

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Geburtshilfe, Kinder- und Jugendmedizin, Institut für Humangenetik

Direktor: Prof. Dr. med. C. Kubisch

## **Die Rolle von PIST in der subzellulären Verteilung von dem *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR)**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Theresa Moormann  
aus Düsseldorf

Hamburg 2022

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 03.02.2023**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Catherine Meyer-Schwesinger**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Hans-Jürgen Kreienkamp**

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Zystische Fibrose .....	1
1.2	Klinische Manifestation der zystischen Fibrose .....	1
1.2.1	Atemwege .....	1
1.2.2	Gastrointestinaltrakt .....	2
1.3	Charakterisierung des <i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulators</i> (CFTR) .....	4
1.4	Die Biosynthese des CFTR.....	5
1.5	PDZ-Domänen und die Interaktion mit dem PDZ-Liganden von CFTR .....	7
1.6	Das PDZ-Domänen-Protein PIST .....	10
1.7	Das CFTR-interagierende Protein NHERF1 .....	13
1.8	Die Rolle von PIST im Zusammenhang mit CFTR und NHERF1 .....	15
1.9	Ziel der Arbeit.....	18
2	Material und Methoden .....	19
2.1	Materialien.....	19
2.1.1	Chemikalien .....	19
2.1.2	Puffer und Lösungen.....	20
2.1.3	Medien und Zusätze.....	23
2.1.4	Kits, Enzyme und Standards.....	25
2.1.5	Oligonukleotide .....	25
2.1.6	Vektoren.....	26
2.1.7	Antikörper.....	26
2.1.8	Organismen.....	28
2.1.9	Geräte und Softwares .....	28
2.2	Molekularbiologische Methoden .....	30
2.2.1	Agarose-Gelelektrophorese .....	30
2.2.2	Restriktionsverdau von doppelsträngiger DNA .....	30
2.2.3	Retransformation.....	30
2.2.4	Isolation von DNA-Plasmiden, kleiner Maßstab (Minipräparation) .....	31
2.2.5	Isolation von DNA-Plasmiden, großer Maßstab (Midipräparation) .....	31
2.2.6	Sequenzierung von DNA-Plasmiden .....	31

2.3	Zellbiologische Methoden .....	33
2.3.1	Kultivierung von HEK293-T und Calu-3 Zellen .....	33
2.3.2	Ausdifferenzierung von Calu-3 Zellen .....	33
2.3.3	Transfektion von HEK293-T Zellen mit <i>TurboFect</i> .....	34
2.3.4	Reverse Transfektion von HEK293-T Zellen mit siRNA.....	34
2.3.5	Transfektion von HEK293-T Zellen mit Calciumphosphat zur Virusproduktion .....	35
2.3.6	Bestimmung des Virus-Titers .....	35
2.3.7	Infektion von Calu-3 Zellen .....	36
2.4	Proteinbiochemische Methoden.....	37
2.4.1	Lyse von HEK293-T Zellen und Calu-3 Zellen.....	37
2.4.2	Protein-Koimmunpräzipitation (RFP-Trap) mit HEK293-T Zellen .....	37
2.4.3	<i>Western Blot</i> .....	38
2.4.4	Nachweis von Antigenen.....	39
2.5	Analyse einer <i>knockout</i> -Mauslinie.....	42
2.5.1	Organentnahmen von Mäusen .....	42
2.5.2	Bestimmung des Genotyps von Mäusen .....	42
2.5.3	Isolierung von Darmepithelzellen .....	42
2.5.4	Membranfraktionierung .....	43
2.5.5	Proteinbestimmung .....	43
3	Ergebnisse .....	44
3.1	Die Interaktion von CFTR mit PIST und NHERF1 in HEK293-T Zellen.....	44
3.2	Die Rolle von PIST in dem <i>in vitro</i> Modell der Calu-3 Zellen .....	47
3.2.1	Immunzytochemischer Nachweis des endogenen PIST in Calu-3 Zellen und die Differenzierung der Calu-3 Zelllinie .....	47
3.2.2	Überexpression bzw. <i>knockdown</i> von PIST mittels shRNA im Rahmen von lentiviraler Infektion .....	52
3.2.3	<i>Knockdown</i> von PIST mittels der CRISPR/Cas-Methode .....	54
3.2.4	Die immunzytochemische Analyse von CFTR in differenzierten Calu-3 Zellen bei <i>knockdown</i> von PIST.....	55
3.3	Die Analyse des CFTR-Proteinlevels in einer PIST- <i>knockout</i> -Mauslinie ....	57
4	Diskussion und Ausblick .....	63
4.1	Die Interaktion von PIST und NHERF1 mit CFTR in HEK293-T Zellen.....	63

4.2	Die Rolle von PIST in der subzellulären Verteilung von CFTR in einem respiratorischen Zellmodell .....	65
4.3	Untersuchung der Rolle von PIST in der subzellulären Verteilung von CFTR in PIST- <i>knockout</i> -Mäusen.....	66
4.4	Ausblick.....	71
5	Zusammenfassung.....	74
6	Summary.....	75
I.	Abkürzungsverzeichnis .....	i
II.	Abbildungsverzeichnis .....	iv
III.	Literaturverzeichnis .....	vi
IV.	Danksagung .....	xvi
V.	Lebenslauf.....	xvii
VI.	Eidesstattliche Erklärung.....	xviii

