschiede oder die von Lissner et al. untersuchte Überexpression der Rab-Proteine hatte einen artifiziellen Einfluss auf die Verteilung von DRA in den endosomalen Kompartimenten.

Obwohl DRA-ETKFminus in den EcR293-Zellen wenig in Recycling-Endosomen zu finden war, wurde die mutierte Form des Anionenaustauschers ohne PDZ-Interaktionsmotiv ebenfalls in der Plasmamembran der EcR293-Zellen exprimiert und war funktionell aktiv. Aus diesem Grund wurde von einer Beteiligung zusätzlicher oder alternativer Mechanismen ausgegangen, über die DRA-ETKFminus recycelt wird [65].

Die eigenen Daten aus den differenzierten intestinalen Epithelzellen liefern Hinweise darauf, dass das PDZ-unabhängige Recycling von DRA-ETKFminus Rab11-positive Recycling-Endosomen benötigt. Darüber hinaus wird DRA vermutlich direkt über einen Rab11-unabhängigen Weg in die Plasmamembran eingebaut [siehe Abbildung 19 auf Seite 87].

5.3.3 Colokalisation von DRA mit SNX27

Aufgrund der engen funktionellen Kopplung bei der elektroneutralen NaCl-Absorption können Erkenntnisse zur Colokalisation von SNX27 mit NHE3 möglicherweise als Paradigma für DRA gelten. Singh et al. konnten unter basalen Bedingungen nur eine sehr geringe Colokalisation von NHE3 mit SNX27 feststellen [126]. Nach Induktion der Endozytose colokalisierte NHE3 hingegen mit SNX27 in intrazellulären Vesikeln. SNX27 konnte darüber hinaus in frühen Endosomen lokalisiert werden, sodass von einer Colokalisation der Proteine in frühen Endosomen ausgegangen wird. In Rab4a- bzw. Rab11a-transfizierten HEK293-Zellen konnte SNX27 hingegen nicht in diesen Kompartimenten nachgewiesen werden, die das *schnelle* bzw. *langsame Recycling* von Proteinen vermitteln. Demzufolge wurde eine Beteiligung von SNX27 bei der Exozytose von NHE3 aus frühen Endosomen beschrieben [126].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Colokalisation von DRA mit SNX27 nachgewiesen. Zusätzlich zu der rein qualitativen Bestimmung anhand der repräsentativen SR-SIM-Aufnahmen ergab die Quantifizierung entlang der Z-Achse der 4C4-Zellen, dass die Colokalisation besonders im apikalen Bereich der Zellen stattfindet. SNX27 colokalisiert zudem mit Rab5-positiven frühen Endosomen. Somit kann von einer Colokalisation von DRA mit SNX27 in frühen Endosomen ausgegangen werden. Im Vergleich zu DRA colokalisiert weniger DRA-ETKFminus mit SNX27 im apikalen Zellabschnitt. In diesem Zusammenhang ist auch die bereits beschriebene, leicht unterschiedliche subzelluläre Lokalisation von SNX27 interessant. In DRA-exprimierenden Zellen wurde apikal etwas mehr SNX27 detektiert, was eine Rekrutierung des

Proteins an die Plasmamembran möglich erscheinen lässt. Im apikalen Bereich der Zellen colokalisiert DRA mit SNX27. Demzufolge findet vermutlich in unmittelbarer Nähe der Plasmamembran die PDZ-vermittelte Interaktion von DRA und SNX27 statt. Da DRA zudem nicht in Rab11-positiven Recycling-Endosomen nachgewiesen wurde, kann analog zu dem für NHE3 beschriebenen Mechanismus von einem SNX27-abhängigen direkten Recycling von DRA zur Plasmamembran ausgegangen werden.

Im folgenden Abschnitt werden die Erkenntnisse zum Einfluss von SNX27 auf die Aktivität und Oberflächenexpression von DRA, zur intrazellulären Lokalisation und Colokalisation der Proteine sowie zur Bedeutung von Lipid Rafts, dem SNX27-Retromer-Komplex und weiteren PDZ-Adapterproteinen anhand eines Modells zusammengefasst.

5.4 Möglicher Einfluss von SNX27 auf das Recycling von DRA

SNX27 ist von entscheidender Bedeutung für die Aktivität von DRA. Nach mäßiger Überexpression und besonders nach dem KD von SNX27 wurde eine verminderte Transportaktivität von DRA beobachtet. Allerdings bleibt die Oberflächenexpression des Transporters anscheinend von SNX27 unbeeinflusst. DRA-ETKFminus, die mutierte Form des Transporters ohne PDZ-Interaktionsmotiv, interagiert nicht mit SNX27 und wird nicht durch SNX27 beeinflusst. Dennoch wird DRA-ETKFminus ebenfalls in der Plasmamembran exprimiert und ist dort funktionell aktiv.
Daher scheint es einen alternativen oder zusätzlichen PDZ-unabhängigen Recycling-Weg zu geben, über den DRA-ETKFminus in die Plasmamembran gelangt. Daneben wird DRA vermutlich durch SNX27 in spezielle Mikrodomänen der Membran, sogenannte Lipid Rafts, eingebaut und ist dort besonders aktiv. Ein Modell dieser Mechanismen ist schematisch in **Abbildung 19** zusammengefasst.

Abbildung 19A zeigt den angenommenen Einfluss von SNX27 auf das Recycling von DRA. Neben der PDZ-vermittelten Interaktion von SNX27 und DRA sind auch der SNX27-Retromer-Komplex, weitere mögliche Interaktionen von DRA mit PDZ-Adapter-proteinen und Lipid Rafts von Bedeutung, worauf nachfolgend eingegangen wird.

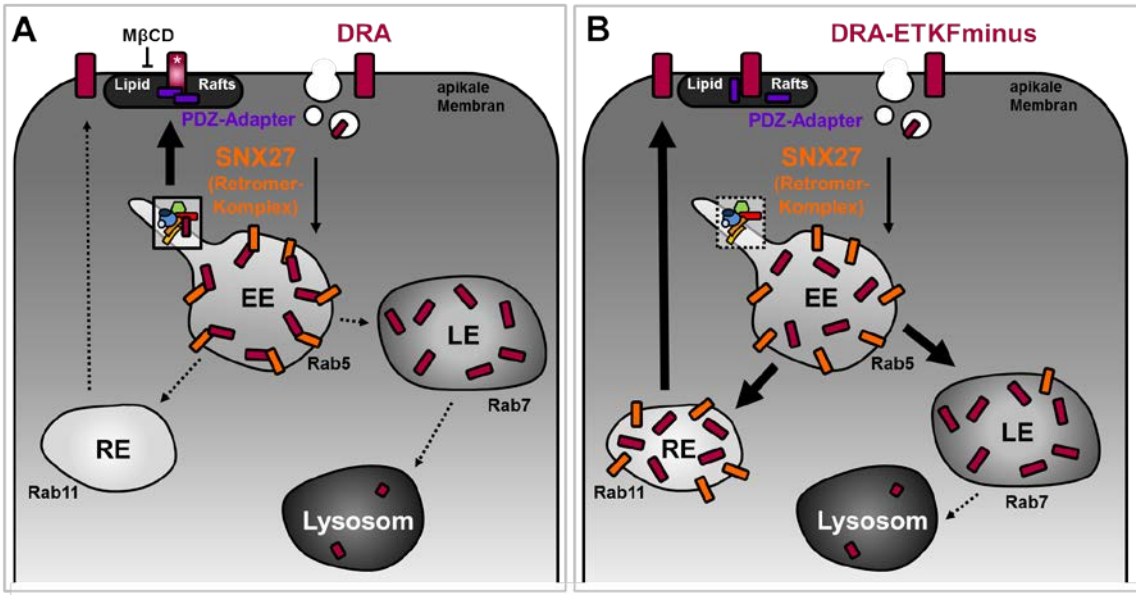


Abbildung 19: Modell zum Einfluss von SNX27 auf das Recycling von DRA und zu einem alternativen Mechanismus für das Recycling von DRA-ETKFminus. (A) DRA wird durch Endozytose in die Zellen aufgenommen und interagiert in Rab5-positiven frühen Endosomen (early endosomes, EE) mit SNX27. Der SNX27-Retromer-Komplex vermittelt das direkte Recycling und den Einbau von DRA in Lipid Rafts, wo DRA mit weiteren PDZ-Adapterproteinen interagiert und besonders aktiv ist. Eine Zerstörung der Lipid Rafts durch Methyl-β-Cyclodextrin (MβCD) führt zu einer Inhibition der Aktivität und Oberflächenexpression von DRA [56]. (B) DRA-ETKFminus wird ebenfalls in der apikalen Membran exprimiert und ist funktionell aktiv. Nach der Endozytose wird DRA-ETKFminus in EE sortiert und entweder Rab7-positiven späten Endosomen (late endosomes, LE) und schließlich einem lysosomalen Abbau zugeführt oder PDZ-unabhängig über Rab11-positive Recycling-Endosomen (RE) wieder in die Plasmamembran eingebaut. Das Recycling über REs stellt somit einen alternativen, PDZ-unabhängigen Recycling-Weg dar. DRA-ETKFminus wurde ebenfalls in Lipid Rafts nachgewiesen, ist dort aber vermutlich aufgrund der fehlenden PDZ-Interaktion nicht aktiv [56] [eigene Abbildung].

Basierend auf den Ergebnissen einer vorangegangenen Masterarbeit und dieser Promotionsarbeit kommt es nach der basalen oder stimulierten Endozytose von DRA zu einer Interaktion mit SNX27 in frühen Endosomen. Diese Interaktion wird durch die PDZ-Domäne von SNX27 vermittelt [122]. SNX27 besitzt darüber hinaus weitere Proteinbindedomänen, deren Zusammenwirken das Sorting Nexin in seiner Struktur und Funktion einzigartig machen.

Lauffer et al. konnten zeigen, dass sowohl die PDZ-Domäne von SNX27 als auch die PX-vermittelte Lokalisation in frühen Endosomen für das Recycling des β_2-AR benötigt werden [112]. Darüber hinaus ist SNX27 über seine FERM-ähnliche und seine PDZ-Domäne mit verschiedenen Untereinheiten des Retromer-Komplexes assoziiert, wodurch auch die Affinität für Bindungspartner erhöht wird [123, 132, 136].

Der SNX27-Retromer-Komplex verhindert den lysosomalen Abbau von Transmembranproteinen mit einem PDZ-Bindemotiv und spielt für deren Recycling eine wichtige Rolle. Daher ist der Multiproteinkomplex wahrscheinlich auch für das Recycling von DRA relevant.

Allerdings wurde SNX27 erst vor einigen Jahren als Bestandteil des Retromer-Komplexes identifiziert und eine potentielle Bedeutung des SNX27-Retromers für das Recycling von Transmembranproteinen beschrieben [123, 135, 137]. Ursprünglich wurde in der eigenen Arbeitsgruppe von einem Szenario ausgegangen, bei dem die PDZ-Adapterproteine der NHERF-Familie spezifisch in unterschiedlichen Kompartimenten entlang des Endozytose-Recycling-Weges lokalisiert sind und DRA möglicherweise durch sequentielle Interaktionen mit den PDZ-Adaptern von einem in das nächste Kompartiment gelangt [65]. Die Identifizierung von SNX27 als weiteres, mit DRA interagierendes NHERF-Familienmitglied, die Lokalisation des Proteins in frühen Endosomen und die Beteiligung am Recycling von Bindungspartnern machen es in diesem Zusammenhang interessant. Der SNX27-Retromer-Komplex und zusätzliche Interaktionen von SNX27 über die anderen Proteinbindedomänen standen hingegen bislang nicht im Fokus der eigenen Untersuchungen.