# 1 Einleitung

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Rolle von PIST in der subzellulären Verteilung von dem *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) analysiert werden. Im Hinblick darauf wird zu Beginn auf die mit CFTR assoziierte Erkrankung, zystische Fibrose, und deren klinischen Manifestationen eingegangen. Weiterhin wird die CFTR-Biosynthese zusammengefasst und der aktuelle Forschungsstand in Bezug auf die PDZ-abhängigen makromolekularen CFTR-Signalkomplexe erläutert. Hierbei wird ein besonderer Fokus auf die PDZ-Domänen-Proteine PIST und NHERF1 gelegt.

## 1.1 Zystische Fibrose

Zystische Fibrose (ZF), auch bekannt als Mukoviszidose, ist eine lebensverkürzende Multiorganerkrankung, von der weltweit circa 90 000 Menschen und hier insbesondere die kaukasische Bevölkerung betroffen sind (Bulloch et al. 2017). In Deutschland ist ZF mit einer Inzidenz von 1:2 500 die häufigste autosomal rezessiv vererbte Erkrankung (Naehrig et al. 2017). Jeder 28. Kaukasier ist Träger einer Mutation (Dungan 2010, Lee et al. 2016). Derzeit sind mehr als 2 000 Mutationen im CFTR-Gen bekannt, die in unterschiedlichen Schweregraden zu einer mangelhaften Funktion des CFTR führen. Dadurch werden Sekrete epithelialer Gewebe ungenügend mit Wasser angereichert (Cutting 2015). Beispielsweise sind Lunge, Leber, Pankreas, Darm und Geschlechtsorgane von der zystischen Fibrose betroffen, wobei sich Pathogenese und Pathophysiologie jeweils unterscheiden (Elborn 2016, Kayani et al. 2018, Sathe und Houwen 2017).

## 1.2 Klinische Manifestation der zystischen Fibrose

### 1.2.1 Atemwege

Die Atemwege sind in der zystischen Fibrose besonders stark beeinträchtigt. Insgesamt führt die Dysfunktion des CFTR zu einer chronischen Atemwegsobstruktion, Infektion, Inflammation und letztendlich zu einer progressiven Lungenerkrankung (Bergeron und Cantin 2019, Haq et al. 2016). Hierbei spielt eine dünne Flüssigkeitsschicht, die *airway surface liquid* (ASL), welche die luminale Seite des Lungenepithels bedeckt, eine besondere Rolle. Volumen, pH-Wert, Ionen- und Nährstoffkonzentration der ASL sind wichtige

Bestandteile, um die Zilienfunktion, die mucoziliäre Clearance und die antimikrobiellen Eigenschaften aufrechtzuerhalten. Unter dem Begriff mucoziliäre Clearance versteht man den Selbstreinigungsmechanismus der Bronchien.

Initial wurde die „*high salt hypothesis*“ aufgestellt. In dieser wird erläutert, dass eine erhöhte Salzkonzentration in der ASL aufgrund einer mangelnden Resorption von Natrium und Chlorid die Sekretion und Wirkung von antibakteriellen Proteinen inhibiert (Clunes und Boucher 2007, Smith et al. 1996, Zabner et al. 1998).

Eine weitere, aktuellere Hypothese, die „*low-output hypothesis*“, beschreibt den Volumenverlust der ASL. Durch den defekten CFTR können Anionen, wie Chlorid und Hydrogencarbonat, nicht mehr ins Lumen transportiert werden. Darüber hinaus verstärkt der epitheliale Natriumkanal (engl. *epithelial sodium channel*, ENaC), dessen Aktivität in ZF hochreguliert ist, seine Natrium-Resorption. Die mangelnde Ionenkonzentration in der ASL führt zu einem isotonischen Volumenverlust, sodass die Zilienaktivität sinkt und somit der mucoziliäre Transport eingeschränkt wird (Clunes und Boucher 2007, Haq et al. 2016, Matsui et al. 1998, Stutts et al. 1995).

Des Weiteren wurde gezeigt, dass der defekte Hydrogencarbonattransport zu einer sauren ASL führt, wodurch viele antimikrobielle Faktoren funktionslos werden (Gustafsson et al. 2012, Pezzulo et al. 2012). Es kann eine Besiedlung mit pathogenen Keimen, wie *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Burkholderia cepacia*, folgen (Coutinho et al. 2008). Somit wird eine sekundäre Entzündungsreaktion ausgelöst. Diese wird mutmaßlich durch die beeinträchtigte mukoziliäre Clearance, die anhaltende Hypoxie, die Lipidanomalien, das Protease- und Antiprotease-Missverhältnis und die Dysbalance zwischen Oxidations- und Antioxidationsmitteln verstärkt (Bergeron und Cantin 2019). Insgesamt ist die Pathophysiologie komplex und die klinische Manifestation vielseitig, sodass verschiedene Hypothesen aufgestellt wurden.

### 1.2.2 Gastrointestinaltrakt

Der Mekoniumileus ist einer der frühesten Manifestationen in der zystischen Fibrose, die bei 20 % aller ZF-PatientInnen diagnostiziert wird. Auch hier ist die Pathophysiologie komplex und zum besseren Verständnis an verschiedenen Tiermodellen erforscht worden (Maus, Frettchen und Schwein). Durch die mangelnde Sekretion von Chlorid und Hydrogenkarbonat wird unzureichend Wasser in das Dünndarmlumen sezerniert, wodurch ein zähflüssiges Sekret

entsteht. Zusätzlich verursacht ein verringerter pH-Wert eine Erhöhung des Stuhlalbuminspiegels, des Mineralgehalts und des Anteils an proteingebundener Kohlenhydraten, sodass sich das Mekonium zunehmend verdichtet. Die Kombination aus zähflüssigem Sekret mit dem dichtem Mekonium führt folglich zu einer Obstruktion im terminalen Ileum (Garcia et al. 2009, Quinton 2008, Sathe und Houwen 2017).

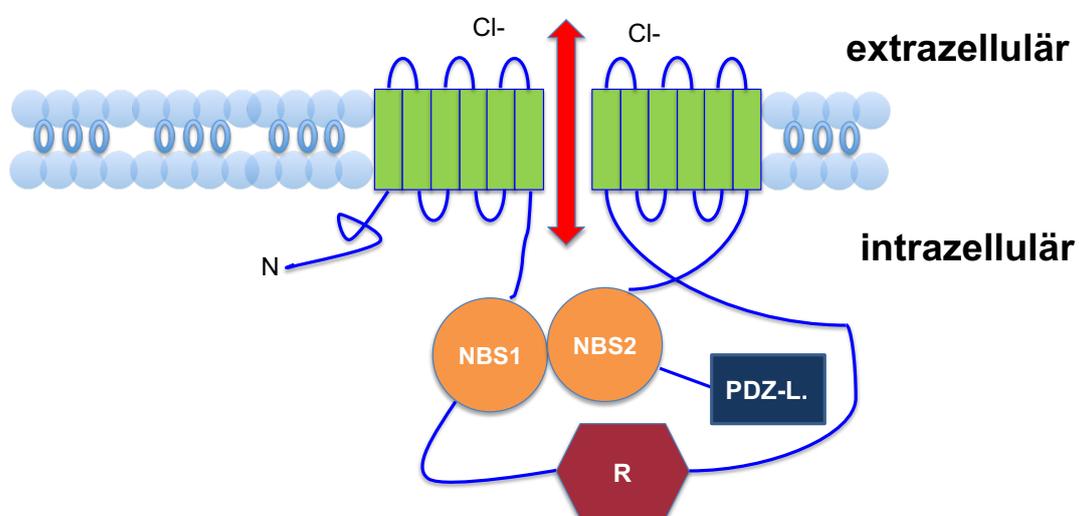
Im exokrinen Anteil des Pankreas verursacht der Funktionsverlust des CFTR ebenfalls eine mangelnde Wassersekretion und einen verringerten pH-Wert, wodurch sich der Proteingehalt im Pankreassekret erhöht. Die Verdauungsenzyme, die von den azinären Zellen sezerniert werden, können schwerer ins Duodenum gelangen und Mukoproteinpfropfen fallen aus (Madácsy et al. 2018, Taylor und Aswani 2002). Letztendlich obstruiert und dilatiert der Pankreasgang, sodass die Proenzyme wie das Trypsinogen frühzeitig im Gang aktiviert werden und die nötige Neutralisierung der Magensäure sowie Verdauung der Nahrung im Dünndarm ausbleibt. Der niedrige pH-Wert und die frühzeitige Aktivierung von Verdauungsenzymen im Pankreasgang verursachen einen fibrotischen Umbau von exokrinem Pankreasgewebe, wodurch in zahlreichen Fällen eine exokrine Pankreasinsuffizienz entsteht. Klinisch manifestiert sich diese mit Maldigestion und Malabsorption, insbesondere von Fetten und fettlöslichen Vitaminen. Typische Symptome sind Steatorrhoe und Meteorismus (De Boeck et al. 2005, Li und Somerset 2014). ZF-PatientInnen, bei denen die Aktivität des exokrinen Pankreas trotz Schädigung ausreicht und eine Obstruktion des Pankreasganges besteht, können eine Pankreatitis entwickeln (Durno et al. 2002, Ooi et al. 2011).