Lissner et al. beschrieben die Relevanz eines *langsamen Recycling-Weges* für das Trafficking von DRA. Die Überexpression bzw. die Inhibition von Rab11a führten in transfizierten EcR293-Zellen zu einer gesteigerten bzw. verminderten Aktivität und Oberflächenexpression des Transporters. Im Gegensatz dazu hatte die Transfektion von Rab4a sowie einer dominant-negativen Mutante keinen Einfluss auf die Aktivität und Oberflächenexpression von DRA, wodurch eine Beteiligung des *schnellen Recycling-Weges* für DRA zunächst ausgeschlossen wurde [65]. In einer weiteren Studie in Rab-transfizierten HEK293-Zellen konnte SNX27 weder in Rab4-positiven noch Rab11-positiven Recycling-Endosomen nachgewiesen werden, sodass eine Rolle von SNX27 beim direkten Recycling aus frühen Endosomen vermutet wurde [126].
Zudem wurde durch Lauffer et al. eine Funktion von SNX27 bei der Sortierung von β_2-ARs in einen *schnellen Recycling-Weg* in Erwägung gezogen [112]. In diesem Zusammenhang wurde weiterhin eine Bedeutung des Retromers und des Rab4-abhängigen *schnellen Recyclings* nachgewiesen [135]. SNX27 vermittelt die Sortierung der Rezeptoren in Retromer-Tubuli, die mit Rab4a assoziiert sind. Die Depletion von Rab4 führte zudem zu einer Inhibition des β_2-AR-Recyclings [135]. Auch in einem aktuellen Übersichtsartikel zu den Funktionen des Retromer-Komplexes von Abubakar et al. wird ein direkter Recycling-Mechanismus zur Plasmamembran beschrieben [171]. In den eigenen Untersuchungen in 4C4-Zellen wurde DRA nicht mit Rab11-positiven Recycling-Endosomen colokalisiert. Gemeinsam mit den beschriebenen Erkenntnissen aus der Literatur ist somit von einem *schnellen Recycling* von DRA in der intestinalen Zelllinie auszugehen, das durch den SNX27-Retromer-Komplex vermittelt wird. Ob dieser Recycling-Weg Rab4 benötigt, ist bislang nicht hinreichend geklärt.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auch Interaktionen mit weiteren PDZ-Adapterproteinen einen Einfluss auf das Recycling von Transmembranproteinen ausüben. Der KD der NHERF-Familienmitglieder EBP50 und E3KARP führte zu einer Inhibition des β_2-AR, die allerdings nicht so stark wie nach dem KD von SNX27 ausfiel [112]. Auch anhand der eigenen Ergebnisse wurde eine starke Aktivitätsverminderung von DRA nach dem SNX27 KD nachgewiesen, allerdings wurde die Funktion von DRA nicht komplett ausgeschaltet. In einer früheren Studie der eigenen Arbeitsgruppe wurde DRA in Rab11-positiven Recycling-Endosomen detektiert und die Relevanz der PDZ-Interaktionen für das Recycling von DRA beschrieben [65]. Das lässt einen alternativen Recycling-Weg vermuten, der unabhängig von dem SNX27-Retromer-Komplex zu einem Einbau von DRA in die Plasmamembran führt. Dieser Weg wird wahrscheinlich durch die Interaktionen von DRA mit weiteren PDZ-Adapterproteinen der NHERF-Familie vermittelt.

Das Recycling von GPCRs findet zum einen über einen *schnellen Recycling*-Weg statt und wird durch den SNX27-Retromer-Komplex vermittelt. Zum anderen wurde ein SNX27-Retromer-unabhängiger Recycling-Weg beschrieben, der die Rekrutierung von weiteren PDZ-Adaptern benötigt [106]. Die Mutation des PDZ-Bindemotivs führte zu einer Inhibierung des GPCR-Traffickings und förderte den lysosomalen Abbau [172]. In einer weiteren Studie wurde der Dopamin Transporter, der ebenfalls ein C-terminales PDZ-Bindemotiv enthält, auch nach einer Zerstörung des SNX27-Retromers in Rab11-positiven Recycling-Endosomen und in der Plasmamembran nachgewiesen [170]. Das lässt ebenfalls eine Beteiligung von weiteren PDZ-Adapterproteinen vermuten, die ein Recycling über Rab11-positive Recycling-Endosomen vermitteln.
Für NHE3 konnten bereits Interaktionen mit PDZK1 in der Plasmamembran und mit IKEPP in Rab11-positiven Recycling-Endosomen nachgewiesen werden [95, 96]. Darüber hinaus führte die Erhöhung von intrazellulärem Ca^{2+} zur Endozytose bzw. Freisetzung von NHE3 aus Recycling-Endosomen, während die PDZ-Adapterproteine in dem jeweiligen Kompartiment verblieben. Weiterhin wurde PDZK1 in Abhängigkeit eines Interaktionspartners auch in Rab11-positiven Recycling-Endosomen nachgewiesen [173]. Zudem wurde ein Komplex aus NHE3 und E3KARP in der Plasmamembran beschrieben [174]. Diese Daten liefern einen Hinweis darauf, dass NHE3 entlang des Recycling-Weges mit unterschiedlichen PDZ-Adapterproteinen interagiert. Die bislang zu DRA gewonnenen Erkenntnisse zu den Interaktionen mit den NHERF-Familienmitgliedern und deren Beteiligung bei dem Recycling des Transporters lassen einen solchen Weg aufeinanderfolgender PDZ-Interaktionen auch für DRA vermuten [13, 55, 65]. Allerdings ist SNX27 basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht

dafür verantwortlich, dass gebundene Proteine von frühen Endosomen in Recycling-Endosomen gelangen. Möglicherweise übernimmt diese Funktion ein weiteres, in frühen Endosomen lokalisiertes PDZ-Adapterprotein.

Allerdings zeigte sich trotz des angenommenen alternativen Recycling-Weges, der weitere PDZ-Adapterproteine benötigt, eine starke Verringerung der Aktivität von DRA nach dem SNX27 KD bei gleichbleibender relativer Oberflächenexpression. Der SNX27-Retromer-Komplex vermittelt daher vermutlich einen Einbau von DRA in Lipid Rafts. In den Rafts angereicherte Lipide wie Cholesterol und Sphingolipide können durch direkte Protein-Lipid-Interaktionen oder eine Veränderung der physikalischen Eigenschaften der Doppellipidschicht einen Einfluss auf die Aktivität von Proteinen ausüben [175]. Sowohl für NHE3 als auch für DRA konnte bereits gezeigt werden, dass Lipid Rafts essentiell für die Aktivität der Transporter sind. Eine Zerstörung der Lipid Rafts mittels MβCD führte zu einer Reduktion der basalen NHE3-Aktivität und zu einer Inhibition der Aktivität und der Oberflächenexpression von DRA [56, 176, 177]. Weiterhin konnten Lissner et al. auch die NHERF-Familienmitglieder E3KARP, PDZK1 und IKEPP in Lipid Rafts nachweisen. DRA interagiert wahrscheinlich mit einem oder mehreren PDZ-Adapterproteinen in Lipid Rafts, was mutmaßlich die Aktivität des Transporters beeinflusst [56].

Schlussfolgernd kommt es nach der Endozytose zu einer Interaktion von DRA mit SNX27 in frühen Endosomen. Der SNX27-Retromer-Komplex vermittelt daraufhin mutmaßlich den direkten Wiedereinbau des Transporters in die Plasmamembran über einen *schnellen Recycling-Weg*. DRA wird durch das SNX27-Retromer wahrscheinlich in Lipid Rafts eingebaut und ist dort besonders aktiv. Daneben scheint es einen alternativen SNX27-Retromer-Komplex-unabhängigen Recycling-Weg zu geben, der die Interaktion von DRA mit weiteren PDZ-Adapterproteinen benötigt. Erst kürzlich wurde beschrieben, dass das Retromer- und das Rab11-vermittelte Recycling sich nicht ausschließen [170]. Dennoch ist der alternative Weg vermutlich nur bei einem Defekt des SNX27-Retromer-abhängigen Recyclings relevant.

Die mutierte Form von DRA ohne PDZ-Interaktionsmotiv, DRA-ETKFminus, wird ebenfalls in der Plasmamembran exprimiert und ist funktionell aktiv. Demzufolge muss es einen dritten, PDZ-unabhängigen Recycling-Weg geben, über den DRA-ETKFminus in die Plasmamembran gelangt. Ein Modell zum Recycling von DRA-ETKFminus ist in Abbildung 19B dargestellt. In der vorliegenden Arbeit konnte DRA-ETKFminus nicht nur in frühen und späten Endosomen, sondern auch in Recycling-Endosomen detektiert werden. Folglich wird DRA-ETKFminus nach der Endozytose, vermutlich

aufgrund der fehlenden Interaktion mit SNX27 oder anderen PDZ-Adapterproteinen, entweder in einen Degradations-Weg oder in Rab11-positive Recycling-Endosomen sortiert, von wo aus ein erneuter Einbau in die Plasmamembran erfolgt.
DRA-ETKFminus wurde durch Lissner et al. ebenfalls in Lipid Rafts nachgewiesen [56]. Allerdings wurde die Aktivität von DRA-ETKFminus nicht durch eine Störung der Lipid Raft-Integrität gehemmt. Aufgrund dessen scheint der Transporter dort nicht aktiv zu sein, was vermutlich an der fehlenden PDZ-Interaktion liegt [56].

Auch für CFTR muss es einen PDZ-unabhängigen Recycling-Weg geben, da die Oberflächenexpression und die Aktivität des Kanals nicht von seinem PDZ-Interaktionsmotiv abhängen [163, 164]. Zudem wurde in der Literatur neben einem Retromer-abhängigen sowie einem Retromer-unabhängigen und PDZ-abhängigen Recycling ein dritter, PDZ-unabhängiger, Recycling-Weg für GPCRs beschrieben [172, 178].
Einen Erklärungsansatz bietet eine Studie von Nooh et al., in der ein Recycling-Motiv identifiziert werden konnte, das unabhängig vom PDZ-Interaktionsmotiv und dem SNX27-Retromer ein Recycling von GPCRs vermittelt [172]. Abweichend von dem vorrangigen Recycling, über das ein Großteil von Rezeptoren wieder in die Membran gelangt, gibt es ein sogenanntes Sequenz-abhängiges Recycling, das über spezielle endosomale Mikrodomänen stattfindet [179]. Möglicherweise spielen solche Recycling-Sequenzen auch für das Recycling von DRA-ETKFminus eine Rolle.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass SNX27 von entscheidender Bedeutung für die Aktivität von DRA ist. Die gewonnenen Erkenntnisse weisen auf ein komplexes Zusammenspiel von SNX27 als Teil des SNX27-Retromers, Lipid Rafts und Interaktionen mit weiteren PDZ-Adapterproteinen hin, das für das Recycling von DRA relevant ist.
Die Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung der Interaktion von DRA und SNX27 haben damit einen Beitrag zum Verständnis des Recyclings von DRA geleistet. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die unterschiedlichen Recycling-Mechanismen und die Beteiligung der verschiedenen PDZ-Adapterproteine aufzuklären. Außerdem ist in diesem Zusammenhang auch eine weiterführende Untersuchung des SNX27-Retromer-Komplexes und der unterschiedlichen Proteinbindedomänen von SNX27 interessant.

6 Zusammenfassung

Intestinale Ionentransportvorgänge sind für die Aufrechterhaltung des Wasser- und Elektrolythaushaltes relevant und können bei einer Störung zu teilweise schwerwiegenden Durchfallerkrankungen führen. Der Cl^-/HCO_3^--Austauscher DRA und der Na^+/H^+-Austauscher NHE3 vermitteln gemeinsam die elektroneutrale Absorption von NaCl im Ileum und im proximalen Kolon. Die Erforschung der Regulation und Funktion der Transporter ist für das physiologische und pathophysiologische Verständnis der elektroneutralen NaCl-Absorption von Bedeutung.

DRA besitzt ein C-terminales PDZ-Interaktionsmotiv, über das eine Bindung an PDZ-Adapterproteine erfolgt. Die Interaktion mit den PDZ-Adaptern der NHERF-Familie wird für das Recycling und die Expression von DRA in der Plasmamembran benötigt und vermittelt mutmaßlich auch die strukturelle Kopplung von DRA und NHE3.

In eigenen Vorarbeiten wurde das physiologisch bedeutsame und strukturell einzigartige Protein SNX27 als weiteres NHERF-Familienmitglied identifiziert. SNX27 besitzt als einziges Sorting Nexin eine PDZ-Domäne, über die es spezifisch an das PDZ-Interaktionsmotiv von DRA bindet. Darüber hinaus ist SNX27 in frühen Endosomen lokalisiert, einer entscheidenden Schnittstelle für die Sortierung internalisierter Transmembranproteine. Als Teil des SNX27-Retromer-Komplexes ist SNX27 zudem am Recycling gebundener Proteine beteiligt und besitzt daher möglicherweise auch einen Einfluss auf das Recycling von DRA. Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit wurde die funktionelle Bedeutung der Interaktion von SNX27 und DRA in unterschiedlichen Zellmodellen untersucht.

In EcR293-Zellen wurden die Aktivität und die Oberflächenexpression von DRA mithilfe fluorometrischer Messungen des intrazellulären pH-Wertes und Oberflächenbiotinylierungen bestimmt. Anhand einer induzierbaren Expression und eines Knockdowns von SNX27 konnte gezeigt werden, dass SNX27 von entscheidender Bedeutung für die Aktivität von DRA ist. Die Expression von DRA in der Plasmamembran blieb dabei allerdings unbeeinflusst. Darüber hinaus hatten die unterschiedlichen SNX27-Expressionsbedingungen keinen Einfluss auf die Aktivität und Oberflächenexpression von DRA-ETKFminus, der mutierten Form von DRA ohne PDZ-Interaktionsmotiv. Doch trotz der fehlenden Interaktion mit SNX27 und anderen PDZ-Adapterproteinen wird DRA-ETKFminus in der apikalen Membran exprimiert und ist funktionell aktiv.