Im Vergleich zur frühen Schädigung des exokrinen Pankreas wird das endokrine Gewebe erst im späteren Verlauf geschädigt. Der fibrotische Umbau von Pankreasgewebe mit exokriner Pankreasinsuffizienz, oxidativem Stress, einem geringeren Inkretin-Effekt, einer reduzierten Insulinsensitivität und einer erhöhten Glucagonausschüttung spielen pathophysiologisch in der Entwicklung des ZF-assoziierten Diabetes mellitus (engl. *cystic fibrosis related-diabetes*, CFRD) eine Rolle (Kayani et al. 2018). Im Kindesalter leiden circa 2 % der PatientInnen an einem CFRD, wohingegen 45-50 % der über 30-jährigen ZF-PatientInnen einen CFRD aufweisen. Die höhere Lebenserwartung von ZF-PatientInnen erklärt das vermehrte Aufkommen von CFRD (Moran et al. 2009).

30 % der ZF-PatientInnen sind von einer ZF- assoziierten Hepatopathie (engl. *cystic fibrosis-associated liver disease*, CFLD) betroffen. Klinisch präsentiert sich CFLD in Form von erhöhten Leberwerten, Hepatosteatose, fokaler biliärer Zirrhose, neonataler Cholestase, Cholelithiasis und Cholezystitis. Ähnlich den anderen Organen des Gastrointestinaltrakts führt eine Dysfunktion des CFTR zu zähflüssigem und saurem Mukus. Dadurch wird der Anteil an freien Radikalen und toxischen Komponenten in der Gallenflüssigkeit erhöht, die ihrerseits Hepatozyten und Cholangiozyten schädigen (Kobelska-Dubiel et al. 2014).

### 1.3 Charakterisierung des *cystic fibrosis transmembrane conductance regulators* (CFTR)

Der CFTR ist ein transmembranständiger Ionenkanal im sekretorischen Epithel und gehört zu der Familie der ATP-Bindungskassetten-Transporter (engl. *ATP-binding cassette transporter*, ABC-Transporter). Diese hydrolysieren Adenosin-Triphosphat (ATP), um Substrate wie Ionen durch die Membran zu transportieren. CFTR besteht aus zwei Transmembrandomänen (TMD1 & TMD2), die sich jeweils aus 6 transmembranen Helices zusammensetzen, zwei Nukleotidbindungsstellen (NBS1 & NBS2), einer sehr hydrophoben regulatorischen Einheit und einem PDZ-Liganden (PSD-95, *disc large*, *zonula occludens-1*, PDZ) am C-Terminus (Abbildung 1.1). Das Molekulargewicht beträgt ca. 170 kDa (Pranke und Sermet-Gaudelus 2014, Rogan et al. 2011).



**Abbildung 1.1 Die Domänenstruktur von CFTR**

CFTR enthält zwei Transmembrandomänen (TMD1 & TMD2), die aus jeweils 6 transmembranen Helices bestehen (grüne Rechtecke). Des Weiteren weist CFTR zwei Nukleotidbindungsstellen (NBS1 & NBS2), eine regulatorische Einheit (R) und einen PDZ-Liganden am C-Terminus auf. (modifiziert nach Rogan et al. 2011)

Die Regulation des CFTR ist komplex und noch nicht vollständig verstanden. Die regulatorische Einheit beinhaltet viele Phosphorylierungsstellen, die über einen erhöhten cAMP-Spiegel und folglich eine erhöhte Aktivität der Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert werden können. Diese Phosphorylierung ist notwendig, um die ATP-abhängige Dimerisierung von NBS1 und NBS2 zu ermöglichen, wodurch sich der Chloridkanal öffnet. Die CFTR-Aktivität wird somit einerseits über die Phosphorylierung und andererseits über die ATP-abhängige Öffnung reguliert (Bozoky et al. 2013, Farinha et al. 2016, Schnúr et al. 2019, Zhang et al. 2017). Im geöffneten Zustand strömen Anionen entlang ihres elektrochemischen Gradienten. Das unterscheidet den CFTR von anderen ABC-Transportern, die Substrate meist gegen den elektrochemischen Gradienten pumpen und dabei ATP verbrauchen (Farinha und Amaral 2005, Farinha et al. 2016, Vankeerberghen et al. 2002). CFTR ist selektiv für Anionen (Hwang und Kirk 2013). Chlorid und Hydrogencarbonat sind für die Funktion des CFTR in epithelialen Organen entscheidend. Einerseits wird über den Transport von Chloridionen die osmotisch bedingte Wassersekretion gesteuert und andererseits über die Sekretion von Hydrogenkarbonat der pH-Wert von Sekreten maßgeblich moduliert (Ishiguro et al. 2009, Saint-Criq und Gray 2017).

#### 1.4 Die Biosynthese des CFTR

Die Biosynthese von funktionsfähigen Membranproteinen ist ein hoch komplexer Prozess, da diese Proteine über verschiedene membranöse Kompartimente der Zelle an die Plasmamembran transportiert werden. Im Laufe dieses Transports entlang des sekretorischen Pfads beginnt im ersten Kompartiment, dem endoplasmatischen Retikulum (ER), die Reifung von Membranproteinen. Danach schließt sich die Reifung im Golgi-Apparat an, bis Membranproteine über sekretorische Vesikel schließlich an die Plasmamembran transportiert werden (Abbildung 1.2) (Farinha und Amaral 2005).