In intestinalen Epithelzellen wurden zudem die Lokalisation von SNX27 und die Colokalisation von DRA mit SNX27 in unterschiedlichen endosomalen Kompartimenten mithilfe der Superresolution Mikroskopie untersucht. Endogenes SNX27 konnte ebenso

wie DRA im apikalen Bereich der Zellen lokalisiert werden. Weiterhin wurde die Colokalisation von DRA mit SNX27 in frühen Endosomen nachgewiesen. DRA-ETKFminus konnte darüber hinaus auch in Recycling-Endosomen detektiert werden.
Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass SNX27 als Teil des Retromer-Komplexes an einem direkten Wiedereinbau von DRA in die Plasmamembran durch einen *schnellen Recycling-Weg* beteiligt ist. Zudem erfolgt dieser Einbau von DRA wahrscheinlich in Lipid Rafts, in denen der Transporter mit weiteren PDZ-Adapterproteinen der NHERF-Familie interagiert und eine gesteigerte Aktivität besitzt. Daneben scheint es unabhängig vom SNX27-Retromer-Komplex einen alternativen Recycling-Weg zu geben, der die Interaktion von DRA mit weiteren PDZ-Adapterproteinen benötigt. Zusätzlich zu diesen beiden Recycling-Wegen existiert vermutlich ein dritter, PDZ-unabhängiger Mechanismus, über den auch DRA-ETKFminus in die Plasmamembran gelangt.

Die gewonnenen Erkenntnisse weisen darauf hin, dass ein Zusammenwirken von SNX27 als Teil des SNX27-Retromer-Komplexes, von Lipid Rafts und von weiteren PDZ-Adapterproteinen für das Recycling von DRA von Bedeutung ist. Die Promotionsarbeit hat damit einen Beitrag zum Verständnis der Regulation der elektroneutralen NaCl-Absorption geleistet und ermöglicht eine fortführende Untersuchung der komplexen Recycling-Mechanismen von DRA.

7 Literaturverzeichnis

1. World Health Organisation (WHO): Diarrhoeal disease. Fact sheet. Updated May 2017, URL: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/ [Stand 09.06.2017]
2. Field, M.: Intestinal ion transport and the pathophysiology of diarrhea. J. Clin. Invest. 111, 931–943 (2003)
3. Klinke, R., Pape, H.-C., Kurtz, A., Silbernagl, S.: Physiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (2010)
4. Binder, H.J.: Mechanisms of diarrhea in inflammatory bowel diseases. Annals of the New York Academy of Sciences 1165, 285–293 (2009)
5. Priyamvada, S., Gomes, R., Gill, R.K., Saksena, S., Alrefai, W.A., Dudeja, P.K.: Mechanisms Underlying Dysregulation of Electrolyte Absorption in Inflammatory Bowel Disease-Associated Diarrhea. Inflammatory bowel diseases 21, 2926–2935 (2015)
6. Shirazi-Beechey, S.P., Moran, A.W., Batchelor, D.J., Daly, K., Al-Rammahi, M.: Glucose sensing and signalling; regulation of intestinal glucose transport. The Proceedings of the Nutrition Society 70, 185–193 (2011)
7. Field, M.: Ion transport in rabbit ileal mucosa. II. Effects of cyclic 3', 5'-AMP. The American journal of physiology 221, 992–997 (1971)
8. Kato, A., Romero, M.F.: Regulation of electroneutral NaCl absorption by the small intestine. Annual review of physiology 73, 261–281 (2011)
9. Matthews, J.B.: Molecular regulation of Na+-K+-2Cl- cotransporter (NKCC1) and epithelial chloride secretion. World journal of surgery 26, 826–830 (2002)
10. Moon, C., Zhang, W., Sundaram, N., Yarlagadda, S., Reddy, V.S., Arora, K., Helmrath, M.A., Naren, A.P.: Drug-induced secretory diarrhea. A role for CFTR. Pharmacological research 102, 107–112 (2015)
11. Kunzelmann, K., Mall, M.: Electrolyte transport in the mammalian colon. Mechanisms and implications for disease. Physiological reviews 82, 245–289 (2002)
12. Knickelbein, R., Aronson, P.S., Schron, C.M., Seifter, J., Dobbins, J.W.: Sodium and chloride transport across rabbit ileal brush border. II. Evidence for Cl-HCO3 exchange and mechanism of coupling. The American journal of physiology 249, G236-45 (1985)
13. Lamprecht, G., Heil, A., Baisch, S., Lin-Wu, E., Yun, C.C., Kalbacher, H., Gregor, M., Seidler, U.: The Down Regulated in Adenoma (dra) Gene Product Binds to the Second PDZ Domain of the NHE3 Kinase A Regulatory Protein (E3KARP), Potentially Linking Intestinal Cl - /HCO 3- Exchange to Na + /H + Exchange †. Biochemistry 41, 12336–12342 (2002)
14. Musch, M.W., Arvans, D.L., Wu, G.D., Chang, E.B.: Functional coupling of the downregulated in adenoma Cl-/base exchanger DRA and the apical Na+/H+ exchangers NHE2 and NHE3. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology 296, G202-10 (2009)
15. Walker, N.M., Simpson, J.E., Yen, P.-F., Gill, R.K., Rigsby, E.V., Brazill, J.M., Dudeja, P.K., Schweinfest, C.W., Clarke, L.L.: Down-regulated in adenoma Cl/HCO3 exchanger couples with Na/H exchanger 3 for NaCl absorption in murine small intestine. Gastroenterology 135, 1645-1653.e3 (2008)

16. Bhutia, Y.D., Babu, E., Ramachandran, S., Yang, S., Thangaraju, M., Ganapathy, V.: SLC transporters as a novel class of tumour suppressors: identity, function and molecular mechanisms. The Biochemical journal 473, 1113–1124 (2016)

17. Lamprecht, G., Hsieh, C.-J., Lissner, S., Nold, L., Heil, A., Gaco, V., Schäfer, J., Turner, J.R., Gregor, M.: Intestinal anion exchanger down-regulated in adenoma (DRA) is inhibited by intracellular calcium. The Journal of biological chemistry 284, 19744–19753 (2009)

18. Donowitz, M., Ming Tse, C., Fuster, D.: SLC9/NHE gene family, a plasma membrane and organellar family of Na^+/H^+ exchangers. Molecular aspects of medicine 34, 236–251 (2013)

19. Orlowski, J., Grinstein, S.: Na+/H+ exchangers. Comprehensive Physiology 1, 2083–2100 (2011)

20. Donowitz, M., Mohan, S., Zhu, C.X., Chen, T.-E., Lin, R., Cha, B., Zachos, N.C., Murtazina, R., Sarker, R., Li, X.: NHE3 regulatory complexes. The Journal of experimental biology 212, 1638–1646 (2009)

21. Alexander, R.T., Grinstein, S.: Tethering, recycling and activation of the epithelial sodium-proton exchanger, NHE3. The Journal of experimental biology 212, 1630–1637 (2009)

22. Cha, B., Yang, J., Singh, V., Zachos, N.C., Sarker, R.I., Chen, T.-E., Chakraborty, M., Tse, C.-M., Donowitz, M.: PDZ domain-dependent regulation of NHE3 protein by both internal Class II and C-terminal Class I PDZ-binding motifs. The Journal of biological chemistry 292, 8279–8290 (2017)

23. Wormmeester, L., Sanchez de Medina, F., Kokke, F., Tse, C.M., KHURANA, S., Bowser, J., Cohen, M.E., Donowitz, M.: Quantitative contribution of NHE2 and NHE3 to rabbit ileal brush-border Na+/H+ exchange. The American journal of physiology 274, C1261-72 (1998)

24. Schultheis, P.J., Clarke, L.L., Meneton, P., Miller, M.L., Soleimani, M., Gawenis, L.R., Riddle, T.M., Duffy, J.J., Doetschman, T., Wang, T., et al.: Renal and intestinal absorptive defects in mice lacking the NHE3 Na+/H+ exchanger. Nature genetics 19, 282–285 (1998)

25. Schultheis, P.J., Clarke, L.L., Meneton, P., Harline, M., Boivin, G.P., Stemmermann, G., Duffy, J.J., Doetschman, T., Miller, M.L., Shull, G.E.: Targeted disruption of the murine Na+/H+ exchanger isoform 2 gene causes reduced viability of gastric parietal cells and loss of net acid secretion. J. Clin. Invest. 101, 1243–1253 (1998)

26. Ledoussal, C., Woo, A.L., Miller, M.L., Shull, G.E.: Loss of the NHE2 Na(+)/H(+) exchanger has no apparent effect on diarrheal state of NHE3-deficient mice. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology 281, G1385-96 (2001)

27. Orlowski, J., Grinstein, S.: Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. Pflugers Archiv : European journal of physiology 447, 549–565 (2004)

28. Müller, T., Wijmenga, C., Phillips, A.D., Janecke, A., Houwen, R.H., Fischer, H., Ellemunter, H., Frühwirth, M., Offner, F., Hofer, S., et al.: Congenital sodium diarrhea is an autosomal recessive disorder of sodium/proton exchange but unrelated to known candidate genes. Gastroenterology 119, 1506–1513 (2000)

29. Zachos, N.C., Tse, M., Donowitz, M.: Molecular physiology of intestinal Na+/H+ exchange. Annual review of physiology 67, 411–443 (2005)

30. Pan, W., Borovac, J., Spicer, Z., Hoenderop, J.G., Bindels, R.J., Shull, G.E., Doschak, M.R., Cordat, E., Alexander, R.T.: The epithelial sodium/proton exchanger, NHE3, is necessary for renal and intestinal calcium (re)absorption. American journal of physiology. Renal physiology 302, F943-56 (2012)

31. Rievaj, J., Pan, W., Cordat, E., Alexander, R.T.: The Na^+/H^+ exchanger isoform 3 is required for active paracellular and transcellular Ca^{2+} transport across murine cecum. American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology 305, G303-13 (2013)

32. Xue, L., Aihara, E., Wang, T.C., Montrose, M.H.: Trefoil factor 2 requires Na/H exchanger 2 activity to enhance mouse gastric epithelial repair. The Journal of biological chemistry 286, 38375–38382 (2011)

33. Mount, D.B., Romero, M.F.: The SLC26 gene family of multifunctional anion exchangers. Pflügers Archiv : European journal of physiology 447, 710–721 (2004)

34. Alper, S.L., Sharma, A.K.: The SLC26 gene family of anion transporters and channels. Molecular aspects of medicine 34, 494–515 (2013)

35. Geertsma, E.R., Chang, Y.-N., Shaik, F.R., Neldner, Y., Pardon, E., Steyaert, J., Dutzler, R.: Structure of a prokaryotic fumarate transporter reveals the architecture of the SLC26 family. Nature structural & molecular biology 22, 803–808 (2015)

36. Dorwart, M.R., Shcheynikov, N., Baker, J.M.R., Forman-Kay, J.D., Muallem, S., Thomas, P.J.: Congenital Chloride-losing Diarrhea Causing Mutations in the STAS Domain Result in Misfolding and Mistrafficking of SLC26A3. J. Biol. Chem. 283, 8711–8722 (2008)

37. Bai, X., Moraes, T.F., Reithmeier, R.A.F.: Effect of SLC26 anion transporter disease-causing mutations on the stability of the homologous STAS domain of E. coli DauA (YchM). The Biochemical journal 473, 615–626 (2016)

38. Schweinfest, C.W., Henderson, K.W., Suster, S., Kondoh, N., Papas, T.S.: Identification of a colon mucosa gene that is down-regulated in colon adenomas and adenocarcinomas. Proceedings of the National Academy of Sciences 90, 4166–4170 (1993)

39. Johns Hopkins University, Baltimore , OMIM®, MD: Online Mendelian Inheritance in Man. MIM Number: 214700, URL: https://omim.org/ [Stand 12.02.2018]

40. Höglund, P., Haila, S., Socha, J., Tomaszewski, L., Saarialho-Kere, U., Karjalainen-Lindsberg, M.L., Airola, K., Holmberg, C., La Chapelle, A. de, Kere, J.: Mutations of the Down-regulated in adenoma (DRA) gene cause congenital chloride diarrhoea. Nature genetics 14, 316–319 (1996)

41. Gamble, J.L., Fahey, K.R., Appleton, J., MacLachlan, E.: Congenital Alkalosis with Diarrhea. The Journal of Pediatrics 1945, 509–518 (1945)

42. Darrow, D.C.: Congenital Alkalosis with Diarrhea. The Journal of Pediatrics 1945, 519–532 (1945)

43. Amato, F., Cardillo, G., Liguori, R., Scorza, M., Comegna, M., Elce, A., Giordano, S., Lucaccioni, L., Lugli, L., Cardile, S., et al.: Twelve Novel Mutations in the SLC26A3 Gene in 17 Sporadic Cases of Congenital Chloride Diarrhea. Journal of pediatric gastroenterology and nutrition 65, 26–30 (2017)

44. Fuwa, K., Hosono, S., Nagano, N., Munakata, S., Fukamachi, R., Okada, T., Takahashi, S., Takahashi, S., Sato, N., Nakayama, T.: Japanese neonate with

congenital chloride diarrhea caused by SLC26A3 mutation. Pediatrics international : official journal of the Japan Pediatric Society 57, 3 (2015)

45. Schweinfest, C.W., Spyropoulos, D.D., Henderson, K.W., Kim, J.-H., Chapman, J.M., Barone, S., Worrell, R.T., Wang, Z., Soleimani, M.: slc26a3 (dra)-deficient mice display chloride-losing diarrhea, enhanced colonic proliferation, and distinct up-regulation of ion transporters in the colon. J. Biol. Chem. 281, 37962–37971 (2006)

46. Byeon, M.K., Frankel, A., Papas, T.S., Henderson, K.W., Schweinfest, C.W.: Human DRA functions as a sulfate transporter in Sf9 insect cells. Protein expression and purification 12, 67–74 (1998)

47. Whittamore, J.M., Hatch, M.: Loss of the anion exchanger DRA (Slc26a3), or PAT1 (Slc26a6), alters sulfate transport by the distal ileum and overall sulfate homeostasis. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology 313, G166-G179 (2017)

48. Lamprecht, G., Baisch, S., Schoenleber, E., Gregor, M.: Transport properties of the human intestinal anion exchanger DRA (down-regulated in adenoma) in transfected HEK293 cells. Pflügers Archiv : European journal of physiology 449, 479–490 (2005)

49. Shcheynikov, N., Wang, Y., Park, M., Ko, S.B.H., Dorwart, M., Naruse, S., Thomas, P.J., Muallem, S.: Coupling modes and stoichiometry of Cl-/HCO3- exchange by slc26a3 and slc26a6. The Journal of general physiology 127, 511–524 (2006)

50. Ohana, E., Yang, D., Shcheynikov, N., Muallem, S.: Diverse transport modes by the solute carrier 26 family of anion transporters. The Journal of Physiology 587, 2179–2185 (2009)

51. Ko, S.B.H., Shcheynikov, N., Choi, J.Y., Luo, X., Ishibashi, K., Thomas, P.J., Kim, J.Y., Kim, K.H., Lee, M.G., Naruse, S., et al.: A molecular mechanism for aberrant CFTR-dependent HCO(3)(-) transport in cystic fibrosis. The EMBO Journal 21, 5662–5672 (2002)

52. Alper, S.L., Stewart, A.K., Vandorpe, D.H., Clark, J.S., Horack, R.Z., Simpson, J.E., Walker, N.M., Clarke, L.L.: Native and recombinant Slc26a3 (downregulated in adenoma, Dra) do not exhibit properties of 2Cl-/1HCO3- exchange. American journal of physiology. Cell physiology 300, C276-86 (2011)

53. Jacob, P., Rossmann, H., Lamprecht, G., Kretz, A., Neff, C., Lin-Wu, E., Gregor, M., Groneberg, D.A., Kere, J., Seidler, U.: Down-regulated in adenoma mediates apical Cl-/HCO3- exchange in rabbit, rat, and human duodenum. Gastroenterology 122, 709–724 (2002)

54. Ko, S.B.H., Zeng, W., Dorwart, M.R., Luo, X., Kim, K.H., Millen, L., Goto, H., Naruse, S., Soyombo, A., Thomas, P.J., et al.: Gating of CFTR by the STAS domain of SLC26 transporters. Nature cell biology 6, 343 (2004)

55. Lamprecht, G., Gaco, V., Turner, J.R., Natour, D., Gregor, M.: Regulation of the Intestinal Anion Exchanger DRA (Downregulated in Adenoma). Annals of the New York Academy of Sciences 1165, 261–266 (2009)

56. Lissner, S., Nold, L., Hsieh, C.-J., Turner, J.R., Gregor, M., Graeve, L., Lamprecht, G.: Activity and PI3-kinase dependent trafficking of the intestinal anion exchanger downregulated in adenoma depend on its PDZ interaction and on lipid rafts. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology 299, 20 (2010)

57. Gorbatenko, A., Olesen, C.W., Boedtkjer, E., Pedersen, S.F.: Regulation and roles of bicarbonate transporters in cancer. Frontiers in physiology 5, 130 (2014)

58. Chapman, J.M., Knoepp, S.M., Byeon, M.K., Henderson, K.W., Schweinfest, C.W.: The colon anion transporter, down-regulated in adenoma, induces growth suppression that is abrogated by E1A. Cancer research 62, 5083–5088 (2002)

59. Roostaee, A., Guezguez, A., Beauséjour, M., Simoneau, A., Vachon, P.H., Levy, E., Beaulieu, J.-F.: Histone deacetylase inhibition impairs normal intestinal cell proliferation and promotes specific gene expression. Journal of cellular biochemistry 116, 2695–2708 (2015)

60. Kumar, A., Chatterjee, I., Gujral, T., Alakkam, A., Coffing, H., Anbazhagan, A.N., Borthakur, A., Saksena, S., Gill, R.K., Alrefai, W.A., et al.: Activation of Nuclear Factor-κB by Tumor Necrosis Factor in Intestinal Epithelial Cells and Mouse Intestinal Epithelia Reduces Expression of the Chloride Transporter SLC26A3. Gastroenterology 153, 1338-1350.e3 (2017)

61. Chatterjee, I., Kumar, A., Castilla-Madrigal, R.M., Pellon-Cardenas, O., Gill, R.K., Alrefai, W.A., Borthakur, A., Verzi, M., Dudeja, P.K.: CDX2 upregulates SLC26A3 gene expression in intestinal epithelial cells. American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology 313, G256-G264 (2017)

62. Byeon, M.K., Westerman, M.A., Maroulakou, I.G., Henderson, K.W., Suster, S., Zhang, X.K., Papas, T.S., Vesely, J., Willingham, M.C., Green, J.E., et al.: The down-regulated in adenoma (DRA) gene encodes an intestine-specific membrane glycoprotein. Oncogene 12, 387–396 (1996)

63. Melvin, J.E., Park, K., Richardson, L., Schultheis, P.J., Shull, G.E.: Mouse Down-regulated in Adenoma (DRA) Is an Intestinal Cl − /HCO 3− Exchanger and Is Up-regulated in Colon of Mice Lacking the NHE3 Na + /H + Exchanger. J. Biol. Chem. 274, 22855–22861 (1999)

64. Soleimani, M.: Expression, regulation and the role of SLC26 Cl-/HCO3-exchangers in kidney and gastrointestinal tract. Novartis Foundation symposium 273, 91-102; discussion 103-6, 261-4 (2006)

65. Lissner, S., Hsieh, C.-J., Nold, L., Bannert, K., Bodammer, P., Sultan, A., Seidler, U., Graeve, L., Lamprecht, G.: The PDZ-interaction of the intestinal anion exchanger downregulated in adenoma (DRA; SLC26A3) facilitates its movement into Rab11a-positive recycling endosomes. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology 304, 90 (2013)

66. Xie, Q., Welch, R., Mercado, A., Romero, M.F., Mount, D.B.: Molecular characterization of the murine Slc26a6 anion exchanger. Functional comparison with Slc26a1. American journal of physiology. Renal physiology 283, F826-38 (2002)

67. Seidler, U., Rottinghaus, I., Hillesheim, J., Chen, M., Riederer, B., Krabbenhöft, A., Engelhardt, R., Wiemann, M., Wang, Z., Barone, S., et al.: Sodium and chloride absorptive defects in the small intestine in Slc26a6 null mice. Pflügers Archiv : European journal of physiology 455, 757–766 (2008)

68. Wang, Z., Petrovic, S., Mann, E., Soleimani, M.: Identification of an apical Cl(-)/HCO3(-) exchanger in the small intestine. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology 282, G573-9 (2002)

69. Malakooti, J., Saksena, S., Gill, R.K., Dudeja, P.K.: Transcriptional regulation of the intestinal luminal Na^+ and Cl^- transporters. The Biochemical journal 435, 313–325 (2011)

70. Wang, Z., Wang, T., Petrovic, S., Tuo, B., Riederer, B., Barone, S., Lorenz, J.N., Seidler, U., Aronson, P.S., Soleimani, M.: Renal and intestinal transport defects in Slc26a6-null mice. American journal of physiology. Cell physiology 288, C957-65 (2005)

71. Talbot, C., Lytle, C.: Segregation of Na/H exchanger-3 and Cl/HCO3 exchanger SLC26A3 (DRA) in rodent cecum and colon. American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology 299, G358-G367 (2010)

72. Lamprecht, G., Seidler, U.: The emerging role of PDZ adapter proteins for regulation of intestinal ion transport. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology 291, 77 (2006)

73. Grant, B.D., Donaldson, J.G.: Pathways and mechanisms of endocytic recycling. Nature reviews. Molecular cell biology 10, 597–608 (2009)

74. Stenmark, H.: Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. Nature reviews. Molecular cell biology 10, 513–525 (2009)

75. Li, G., Marlin, M.C.: Rab Family of GTPases. In: Li, G. (ed.) Rab GTPases. Methods and protocols, pp. 1–15. Springer, New York, NY (2015)

76. Wandinger-Ness, A., Zerial, M.: Rab proteins and the compartmentalization of the endosomal system. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 6, a022616 (2014)

77. Doherty, G.J., McMahon, H.T.: Mechanisms of endocytosis. Annual review of biochemistry 78, 857–902 (2009)

78. Gautreau, A., Oguievetskaia, K., Ungermann, C.: Function and Regulation of the Endosomal Fusion and Fission Machineries. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 6 (2014)

79. Chi, R.J., Harrison, M.S., Burd, C.G.: Biogenesis of endosome-derived transport carriers. Cellular and molecular life sciences : CMLS 72, 3441–3455 (2015)

80. Huotari, J., Helenius, A.: Endosome maturation. The EMBO Journal 30, 3481–3500 (2011)

81. Chow, C.-W., Khurana, S., Woodside, M., Grinstein, S., Orlowski, J.: The Epithelial Na+/H+ Exchanger, NHE3, Is Internalized through a Clathrin-mediated Pathway. J. Biol. Chem. 274, 37551–37558 (1999)

82. Kim, J.H., Lee-Kwon, W., Park, J.B., Ryu, S.H., Yun, C.H.C., Donowitz, M.: Ca(2+)-dependent inhibition of Na+/H+ exchanger 3 (NHE3) requires an NHE3-E3KARP-alpha-actinin-4 complex for oligomerization and endocytosis. J. Biol. Chem. 277, 23714–23724 (2002)

83. Gujral, T., Kumar, A., Priyamvada, S., Saksena, S., Gill, R.K., Hodges, K., Alrefai, W.A., Hecht, G.A., Dudeja, P.K.: Mechanisms of DRA recycling in intestinal epithelial cells: effect of enteropathogenic E. coli. American journal of physiology. Cell physiology 309, 46 (2015)

84. Gill, R.K., Borthakur, A., Hodges, K., Turner, J.R., Clayburgh, D.R., Saksena, S., Zaheer, A., Ramaswamy, K., Hecht, G., Dudeja, P.K.: Mechanism underlying inhibition of intestinal apical Cl/OH exchange following infection with enteropathogenic E. coli. J. Clin. Invest. 117, 428–437 (2007)

85. Shenolikar, S., Voltz, J.W., Cunningham, R., Weinman, E.J.: Regulation of ion transport by the NHERF family of PDZ proteins. Physiology (Bethesda, Md.) 19, 362–369 (2004)

86. Harris, B.Z., Lim, W.A.: Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. Journal of cell science 114, 3219–3231 (2001)

87. Dunn, H.A., Ferguson, S.S.: PDZ Protein Regulation of GPCR Trafficking and Signaling Pathways. Molecular pharmacology (2015)

88. Feng, W., Zhang, M.: Organization and dynamics of PDZ-domain-related supramodules in the postsynaptic density. Nature reviews. Neuroscience 10, 87–99 (2009)

89. Wu, H., Feng, W., Chen, J., Chan, L.-N., Huang, S., Zhang, M.: PDZ domains of Par-3 as potential phosphoinositide signaling integrators. Molecular cell 28, 886–898 (2007)

90. Donowitz, M., Cha, B., Zachos, N.C., Brett, C.L., Sharma, A., Tse, C.M., Li, X.: NHERF family and NHE3 regulation. The Journal of Physiology 567, 3–11 (2005)