Die mRNA des CFTR wird im Zuge der Translation aufgrund der transmembranen Segmente von Signal-Erkennungspartikeln (engl. *signal recognition particles*, SRP) gebunden, wodurch die Translation vorübergehend gestoppt wird (Schaletzky und Rapoport 2006). Erst wenn der Komplex aus Ribosom, mRNA und SRP an dem SRP-Rezeptor und dem Sec61 Komplex gebunden hat, wird die mRNA weiter translatiert und das entstehende Protein ins ER eingeschleust (Lu et al. 1998, Vankeerberghen et al. 2002). Membranproteine werden im ER co- und

posttranslational gefaltet und durch N-Glykosylierung modifiziert. Während dieser komplexen Reifung werden Membranproteine, wie CFTR, stetig auf eine korrekte Faltung überprüft. Dieser Mechanismus wird als endoplasmatische Qualitätskontrolle (engl. *endoplasmic reticulum quality control*, ERQC) beschrieben. Im Falle einer Fehlfaltung oder einer unvollständigen Faltung wird CFTR dem ER-assoziierten Abbauweg (engl. *ER associated degradation*, ERAD) zugeführt, um über den Ubiquitin (Ub)-Proteasom Pfad degradiert zu werden (Jensen et al. 1995, Needham und Brodsky 2013, Vashist und Ng 2004, Ward et al. 1995). Verschiedene Chaperone, wie Hsp70 (Choo-Kang und Zeitlin 2001, Rubenstein und Zeitlin 2000), Hdj2 (Younger et al. 2006) und Calnexin (Farinha und Amaral 2005, Okiyoneda et al. 2004), sind an der Reifung des CFTR sowie ERQC und ERAD beteiligt (Pranke und Sermet-Gaudelus 2014).

Die ermittelte Reifungseffizienz des Ionenkanals unterscheidet sich von Wildtyp-CFTR (wtCFTR) exprimierenden Zellen (bei circa 25 %) zu epithelalem Gewebe (bei circa 100 %), das CFTR endogen exprimiert (Varga et al. 2004, Ward und Kopito 1994, Ward et al. 1995). Ursächlich für eine limitierte Reifungseffizienz könnten die komplexe Proteinstruktur, die energetische Instabilität einzelner Domänen oder auch die Vielzahl von Domänen des CFTR sein (Pranke und Sermet-Gaudelus 2014). Die p.F508del-Mutation ist die am häufigsten vorkommende Mutation bei ZF-PatientInnen. 90 % aller Betroffenen tragen mindestens auf einem Allel eine p.F508del-Mutation (Cai et al. 2011). Durch die Deletion der Aminosäure Phenylalanin in der NBS1 kommt es zur Fehlfaltung des CFTR. Obwohl der F508del-CFTR teilweise noch funktionsfähig ist und auch auf die cAMP/PKA-Regulation reagiert, erreicht er die Zellmembran aufgrund der Retention und dem beschleunigten Abbau im ER über ERAD nicht. Die Reifungseffizienz beträgt nur noch 0,4 % (Favia et al. 2010, Pranke und Sermet-Gaudelus 2014).

WtCFTR passiert die ERQC Kontrollpunkte durch eine korrekte Faltung im ER. Vom ER werden Membranproteine in COPII-besetzte Vesikel über das ER-Golgi-Intermediärkompartiment (ERGIC) zum Golgi-Apparat anterograd transportiert (Lorente-Rodriguez und Barlowe 2011). Hierbei fungieren zwei saure Aminosäuren in der NBS1 von CFTR als ER-Exportsignal (Wang et al. 2004).

Der Golgi-Apparat ist ein polares Organell, das meist aus mehreren membranumschlossenen, flachen Zisternen besteht. Mehrere Zisternen bilden einen Stapel. Funktionell werden diese Stapel in drei Kompartimente aufgeteilt, die

cis-, media- und trans-Zisternen. Die cis- und trans-Zisternen sind jeweils mit speziellen Sortierungsstationen verbunden, die als Cis-Golgi-Netzwerk (CGN) und Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) bezeichnet werden. Membranproteine, wie CFTR, bewegen sich im Golgi-Apparat von der cis- zu der trans-Seite (Alberts et al. 2014). Während dessen wird der CFTR weiter über eine komplexe N-Glykosylierung modifiziert (Cheng et al. 1990). Anschließend wird CFTR im TGN in Transportvesikel verpackt, um an die Plasmamembran weitergeleitet zu werden. Für die Sortierung von CFTR an die apikale Plasmamembran in polarisierten Zellen spielt unter anderem die Interaktion des CFTR-PDZ-Liganden mit PDZ-Domänen anderer Proteine eine essentielle Rolle (Milewski et al. 2001, Moyer et al. 1999).