91. Seidler, U., Singh, A.K., Cinar, A., Chen, M., Hillesheim, J., Hogema, B., Riederer, B.: The role of the NHERF family of PDZ scaffolding proteins in the regulation of salt and water transport. Annals of the New York Academy of Sciences 1165, 249–260 (2009)

92. Yun, C.H., Lamprecht, G., Forster, D.V., Sidor, A.: NHE3 kinase A regulatory protein E3KARP binds the epithelial brush border Na+/H+ exchanger NHE3 and the cytoskeletal protein ezrin. J. Biol. Chem. 273, 25856–25863 (1998)

93. Lau, A.G., Hall, R.A.: Oligomerization of NHERF-1 and NHERF-2 PDZ domains. Differential regulation by association with receptor carboxyl-termini and by phosphorylation. Biochemistry 40, 8572–8580 (2001)

94. Rossmann, H., Jacob, P., Baisch, S., Hassoun, R., Meier, J., Natour, D., Yahya, K., Yun, C., Biber, J., Lackner, K.J., et al.: The CFTR associated protein CAP70 interacts with the apical Cl-/HCO3- exchanger DRA in rabbit small intestinal mucosa. Biochemistry 44, 4477–4487 (2005)

95. Zachos, N.C., Li, X., Kovbasnjuk, O., Hogema, B., Sarker, R., Lee, L.J., Li, M., Jonge, H. de, Donowitz, M.: NHERF3 (PDZK1) contributes to basal and calcium inhibition of NHE3 activity in Caco-2BBe cells. J. Biol. Chem. 284, 23708–23718 (2009)

96. Zachos, N.C., Hodson, C., Kovbasnjuk, O., Li, X., Thelin, W.R., Cha, B., Milgram, S., Donowitz, M.: Elevated intracellular calcium stimulates NHE3 activity by an IKEPP (NHERF4) dependent mechanism. Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology 22, 693–704 (2008)

97. Yun, C.H., Oh, S., ZIZAK, M., Steplock, D., Tsao, S., Tse, C.M., Weinman, E.J., Donowitz, M.: cAMP-mediated inhibition of the epithelial brush border Na+/H+ exchanger, NHE3, requires an associated regulatory protein. Proceedings of the National Academy of Sciences 94, 3010–3015 (1997)

98. Lamprecht, G., Weinman, E.J., Yun, C.H.: The role of NHERF and E3KARP in the cAMP-mediated inhibition of NHE3. J. Biol. Chem. 273, 29972–29978 (1998)

99. Hall, R.A., Premont, R.T., Chow, C.W., Blitzer, J.T., Pitcher, J.A., Claing, A., Stoffel, R.H., Barak, L.S., Shenolikar, S., Weinman, E.J., et al.: The beta2-adrenergic receptor interacts with the Na+/H+-exchanger regulatory factor to control Na+/H+ exchange. Nature 392, 626–630 (1998)

100. Cha, B., Kim, J.H., Hut, H., Hogema, B.M., Nadarja, J., Zizak, M., Cavet, M., Lee-Kwon, W., Lohmann, S.M., Smolenski, A., et al.: cGMP inhibition of Na+/H+

antiporter 3 (NHE3) requires PDZ domain adapter NHERF2, a broad specificity protein kinase G-anchoring protein. J. Biol. Chem. 280, 16642–16650 (2005)

101. Avula, L.R., Chen, T., Kovbasnjuk, O., Donowitz, M.: Both NHERF3 and NHERF2 are necessary for multiple aspects of acute regulation of NHE3 by elevated Ca2+, cGMP and lysophosphatidic acid. American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology, ajpgi.00140.2017 (2017)
102. Yun, C.C., Chen, Y., Lang, F.: Glucocorticoid activation of Na(+)/H(+) exchanger isoform 3 revisited. The roles of SGK1 and NHERF2. J. Biol. Chem. 277, 7676–7683 (2002)
103. Chernova, M.N., Jiang, L., Shmukler, B.E., Schweinfest, C.W., Blanco, P., Freedman, S.D., Stewart, A.K., Alper, S.L.: Acute regulation of the SLC26A3 congenital chloride diarrhoea anion exchanger (DRA) expressed in Xenopus oocytes. The Journal of Physiology 549, 3–19 (2003)
104. Li, X., Zhang, H., Cheong, A., Leu, S., Chen, Y., Elowsky, C.G., Donowitz, M.: Carbachol regulation of rabbit ileal brush border Na+-H+ exchanger 3 (NHE3) occurs through changes in NHE3 trafficking and complex formation and is Src dependent. The Journal of Physiology 556, 791–804 (2004)
105. Donowitz, M., Li, X.: Regulatory binding partners and complexes of NHE3. Physiological reviews 87, 825–872 (2007)
106. Pavlos, N.J., Friedman, P.A.: GPCR Signaling and Trafficking. The Long and Short of It. Trends in endocrinology and metabolism: TEM 28, 213–226 (2017)
107. Worby, C.A., Dixon, J.E.: Sorting out the cellular functions of sorting nexins. Nature reviews. Molecular cell biology 3, 919–931 (2002)
108. Cullen, P.J.: Endosomal sorting and signalling: an emerging role for sorting nexins. Nature reviews. Molecular cell biology 9, 574–582 (2008)
109. Rincón, E., Sáez de Guinoa, Julia, Gharbi, S.I., Sorzano, Carlos O S, Carrasco, Y.R., Mérida, I.: Translocation dynamics of sorting nexin 27 in activated T cells. Journal of cell science 124, 776–788 (2011)
110. Ghai, R., Bugarcic, A., Liu, H., Norwood, S.J., Skeldal, S., Coulson, E.J., Li, S.S.-C., Teasdale, R.D., Collins, B.M.: Structural basis for endosomal trafficking of diverse transmembrane cargos by PX-FERM proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110, 52 (2013)
111. Tello-Lafoz, M., Ghai, R., Collins, B., Mérida, I.: A role for novel lipid interactions in the dynamic recruitment of SNX27 to the T-cell immune synapse. Bioarchitecture 4, 215–220 (2014)
112. Lauffer, Benjamin E L, Melero, C., Temkin, P., Lei, C., Hong, W., Kortemme, T., Zastrow, M. von: SNX27 mediates PDZ-directed sorting from endosomes to the plasma membrane. The Journal of cell biology 190, 565–574 (2010)
113. Balana, B., Bahima, L., Bodhinathan, K., Taura, J.J., Taylor, N.M., Nettleton, M.Y., Ciruela, F., Slesinger, P.A.: Ras-association domain of sorting Nexin 27 is critical for regulating expression of GIRK potassium channels. PloS one 8, e59800 (2013)
114. Cai, L., Loo, L.S., Atlashkin, V., Hanson, B.J., Hong, W.: Deficiency of sorting nexin 27 (SNX27) leads to growth retardation and elevated levels of N-methyl-D-aspartate receptor 2C (NR2C). Molecular and cellular biology 31, 1734–1747 (2011)
115. Joubert, L., Hanson, B., Barthet, G., Sebben, M., Claeysen, S., Hong, W., Marin, P., Dumuis, A., Bockaert, J.: New sorting nexin (SNX27) and NHERF specifically

interact with the 5-HT4a receptor splice variant: roles in receptor targeting. Journal of cell science 117, 5367–5379 (2004)

116. Kajii, Y., Muraoka, S., Hiraoka, S., Fujiyama, K., Umino, A., Nishikawa, T.: A developmentally regulated and psychostimulant-inducible novel rat gene mrt1 encoding PDZ-PX proteins isolated in the neocortex. Molecular psychiatry 8, 434–444 (2003)
117. UniProt: UniProtKB - Q96L92 (SNX27_HUMAN), URL: http://www.uniprot.org/uniprot/Q96L92 [Stand: 08.01.2018]
118. The Human Protein Atlas: SNX27, URL: https://www.proteinatlas.org/ENSG00000143376-SNX27/tissue [Stand 08.01.2018]
119. Wang, X., Huang, T., Zhao, Y., Zheng, Q., Thompson, R.C., Bu, G., Zhang, Y.-w., Hong, W., Xu, H.: Sorting nexin 27 regulates Aβ production through modulating γ-secretase activity. Cell reports 9, 1023–1033 (2014)
120. Wang, X., Zhao, Y., Zhang, X., Badie, H., Zhou, Y., Mu, Y., Loo, L.S., Cai, L., Thompson, R.C., Yang, B., et al.: Loss of sorting nexin 27 contributes to excitatory synaptic dysfunction by modulating glutamate receptor recycling in Down's syndrome. Nature medicine 19, 473–480 (2013)
121. Wang, X., Zhou, Y., Wang, J., Tseng, I.-C., Huang, T., Zhao, Y., Zheng, Q., Gao, Y., Luo, H., Zhang, X., et al.: SNX27 Deletion Causes Hydrocephalus by Impairing Ependymal Cell Differentiation and Ciliogenesis. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 36, 12586–12597 (2016)
122. Bannert, K.: Gehört Sorting Nexin 27 (SNX27) zur NHERF-Familie? Bindungsstudien an den intestinalen Anionenaustauscher DRA (SLC26A3). Masterarbeit; Universitätsmedizin Rostock, Abteilung für Gastroenterologie und Endokrinologie (2013)
123. Steinberg, F., Gallon, M., Winfield, M., Thomas, E.C., Bell, A.J., Heesom, K.J., Tavaré, J.M., Cullen, P.J.: A global analysis of SNX27-retromer assembly and cargo specificity reveals a function in glucose and metal ion transport. Nat Cell Biol 15, 461–471 (2013)
124. Lunn, M.-L., Nassirpour, R., Arrabit, C., Tan, J., McLeod, I., Arias, C.M., Sawchenko, P.E., Yates, J.R., Slesinger, P.A.: A unique sorting nexin regulates trafficking of potassium channels via a PDZ domain interaction. Nature neuroscience 10, 1249–1259 (2007)
125. Hayashi, H., Naoi, S., Nakagawa, T., Nishikawa, T., Fukuda, H., Imajoh-Ohmi, S., Kondo, A., Kubo, K., Yabuki, T., Hattori, A., et al.: Sorting nexin 27 interacts with multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4) and mediates internalization of MRP4. The Journal of biological chemistry 287, 15054–15065 (2012)
126. Singh, V., Yang, J., Cha, B., Chen, T.-e., Sarker, R., Yin, J., Avula, L.R., Tse, M., Donowitz, M.: Sorting nexin 27 regulates basal and stimulated brush border trafficking of NHE3. Molecular Biology of the Cell 26, 2030–2043 (2015)
127. Sun, L., Hu, X., Chen, W., He, W., Zhang, Z., Wang, T.: Sorting nexin 27 interacts with Fzd7 and mediates Wnt signalling. Bioscience reports 36, e00296 (2016)
128. Burd, C., Cullen, P.J.: Retromer. A Master Conductor of Endosome Sorting. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 6, a016774-a016774 (2014)
129. Seaman, M.N., Marcusson, E.G., Cereghino, J.L., Emr, S.D.: Endosome to Golgi retrieval of the vacuolar protein sorting receptor, Vps10p, requires the function of

the VPS29, VPS30, and VPS35 gene products. The Journal of cell biology 137, 79–92 (1997)

130. Seaman, M.N.J.: The retromer complex - endosomal protein recycling and beyond. Journal of cell science 125, 4693–4702 (2012)
131. Pfeffer, S.R.: A nexus for receptor recycling. Nat Cell Biol 15, 446–448 (2013)
132. Lee, S., Chang, J., Blackstone, C.: FAM21 directs SNX27–retromer cargoes to the plasma membrane by preventing transport to the Golgi apparatus. Nat Comms 7, 10939 (2016)
133. Rojas, R., Kametaka, S., Haft, C.R., Bonifacino, J.S.: Interchangeable but essential functions of SNX1 and SNX2 in the association of retromer with endosomes and the trafficking of mannose 6-phosphate receptors. Molecular and cellular biology 27, 1112–1124 (2007)
134. Wassmer, T., Attar, N., Bujny, M.V., Oakley, J., Traer, C.J., Cullen, P.J.: A loss-of-function screen reveals SNX5 and SNX6 as potential components of the mammalian retromer. Journal of cell science 120, 45–54 (2007)
135. Temkin, P., Lauffer, B., Jäger, S., Cimermancic, P., Krogan, N.J., Zastrow, M. von: SNX27 mediates retromer tubule entry and endosome-to-plasma membrane trafficking of signalling receptors. Nature cell biology 13, 715–721 (2011)
136. Mukadam, A.S., Seaman, M.N.J.: Retromer-mediated endosomal protein sorting. The role of unstructured domains. FEBS Letters 589, 2620–2626 (2015)
137. Gallon, M., Clairfeuille, T., Steinberg, F., Mas, C., Ghai, R., Sessions, R.B., Teasdale, R.D., Collins, B.M., Cullen, P.J.: A unique PDZ domain and arrestin-like fold interaction reveals mechanistic details of endocytic recycling by SNX27-retromer. Proceedings of the National Academy of Sciences 111, E3604-E3613 (2014)
138. Damseh, N., Danson, C.M., Al-Ashhab, M., Abu-Libdeh, B., Gallon, M., Sharma, K., Yaacov, B., Coulthard, E., Caldwell, M.A., Edvardson, S., et al.: A defect in the retromer accessory protein, SNX27, manifests by infantile myoclonic epilepsy and neurodegeneration. Neurogenetics (2015)
139. Li, C., Shah, S.Z.A., Zhao, D., Yang, L.: Role of the Retromer Complex in Neurodegenerative Diseases. Front. Aging Neurosci. 8, e92648 (2016)
140. Follett, J., Bugarcic, A., Collins, B.M., Teasdale, R.D.: Retromer's Role in Endosomal Trafficking and Impaired Function in Neurodegenerative Diseases. Current protein & peptide science 18, 687–701 (2017)
141. Birnboim, H.C., Doly, J.: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic acids research 7, 1513–1523 (1979)
142. Bidmon, H.J., Stumpf, W.E.: Uptake, distribution and binding of vertebrate and invertebrate steroid hormones and time-dependence of ponasterone A binding in Calliphora vicina. Comparisons among cholesterol, corticosterone, cortisol, dexamethasone, 5 alpha-dihydrotestosterone, 1,25-dihydroxyvitamin D3, ecdysone, estradiol-17 beta, ponasterone A, progesterone, and testosterone. Histochemistry 96, 419–434 (1991)
143. No, D., Yao, T.P., Evans, R.M.: Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. Proceedings of the National Academy of Sciences 93, 3346–3351 (1996)
144. Lea, T.: Caco-2 Cell Line. In: Verhoeckx, K., Cotter, P. (eds.) The impact of food bioactives on gut health. In vitro and ex vivo models, pp. 103–111. SpringerOpen; COST, Cham, [Brussels, Belgium] (2015)

145. Gossen, M., Bujard, H.: Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. Proceedings of the National Academy of Sciences 89, 5547–5551 (1992)

146. Le Shen, Black, E.D., Witkowski, E.D., Lencer, W.I., Guerriero, V., Schneeberger, E.E., Turner, J.R.: Myosin light chain phosphorylation regulates barrier function by remodeling tight junction structure. Journal of cell science 119, 2095–2106 (2006)

147. Rao, D.D., Vorhies, J.S., Senzer, N., Nemunaitis, J.: siRNA vs. shRNA. Similarities and differences. Advanced drug delivery reviews 61, 746–759 (2009)

148. Gibbons, J.: Western blot. Protein transfer overview. North American journal of medical sciences 6, 158–159 (2014)

149. Thermo Fisher Scientific: Pierce Cell Surface Protein Isolation Kit. Instructions, Number 89881. 1511.7 (2018)

150. Boyarsky, G., Ganz, M.B., Sterzel, R.B., Boron, W.F.: pH regulation in single glomerular mesangial cells. II. Na+-dependent and -independent Cl(-)-HCO3-exchangers. The American journal of physiology 255, C857-69 (1988)

151. Lamprecht, G., Schaefer, J., Dietz, K., Gregor, M.: Chloride and bicarbonate have similar affinities to the intestinal anion exchanger DRA (down regulated in adenoma). Pflügers Archiv : European journal of physiology 452, 307–315 (2006)

152. Hedde, P.N., Nienhaus, G.U.: Optical imaging of nanoscale cellular structures. Biophysical reviews 2, 147–158 (2010)

153. Hirano, Y., Matsuda, A., Hiraoka, Y.: Recent advancements in structured-illumination microscopy toward live-cell imaging. Microscopy (Oxford, England) 64, 237–249 (2015)

154. Garini, Y., Vermolen, B.J., Young, I.T.: From micro to nano. Recent advances in high-resolution microscopy. Current opinion in biotechnology 16, 3–12 (2005)

155. Wilson, G., Hassan, I.F., Dix, C.J., Williamson, I., Shah, R., Mackay, M.: Transport and Permeability Properties of Human Caco-2 cells. An in vitro Model of the Intestinal Epithelial Cell Barrier. Journal of Controlled Release, 25–40 (1990)

156. Manders, E.M.M., Verbeek, F.J., Aten, J.A.: Measurement of co-localization of objects in dual-color confocal images. Journal of Microscopy, 375–382 (1993)

157. Carlton, J., Bujny, M., Rutherford, A., Cullen, P.: Sorting nexins-unifying trends and new perspectives. Traffic (Copenhagen, Denmark) 6, 75–82 (2005)

158. Moore, C.B., Guthrie, E.H., Huang, M.T.-H., Taxman, D.J.: Short hairpin RNA (shRNA). Design, delivery, and assessment of gene knockdown. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) 629, 141–158 (2010)

159. Stepanenko, A.A., Heng, H.H.: Transient and stable vector transfection. Pitfalls, off-target effects, artifacts. Mutation research 773, 91–103 (2017)

160. Merkulova, M., Păunescu, T.G., Azroyan, A., Marshansky, V., Breton, S., Brown, D.: Mapping the H(+) (V)-ATPase interactome. Identification of proteins involved in trafficking, folding, assembly and phosphorylation. Scientific reports 5, 14827 (2015)

161. Simons, K., Ikonen, E.: Functional rafts in cell membranes. Nature 387, 569–572 (1997)

162. Simons, K., Toomre, D.: Lipid rafts and signal transduction. Nature reviews. Molecular cell biology 1, 31–39 (2000)

163. Ostedgaard, L.S., Randak, C., Rokhlina, T., Karp, P., Vermeer, D., Ashbourne Excoffon, K.J., Welsh, M.J.: Effects of C-terminal deletions on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function in cystic fibrosis airway epithelia. Proceedings of the National Academy of Sciences 100, 1937–1942 (2003)

164. Benharouga, M., Sharma, M., So, J., Haardt, M., Drzymala, L., Popov, M., Schwapach, B., Grinstein, S., Du, K., Lukacs, G.L.: The role of the C terminus and Na+/H+ exchanger regulatory factor in the functional expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in nonpolarized cells and epithelia. J. Biol. Chem. 278, 22079–22089 (2003)

165. Ball, G., Demmerle, J., Kaufmann, R., Davis, I., Dobbie, I.M., Schermelleh, L.: SIMcheck. A Toolbox for Successful Super-resolution Structured Illumination Microscopy. Scientific reports 5, 15915 (2015)

166. Dunn, K.W., Kamocka, M.M., McDonald, J.H.: A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. American journal of physiology. Cell physiology 300, C723-42 (2011)

167. Merino-Trigo, A., Kerr, M.C., Houghton, F., Lindberg, A., Mitchell, C., Teasdale, R.D., Gleeson, P.A.: Sorting nexin 5 is localized to a subdomain of the early endosomes and is recruited to the plasma membrane following EGF stimulation. Journal of cell science 117, 6413–6424 (2004)

168. Rincón, E., Santos, T., Avila-Flores, A., Albar, J.P., Lalioti, V., Lei, C., Hong, W., Mérida, I.: Proteomics identification of sorting nexin 27 as a diacylglycerol kinase zeta-associated protein. New diacylglycerol kinase roles in endocytic recycling. Molecular & cellular proteomics : MCP 6, 1073–1087 (2007)

169. Rojas, R., van Vlijmen, T., Mardones, G.A., Prabhu, Y., Rojas, A.L., Mohammed, S., Heck, A.J.R., Raposo, G., van der Sluijs, P., Bonifacino, J.S.: Regulation of retromer recruitment to endosomes by sequential action of Rab5 and Rab7. The Journal of cell biology 183, 513–526 (2008)

170. Wu, S., Fagan, R.R., Uttamapinant, C., Lifshitz, L.M., Fogarty, K.E., Ting, A.Y., Melikian, H.E.: The Dopamine Transporter Recycles via a Retromer-Dependent Postendocytic Mechanism. Tracking Studies Using a Novel Fluorophore-Coupling Approach. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 37, 9438–9452 (2017)

171. Abubakar, Y.S., Zheng, W., Olsson, S., Zhou, J.: Updated Insight into the Physiological and Pathological Roles of the Retromer Complex. International journal of molecular sciences 18 (2017)

172. Nooh, M.M., Mancarella, S., Bahouth, S.W.: Identification of novel transplantable GPCR recycling motif for drug discovery. Biochemical pharmacology 120, 22–32 (2016)

173. Eggers, C.T., Schafer, J.C., Goldenring, J.R., Taylor, S.S.: D-AKAP2 interacts with Rab4 and Rab11 through its RGS domains and regulates transferrin receptor recycling. The Journal of biological chemistry 284, 32869–32880 (2009)

174. Lee-Kwon, W., Kim, J.H., Choi, J.W., Kawano, K., Cha, B., Dartt, D.A., Zoukhri, D., Donowitz, M.: Ca2+-dependent inhibition of NHE3 requires PKC alpha which binds to E3KARP to decrease surface NHE3 containing plasma membrane complexes. American journal of physiology. Cell physiology 285, C1527-36 (2003)

175. Dart, C.: Lipid microdomains and the regulation of ion channel function. The Journal of Physiology 588, 3169–3178 (2010)

176. Murtazina, R., Kovbasnjuk, O., Donowitz, M., Li, X.: Na+/H+ exchanger NHE3 activity and trafficking are lipid Raft-dependent. J. Biol. Chem. 281, 17845–17855 (2006)

177. Saksena, S., Tyagi, S., Goyal, S., Gill, R.K., Alrefai, W.A., Ramaswamy, K., Dudeja, P.K.: Stimulation of apical Cl(-)/HCO(3)(-)(OH(-)) exchanger, SLC26A3 by neuropeptide Y is lipid raft dependent. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology 299, G1334-43 (2010)

178. Nooh, M.M., Chumpia, M.M., Hamilton, T.B., Bahouth, S.W.: Sorting of β1-adrenergic receptors is mediated by pathways that are either dependent on or independent of type I PDZ, protein kinase A (PKA), and SAP97. The Journal of biological chemistry 289, 2277–2294 (2014)

179. Puthenveedu, M.A., Lauffer, B., Temkin, P., Vistein, R., Carlton, P., Thorn, K., Taunton, J., Weiner, O.D., Parton, R.G., Zastrow, M. von: Sequence-dependent sorting of recycling proteins by actin-stabilized endosomal microdomains. Cell 143, 761–773 (2010)

Anhang

A1 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid/Bis-Lösung 40 % (29:1)	Bio-Rad, München
Agar Technical (Agar No. 3)	Oxoid, Wesel
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampicillin-Natriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau-Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Steinheim
BSA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calcium-D-Gluconat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chloroform	AppliChem, Darmstadt
D-Glucose	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol (absolut; 96 %; 70 %)	Zentralapotheke, Universitätsmedizin Rostock
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
FBS Superior	Biochrom, Berlin
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Glyzerol	AppliChem, Darmstadt
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Zentralapotheke, Universitätsmedizin Rostock
IUPAC pH Pufferlösungen (pH 4,005; 7,000 bzw. 10,012)	Radiometer Analytical SAS, Lyon
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Kalium-D-Gluconat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kanamycinsulfat	Carl Roth, Karlsruhe
LB-Broth Base	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
LE-Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
Magnesium-D-Gluconat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	J.T. Baker, Deventer, Niederlande

Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumgluconat	AppliChem, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth, Karlsruhe
Nuklease-freies Wasser	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Orange G	Sigma-Aldrich, Steinheim
Paraformaldehyd, reinst	Carl Roth, Karlsruhe
PBS (pH 7,4; 10X; steril; ohne $CaCl_2$ und $MgCl_2$)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
PBS (pH 7,4; 1X; steril; ohne $CaCl_2$ und $MgCl_2$)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
SDS, ultrapure	Carl Roth, Karlsruhe
Tetramethylammoniumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypanblau 0,4 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween-20	Carl Roth, Karlsruhe

A2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen	Carl Roth, Karlsruhe
Falcon-Röhrchen (15 ml; 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Falcon-Röhrchen mit Zellenfilterkappe	Corning, Wiesbaden
Feindosierungsspritze (Omnican F, 1 ml)	Braun, Melsungen
Klebefolie (optisch klar)	Sarstedt, Nümbrecht
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Multiwellplatten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Objektträger	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Parafilm	Carl Roth, Karlsruhe
PCR SoftTubes	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Petrischalen, steril	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen Gel Load	Werner Hassa, Lübeck
Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg

Reaktionsgefäße Low Binding (1,5 ml; 2,0 ml)	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
serologische Pipetten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
serologische Pipetten, steril	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Spritzen, steril	BD, Heidelberg
Spritzenfilter, steril	Corning, Wiesbaden
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht

A3 Geräte

Absaugsystem (Vacusafe Comfort)	Integra Biosciences, Biebertal
Abzug	Bense Laborbau, Hardegsen
Analysenwaage (BP4100S)	Sartorius, Göttingen
Gefrierbehälter (Mr. Frosty, Nalgene)	Hettich, Tuttlingen
Heizblock (HBT 132-2)	HLC, Bovenden
Heizblock (Techne DB3)	Cole-Parmer, Staffordshire, Großbritannien
Inkubator (CB150)	Binder, Tuttlingen
Inverses Fluoreszenzmikroskop (CKX41)	Olympus, Hamburg
Inverses Mikroskop (Axiovert 25)	Carl Zeiss, Oberkochen
Kühlzentrifuge (Mikro 200R)	Hettich, Tuttlingen
Kühlzentrifuge (Rotina 380R)	Hettich, Tuttlingen
Magnetrührer (ARE2)	UniEquip, Planegg
Magnetrührer (Variomag Mono)	H+P, Oberschleißheim
Mikrobiologischer Mini-Inkubator	Labnet, Woodbridge, New Jersey, USA
Orbital-Inkubator (S1500)	Stuart, Paris, Frankreich
pH-Meter (PHM 220, MeterLab)	Radiometer Analytical SAS, Lyon, Frankreich
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Plexiglas-Badgefäß (19A)	Julabo, Seelbach
Präzisionswaage (A120P)	Sartorius, Göttingen
Rotator (SB3)	Stuart, Paris, Frankreich
Schüttler für Mikrotiterplatten (MTS4)	IKA Labortechnik, Staufen
Sterilwerkbank (HERAsafe KS)	Heraeus, Hanau

Sterilwerkbank (MSC-Advantage)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Stromversorgungsgerät (Power Pack P25)	Biometra, Göttingen
Stromversorgungsgerät (PowerPac 1000)	Bio-Rad, München
Taumelschüttler (Rocker 3D basic)	IKA Labortechnik, Staufen
Thermostat (EC)	Julabo, Seelbach
Vortex ($2x^3$)	UniEquip, Planegg
Wasserbad (WBT6)	Labortechnik Medingen, Arnsdorf
Zentrifuge (5415C)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge (Megafuge 1.0 R)	Heraeus, Hanau
Zentrifuge (Mikro 200)	Hettich, Tuttlingen

A4 Puffer und Gebrauchslösungen

[A] TAE-Puffer (50-fach konzentriert, pH 8,0)

2 M Tris
50 mM EDTA

Vor der Verwendung wurde der Puffer 1:100 mit A. dest. verdünnt.

[B] Ladepuffer für die Agarose-Gelelektrophorese

50 % (v/v) Glycerol
120 mM EDTA
10 mM Tris
5 % (v/v) A. dest.
Spatelspitze Orange G

[C] LB-Agar

5 g LB-Broth Base
3,75 g Agar
250 ml A. dest.

Vor der Verwendung wurde der LB-Agar autoklaviert und der jeweilige Selektionszusatz hinzugegeben: Ampicillin-Natriumsalz (100 µg/ml) bzw. Kanamycinsulfat (50 µg/ml). Anschließend wurde die Lösung in sterile Petrischalen gegossen.

[D] LB-Medium

15 g LB-Broth Base
750 ml A. dest.

Vor der Verwendung wurde das LB-Medium autoklaviert und der jeweilige Selektionszusatz hinzugegeben: Ampicillin-Natriumsalz (100 µg/ml) bzw. Kanamycinsulfat (50 µg/ml).

[E] Einfriermedium

70 % (v/v) Zellkulturmedium
20 % (v/v) FBS
10 % (v/v) DMSO

Vor der Verwendung wurde das Einfriermedium sterilfiltriert.

[F] TBS

140 mM Natriumchlorid

15 mM Tris

[G] Probenpuffer (4-fach konzentriert)

250 mM Tris (pH 6,8)

280 mM SDS

40 % (v/v) Glycerol

100 mM DTT

Spatelspitze Bromphenolblau-Natriumsalz

Der Probenpuffer wurde vor der Verwendung 1:2 mit A. dest. verdünnt.

[H] Elektrophoresepuffer

25 mM Tris

188 mM Glycin

3,5 mM SDS

[I] Trenngelpuffer (pH 8,8)

1,5 M Tris

14 mM SDS

[J] Sammelgelpuffer (pH 6,8)

0,5 M Tris

14 mM SDS

[K] Transferpuffer

25 mM Tris

193 mM Glycin

7,5 % (v/v) Methanol

50 µM SDS

[L] Standardpuffer für die Fluorometrie

5 mM Kalium-D-Gluconat

2 mM Magnesium-D-Gluconat

1 mM Calcium-D-Gluconat

10 mM HEPES

10 mM D-Glucose

[M] Puffer 3 für die Fluorometrie

115 mM Natriumchlorid

25 mM Natriumhydrogencarbonat

Der Puffer wurde in Standardpuffer [L] angesetzt, mit Carbogen begast und auf einen pH-Wert von 7,45 - 7,50 eingestellt.

[N] Puffer 4 für die Fluorometrie

115 mM Natriumgluconat

25 mM Natriumhydrogencarbonat

Der Puffer wurde in Standardpuffer [L] angesetzt, mit Carbogen begast und auf einen pH-Wert von 7,45 - 7,50 eingestellt.

[O] Kalibrationspuffer für die Fluorometrie (pH 7,0 und pH 7,5)

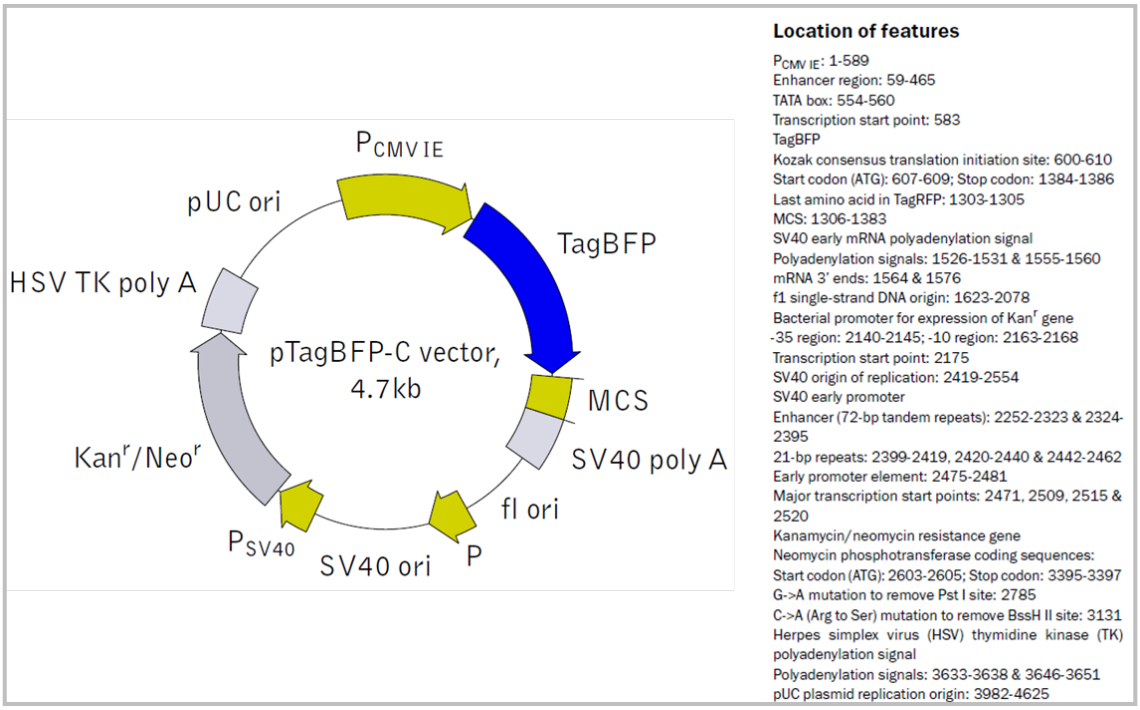
100 mM Kaliumchlorid

40 mM Tetramethylammoniumchlorid

Der Puffer wurde in Standardpuffer [L] angesetzt, mit Sauerstoff begast und auf einen pH-Wert von 7,00 bzw. 7,50 eingestellt. Der Kalibrationspuffer mit dem pH-Wert von 7,00 wurde zudem 1:1.000 mit Nigericin versetzt. Der Kalibrationspuffer mit dem pH-Wert von 7,50 wurde 1:2.000 mit Nigericin versetzt.

A5 Verwendete Vektoren

pTagBFP-C (Evrogen, Moskau, Russland)

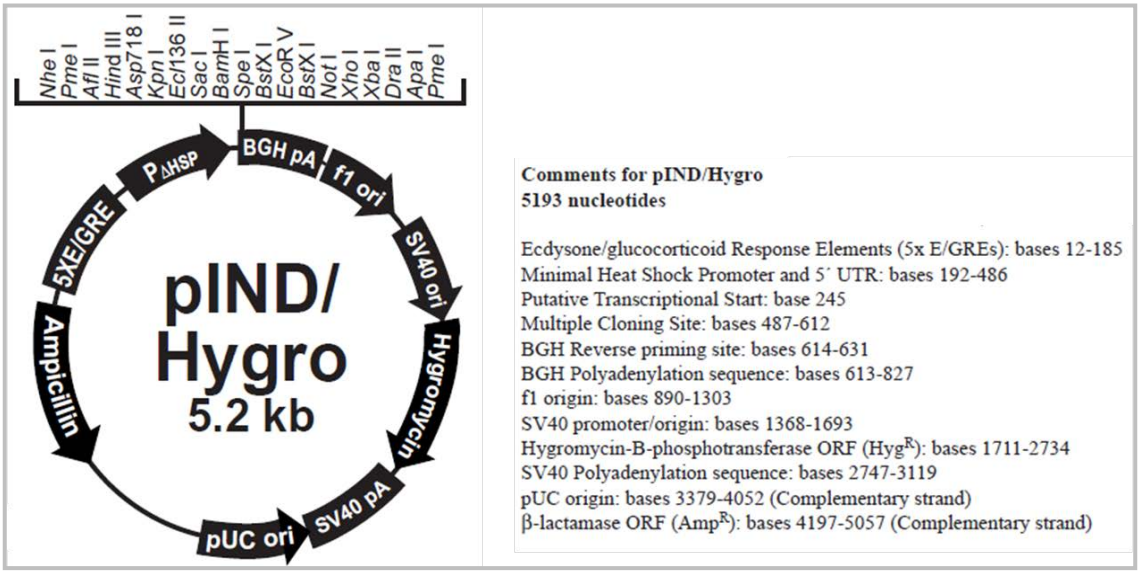


Location of features

PCMV IE: 1-589
Enhancer region: 59-465
TATA box: 554-560
Transcription start point: 583
TagBFP
Kozak consensus translation initiation site: 600-610
Start codon (ATG): 607-609; Stop codon: 1384-1386
Last amino acid in TagRFP: 1303-1305
MCS: 1306-1383
SV40 early mRNA polyadenylation signal
Polyadenylation signals: 1526-1531 & 1555-1560
mRNA 3' ends: 1564 & 1576
f1 single-strand DNA origin: 1623-2078
Bacterial promoter for expression of Kanr gene
-35 region: 2140-2145; -10 region: 2163-2168
Transcription start point: 2175
SV40 origin of replication: 2419-2554
SV40 early promoter
Enhancer (72-bp tandem repeats): 2252-2323 & 2324-2395
21-bp repeats: 2399-2419, 2420-2440 & 2442-2462
Early promoter element: 2475-2481
Major transcription start points: 2471, 2509, 2515 & 2520
Kanamycin/neomycin resistance gene
Neomycin phosphotransferase coding sequences:
Start codon (ATG): 2603-2605; Stop codon: 3395-3397
G->A mutation to remove Pst I site: 2785
C->A (Arg to Ser) mutation to remove BssH II site: 3131
Herpes simplex virus (HSV) thymidine kinase (TK) polyadenylation signal
Polyadenylation signals: 3633-3638 & 3646-3651
pUC plasmid replication origin: 3982-4625