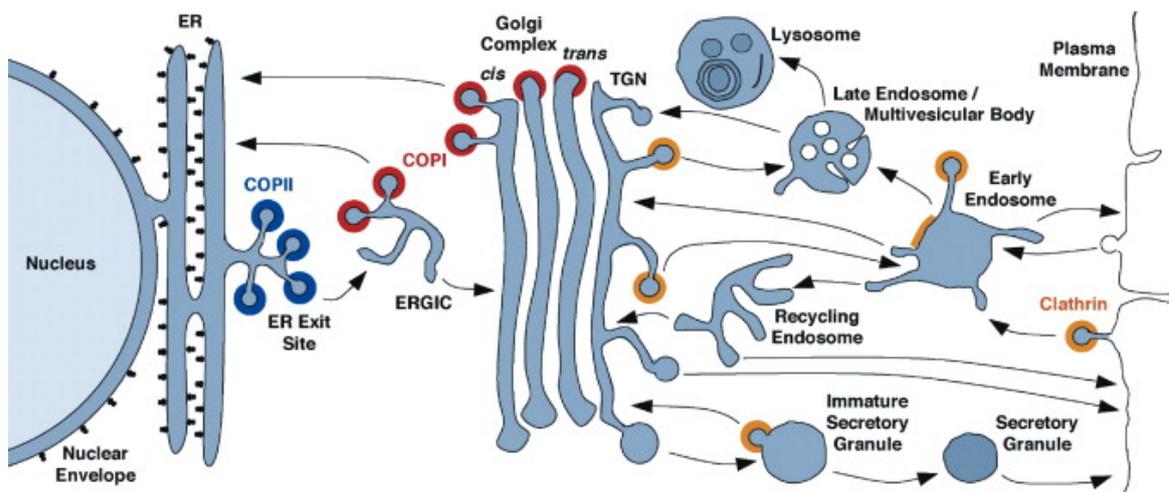


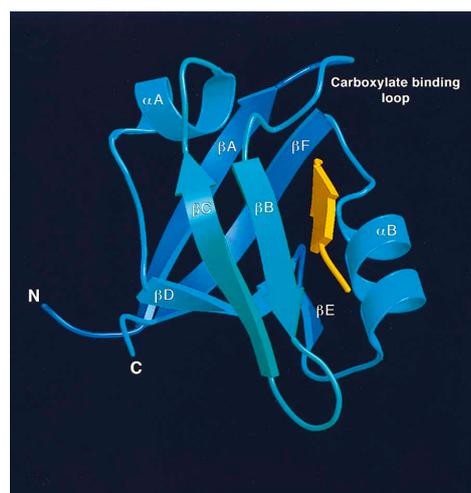
Abbildung 1.2 Transportwege von Membranproteinen zwischen subzellulären Kompartimenten im sekretorischen, lysosomalen und endozytotischen Pfad und einige der beteiligten Proteine. (aus: Bonifacino und Glick 2004)

## 1.5 PDZ-Domänen und die Interaktion mit dem PDZ-Liganden von CFTR

PDZ-Domänen wurden zunächst in den Proteinen *postsynaptic density protein 95* (PSD95; auch *synapse-associated protein 90*, SAP90), *zonula occludens-1* (ZO-1) und *Drosophila discs-large protein* gefunden (Bredt et al. 1991, Cho et al. 1992, Itoh et al. 1993, Woods und Bryant 1991). Bevor man sich 1995 auf den Namen PDZ-Domäne (PSD-95, *Discs-large*, ZO-1) einigte, wurde diese anfänglich DHR-Domäne (*discs large homology repeat*) oder GLGF-Motiv genannt (Kennedy 1995). Bei vielen weiteren Proteinen, vor allem in Gerüstproteinen, wurden die PDZ-Domänen identifiziert. Diese Gerüstproteine interagieren häufig mit den PDZ-Liganden von Membranproteinen, wie G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR)

oder Ionenkanälen. Dabei sind PDZ-Domänen unter anderem wichtig für die subzelluläre Verteilung, die Integration in die korrekten Signalkomplexe, die Endozytose und das Recycling der assoziierten Membranproteine (Bauch et al. 2014, Koliwer et al. 2015, Milewski et al. 2001, Short et al. 1998).

PDZ-Domänen bestehen aus circa 80 bis 90 Aminosäuren und repräsentieren die am häufigsten vorkommende Protein-Protein-Interaktionsdomäne (Doyle et al. 1996, Feng und Zhang 2009, Magalhaes et al. 2012). Die Sekundärstruktur der PDZ-Domänen enthält acht Segmente, sechs  $\beta$ -Faltblätter und zwei  $\alpha$  Helices. PDZ-Liganden binden in einer Bindungstasche zwischen dem  $\beta$ B-Faltblatt und der  $\alpha$ B-Helix. Die Verbindungsschleife zwischen den  $\beta$ A- und  $\beta$ B-Faltblattsträngen enthält die Gly-Leu-Gly-Phe-Sequenz (Abbildung 1.3). Diese Aminosäureabfolge spielt eine wichtige Funktion bei der Bindung der C-terminalen Carboxylatgruppe des PDZ-Liganden, weshalb die Schleife auch als Carboxylat-Bindungsschleife bezeichnet wird (Doyle et al. 1996, Harris und Lim 2001). Allerdings beschränkt sich die Bindung an die PDZ-Domäne nicht nur auf C-terminale PDZ-Liganden. Auch interne PDZ-Liganden können mit einer PDZ-Domäne interagieren (Christopherson et al. 1999, Harris und Lim 2001, Hillier et al. 1999, Paasche et al. 2005, Trejo 2005, Xu et al. 1998).