[Datenblatt pTagBFP-C, http://evrogen.com/vector-descriptions/pTagBFP-C/pTagBFP-C.pdf, abgerufen am 10.11.2017]

pIND/Hygro (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA**)**

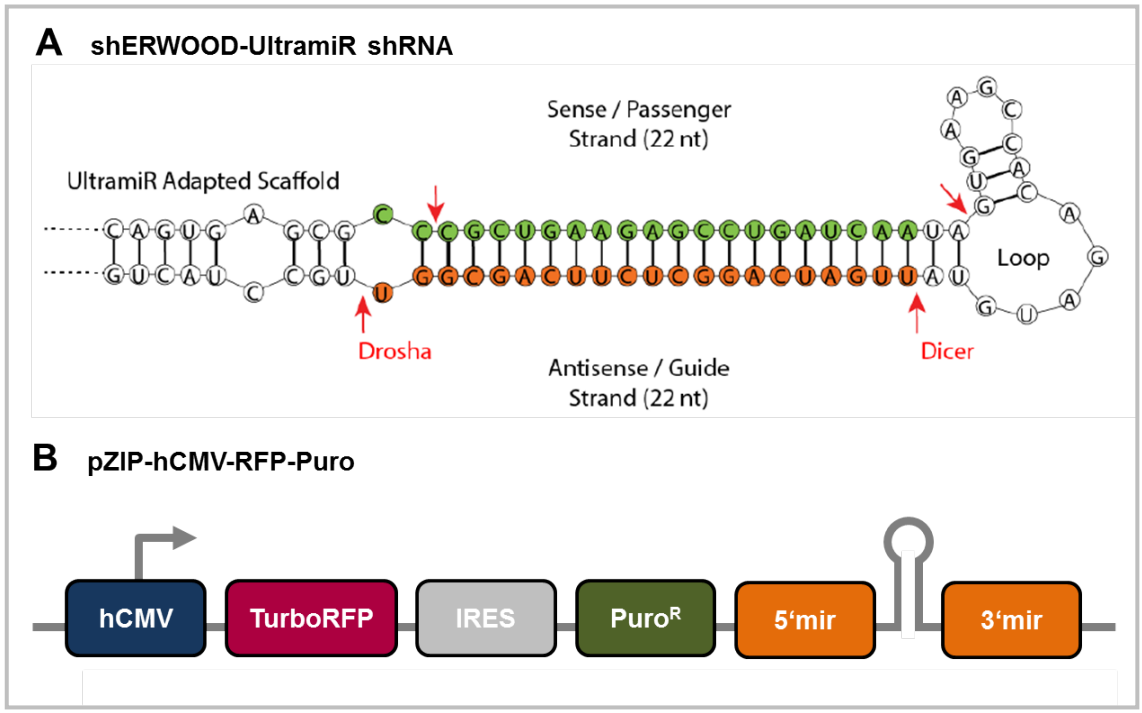


Comments for pIND/Hygro
5193 nucleotides

Ecdysone/glucocorticoid Response Elements (5x E/GREs): bases 12-185
Minimal Heat Shock Promoter and 5´ UTR: bases 192-486
Putative Transcriptional Start: base 245
Multiple Cloning Site: bases 487-612
BGH Reverse priming site: bases 614-631
BGH Polyadenylation sequence: bases 613-827
f1 origin: bases 890-1303
SV40 promoter/origin: bases 1368-1693
Hygromycin-B-phosphotransferase ORF (HygR): bases 1711-2734
SV40 Polyadenylation sequence: bases 2747-3119
pUC origin: bases 3379-4052 (Complementary strand)
β-lactamase ORF (AmpR): bases 4197-5057 (Complementary strand)

[Datenblatt pIND/Hygro, tools.thermofisher.com/content/sfs/vectors/pindhygro_map.pdf, abgerufen am 10.11.2017]

shERWOOD-UltramiR shRNA - pZIP-hCMV-RFP-Puro (transOMIC Technologies, Huntsville, Alabama, USA)



[Datenblatt shERWOOD UltramiR shRNA Lentiviral Target Gene Set in pZIP, http://www.transomic.com/TransomicTechnologies/media/Product-Documents/shRNA/shERWOOD%20UltramiR%20shRNA%20-%20manuals/shERWOOD-UltramiR-lentiviral-shRNA-pZIP-(Glycerol-Stock)-Technical-Manual.pdf, abgerufen am 21.12.2017]

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich in den letzten Jahren unterstützt und zum erfolgreichen Abschluss der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Mentor Prof. Dr. Georg Lamprecht. Ihm verdanke ich die interessante Fragestellung, die mich bereits im Rahmen meiner Masterarbeit und während der darauf folgenden Promotionsphase fasziniert und herausgefordert hat. Prof. Lamprecht stand mir stets mit seiner Expertise zur Seite und hat mich in allen Bereichen der Promotion unterstützt. Ausdrücklich bedanken möchte ich mich für die unzähligen anregenden Diskussionen und das große Vertrauen in meine praktischen Fähigkeiten. Zudem bin ich für die Möglichkeit der Teilnahme an zahlreichen nationalen sowie internationalen Kongressen sehr dankbar, auf denen ich meine Ergebnisse mit Experten auf dem Gebiet diskutieren konnte und viele Erfahrungen gesammelt habe. Auch für die Möglichkeit, an verschiedenen weiterqualifizierenden Fortbildungsveranstaltungen teilzunehmen, bedanke ich mich.

Großer Dank gilt auch Prof. Dr. Robert Jaster. Bei ihm möchte ich mich für die fortwährende und engagierte fachliche Unterstützung, sein stets offenes Ohr sowie zahlreiche hilfreiche Ratschläge und Anregungen in allen Belangen bedanken.

Dr. Peggy Berlin danke ich von Herzen für die vielen fachlichen Gespräche, besonders aber auch für die persönliche Unterstützung in den letzten Jahren. Sie stand mir stets mit Rat und Tat zur Seite, hatte immer konstruktive Ideen und ist mir darüber hinaus eine gute Freundin geworden.

Julia Steinig möchte ich für die technische Assistenz und die stetig gutgelaunte Hilfsbereitschaft danken. Darüber hinaus freue ich mich, dass aus der gemeinsamen Arbeit ebenfalls ein so schönes, freundschaftliches Verhältnis entstanden ist.

Dr. Johannes Reiner danke ich für die vielen interessanten Gespräche und anregenden Diskussionen. Weiterhin möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe des gastroenterologischen Forschungslabors für die tolle Zusammenarbeit, das harmonische Arbeitsklima und die stete Hilfsbereitschaft danken.

Zuletzt möchte ich mich von Herzen bei meiner Familie, meinen Mädels und ganz besonders meinem Henry bedanken, die mich auf diesem Weg begleitet, die guten sowie schlechten Momente mit mir durchlebt und jederzeit für meinen erholsamen Ausgleich gesorgt haben.

Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Thema:

„Funktionelle Bedeutung der Interaktion zwischen dem intestinalen Anionenaustauscher Down-Regulated in Adenoma (DRA) und dem PDZ-Adapterprotein Sorting Nexin 27 (SNX27)“

selbstständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel und Quellen als die angegebenen verwendet habe. Die Stellen, die anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, habe ich in jedem einzelnen Fall durch Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

Ich erkläre hiermit weiterhin, dass ich meine wissenschaftlichen Arbeiten nach den Prinzipien der guten wissenschaftlichen Praxis gemäß der gültigen „Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zur Vermeidung wissenschaftlichen Fehlverhaltens“ an der Universitätsmedizin Rostock angefertigt habe.

Rostock, 28. Februar 2018

Karen Bannert

Wissenschaftlicher Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Karen Bannert
Geburtsdatum	19.03.1990
Geburtsort	Wolgast
E-Mail	karen.bannert@uni-rostock.de

Schulbildung

1996 - 2000	Grundschule Uns Liehrkaten, Rostock
2000 - 2008	Käthe-Kollwitz-Gymnasium, Rostock
2008	Abitur (Gesamtnote 1,7)

Studium

2008 - 2011	Bachelor-Studium der Medizinischen Biotechnologie an der Universitätsmedizin Rostock (Gesamtnote 2,1; Abschluss Bachelor of Science)
2011	Bachelorarbeit: *Ausmaß des apoptotischen Zelltodes in verschiedenen hepatischen Schädigungsmodellen*. Rudolf-Zenker-Institut für experimentelle Chirurgie, Universitätsmedizin Rostock (Note 1,3)
2011 - 2013	Master-Studium der Medizinischen Biotechnologie an der Universitätsmedizin Rostock (Gesamtnote 1,1; Abschluss Master of Science)
2013	Masterarbeit: *Gehört Sorting Nexin 27 zur NHERF-Familie? - Bindungsstudien an den intestinalen Anionenaustauscher DRA.* Abteilung für Gastroenterologie und Endokrinologie, Universitätsmedizin Rostock (Note 1,0)
seit 2013	Promotionsstudentin und wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung für Gastroenterologie und Endokrinologie der Universitätsmedizin Rostock

Stipendium, Auszeichnungen und berufliche Weiterbildung

2013 - 2015	Promotionsstipendium der Landesgraduiertenförderung von Mecklenburg-Vorpommern
2014	Abstractpreis der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, Viszeralmedizin 2014, 17. – 20.09.2014, Leipzig
2014 - 2015	Teilnahme am Mentoring-Programm für Doktorandinnen der Universitäten Greifswald und Rostock
2017	Teilnahme an einer Fortbildungsveranstaltung nach §15 Abs.2 Satz 1 Nr. 3 Gentechniksicherheits-Verordnung (GenTSV)
	Teilnahme an der Fortbildungsveranstaltung Good Clinical Practice (GCP) – Grundlagenkurs nach AMG

Publikationen

2013	Lissner S; Hsieh C-J; Nold L; Bannert K; Bodammer P; Sultan A; Seidler U; Graeve L; Lamprecht G: *The PDZ-interaction of the intestinal anion exchanger down-regulated in adenoma (DRA; SLC26A3) facilitates its movement into Rab11a positive recycling endosomes.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. Juni 2013. 304(11): G980-G990.
2014	Bannert K; Kuhla A; Abshagen K; Vollmar B: *Anti-apoptotic therapeutic approaches in liver diseases – do they really make sense?* Apoptosis. August 2014;19(8):1243-53.
2015	Schäffler H; Herlemann DP; Alberts C; Kaschitzki A; Bodammer P; Bannert K; Köller T; Warnke P; Kreikemeyer B; Lamprecht G: *Mucosa-attached bacterial community in Crohn's Disease coheres with the Clinical Disease Activity Index.* Environ Microbiol Rep. April 2016.
	Schäffler H; Kaschitzki A; Alberts C; Bodammer P; Bannert K; Köller T; Warnke P; Kreikemeyer B; Lamprecht G: *Alterations in the mucosa-associated bacterial composition in Crohn's disease: a pilot study.* Int J Colorectal Dis. Mai 2016. 31(5):961-71.

Kongressbeiträge

2011 Bannert K; Kuhla A; Vollmar B; Eipel C: *Sind anti-apoptotische Therapieansätze bei Lebererkrankungen zielführend?* (Posterpräsentation) 15. Chirurgische Forschungstage, 22. – 24.09.2011, Dresden

2013 Bannert K; Lamprecht G: *Sorting Nexin 27 bindet an DRA- mögliche Bedeutung für das Recycling von DRA*. (Vortrag) Viszeralmedizin 2013, 11. – 14.09.2013, Nürnberg

2014 Bannert K; Bodammer P; Glamann J; Bovensiepen K; Lamprecht G: *Sorting Nexin 27 (SNX27) is a member of NHERF(Na^+/H^+ exchanger regulatory factor)-family of PDZ adaptor proteins.* (Posterpräsentation) Digestive Disease Week, 03. – 06.05.2014, Chicago, Illinois, USA

Bannert K; Bodammer P; Glamann J; Bovensiepen K; Lamprecht G: *Sorting Nexin 27 (SNX27) ist ein PDZ-Adapterprotein der NHERF(Na^+/H^+ exchanger regulatory factor)-Familie.* (Vortrag) Viszeralmedizin 2014, 17. – 20.09.2014, Leipzig

2015 Bannert K; Bodammer P; Steinig J; Lamprecht G: *Die strukturelle und funktionelle Interaktion von DRA und SNX27.* (Vortrag) Viszeralmedizin 2015, 16. – 19.09.2015, Leipzig

Bannert K; Lamprecht G: *Studies on the structural and functional interaction of DRA and SNX27.* (Vortrag) Göttinger Transporttage 2015, 19. – 20.09.2015, Göttingen

2016 Bannert K; Lamprecht G: *Regulation von DRA durch SNX27.* (Vortrag) Viszeralmedizin 2016, 21. – 24.09.2016, Hamburg

Bannert K; Lamprecht G: *The impact of Sorting Nexin 27 (SNX27) on the function of DRA (SLC26A3).* (Vortrag) Göttinger Transporttage 2016, 15. – 16.10.2016, Göttingen

2017 Bannert K; Koch S; Berlin P; Bartsch M; Lamprecht G: *Sorting Nexin 27 (SNX27) affects the activity of the intestinal anion exchanger DRA (SLC26A3).* (Posterpräsentation) Digestive Disease Week, 06. – 09.05.2017, Chicago, Illinois, USA

Bannert K; Lamprecht G: *Sorting Nexin 27 is required for DRA function - Studies on colocalization, activity and surface expression.* (Vortrag) Münster Transporttage 2017, 21. – 22.10.2017, Münster