**Abbildung 1.3** Dreidimensionale Faltung der PDZ-3-Domäne von PSD-95 (Aminosäure 309-393) mit einem PDZ-Liganden.

Der PDZ-Ligand (gelb) fügt sich zwischen  $\beta$ B-Faltblatt und  $\alpha$ B-Helix ein und bildet somit ein antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt zu  $\beta$ B. Die Verbindungsschleife (Gly-Leu-Gly-Phe-Sequenz) zwischen  $\beta$ A und  $\beta$ B ist an der Bindung des PDZ-Liganden beteiligt und wird daher als Carboxylat-Bindungsschleife bezeichnet. Rückstände außerhalb der Domäne, die in der Kristallstruktur vorhanden waren, wurden in dieser Abbildung weggelassen. (aus: Doyle et al. 1996)

PDZ-Domänen und ihre-Liganden werden in drei Hauptklassen unterteilt. Für die Erkennung und Bindung des PDZ-Liganden in der Bindungstasche der PDZ-

Domäne spielen die Aminosäuren an Positionen 0 und -2 des PDZ-Liganden eine entscheidende Rolle, da diese in Richtung der Bindungstasche ausgerichtet sind. Daher werden die Hauptklassen anhand der genannten Aminosäuren eingeteilt. Hierbei befindet sich die Aminosäure an Position 0 am C-terminalen Ende, Position -1 in Richtung des N-Terminus und fortlaufend. PDZ-Domänen der Klasse I binden an C-terminale Liganden mit der Sequenz von Ser/Thr-X- $\Phi$  COOH, PDZ-Domänen der Klasse II binden an die Sequenz von  $\Phi$ -X- $\Phi$ -COOH und PDZ-Domänen der Klasse III bevorzugen die Sequenz von Asp/Glu-X- $\Phi$ -COOH, wobei  $\Phi$  einer beliebigen hydrophoben Aminosäure und X einer beliebigen Aminosäure entspricht (Bezprozvanny und Maximov 2001, Sheng und Sala 2001, Songyang et al. 1997, Vaccaro und Dente 2002).

Der PDZ-Ligand von CFTR befindet sich am C-terminalen Ende und wird aus den letzten drei bis fünf Aminosäuren gebildet (Aminosäuresequenz: QDTRL). Diese konservierte Aminosäuresequenz stellt einen Liganden vom Typ I dar und bindet dementsprechend an PDZ-Domänen vom Typ I (Guggino 2004, Moyer et al. 2000, Piserchio et al. 2005, Songyang et al. 1997, Wang et al. 1998). Der CFTR kann daher mit PDZ-Domänen verschiedenster Proteine sequenziell interagieren und scheint über die Vielzahl von Interaktionspartnern in PDZ-abhängige makromolekulare Signalkomplexe integriert zu sein. Dabei kann CFTR sowohl über die Protein-Protein-Interaktion gesteuert und reguliert werden als auch Abläufe in der Zelle beeinflussen (Wu et al. 2012).

*Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor 1* (NHERF1) und *protein interacting specifically with tc10* (PIST) sind Beispiele für Interaktionspartner, auf die in gesonderten Kapiteln eingegangen wird. Sie übernehmen verschiedene Aufgaben im Bereich der Sortierung an die Plasmamembran, der Integration in Signalkomplexe, des Recycling, der Verankerung im Zytoskelett oder der lysosomalen Degradation von CFTR (Cheng et al. 2002, Cheng et al. 2004, Guggino und Banks-Schlegel 2004, Moyer et al. 2000, Short et al. 1998).

Weiterhin interagiert CFTR über seinen PDZ-Liganden mit Shank2 (*SH3 and multiple ankyrin repeat domains 2*). Es wurde gezeigt, dass Shank2, welches mit NHERF1 um die Bindung an CFTR konkurriert, CFTR negativ reguliert. Shank2 kann die Phosphodiesterase 4D (PDE4D) binden und in einen Komplex mit dem CFTR integrieren. PDE4D spaltet cAMP, sodass Shank2 die cAMP-Konzentration

an der Plasmamembran in der Nähe des CFTR reduzieren und damit die cAMP-abhängige Aktivierung von CFTR verhindern kann (Kim et al. 2004, Lee et al. 2007). Ferner interagieren auch GRASP (*Golgi reassembly stacking protein*) und CFTR über eine PDZ-basierende Protein-Protein-Interaktion. GRASP spielt eine Rolle in der unkonventionellen Sekretion von Membranproteinen, welche Golgi-unabhängig erfolgt. Gee et al. konnten zeigen, dass die Expression und Funktion von F508del-CFTR durch GRASP gerettet werden kann (Gee et al. 2015).

Als letztes Beispiel soll in dieser Arbeit MAST205 (*microtubule-associated serine/threonine kinase with a molecular mass of 205 kDa*) aufgeführt werden. MAST205, welches in Spermatozyten stark exprimiert wird und eine PDZ-Domäne besitzt, erhöht nicht nur die Expression von wtCFTR, sondern auch von F508del-CFTR und verstärkt die CFTR-Funktion. Da MAST205 und PIST um die Bindung an CFTR konkurrieren, kann MAST205 den negativen Effekt von PIST, der in Kapitel 1.9 genauer beschrieben ist, auf den CFTR abschwächen (Ren et al. 2013).

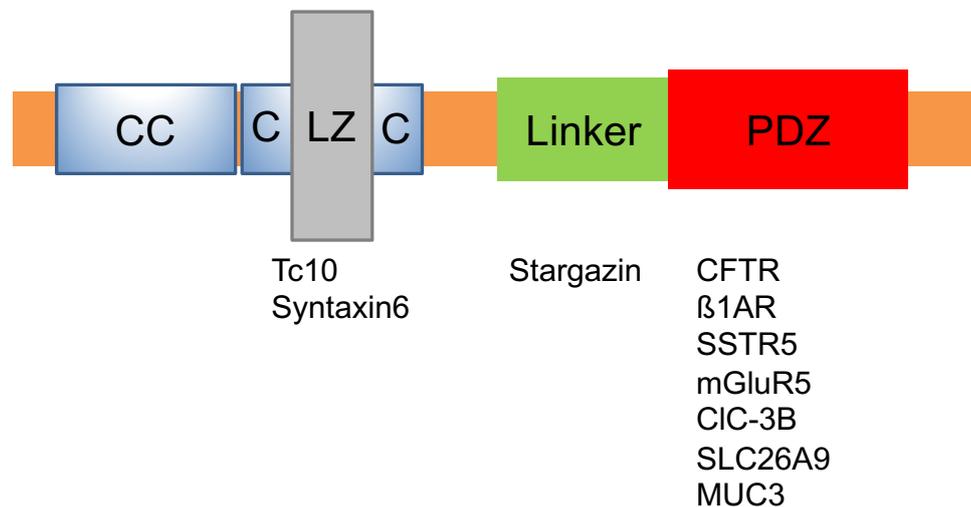
## 1.6 Das PDZ-Domänen-Protein PIST

PIST, auch bekannt als *Golgi-associated PDZ and coiled-coil motif-containing protein* (GOPC; (Yao et al. 2001)), *Fused in Glioblastoma* (FIG; (Charest et al. 2001)) und *CFTR associated ligand* (CAL; (Cheng et al. 2002)) wurde zum ersten Mal 2001 von Neudauer et al. beschrieben (Neudauer et al. 2001). PIST wird in fast allen Geweben exprimiert. Die Forscher zeigten die Expression von PIST auf mRNA-Ebene mittels *Northern Blot* Analyse (Neudauer et al. 2001). Zusätzlich konnte PIST beispielsweise in Leber, Lunge, Pankreas, Cortex und Dünndarm via *Western Blot* Analyse nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu Charest et al. konnte Cuadra et al. die Expression von PIST im Magen durch *Western Blot* Analyse nicht bestätigen (Charest et al. 2001, Cuadra et al. 2004, Neudauer et al. 2001). Die Expression der verschiedenen Isoformen ist gewebe- und entwicklungspezifisch (Cuadra et al. 2004, Ito et al. 2006).

PIST ist ein 462 Aminosäuren umfassendes Protein mit einem Molekulargewicht von 55 kDa. Es ist aus zwei *Coiled-coil*-Domänen aufgebaut, wobei die zweite *Coiled-coil*-Domäne eine Leucin-Zipper-Region beinhaltet (Abbildung 1.4). Des Weiteren enthält PIST eine PDZ-Domäne und einen Cluster saurer Aminosäuren am C-Terminus. Neudauer et al. beschrieben PIST zuerst im Zusammenhang mit Tc10, welches zu der Familie der Rho-GTPasen gehört. Tc10 interagiert mit PIST

über die zweite *Coiled-coil*-Domäne und der dortigen Leucin-Zipper-Region (Neudauer et al. 2001). Durch die Interaktion mit Syntaxin6, Rab6 und Golgin-160 über die *Coiled-coil*-Domänen ist PIST mit dem TGN verankert und erhält somit seine typische Golgi-Lokalisierung (Bergbrede et al. 2009, Charest et al. 2001, Chen et al. 2012, Cheng et al. 2002, Hicks und Machamer 2005, Yao et al. 2001). Allerdings kann PIST durch die Interaktion mit der aktiven Form von Tc10 an die Plasmamembran umverteilt werden (Cheng et al. 2005).

Zusätzlich wurde 2004 von Cuadra et al. eine weitere Linker-Region beschrieben, die sich der zweiten *Coiled-coil*-Domäne anschließt. Über die Linker-Region und einen Teil der anschließenden PDZ-Domäne interagiert PIST mit Stargazin, einem transmembranen AMPA-Rezeptor-regulierenden Protein (TARP) (Cuadra et al. 2004). Außerdem ermöglicht die PDZ-Domäne die Interaktion mit einer Vielzahl von Membranproteinen und Ionenkanälen, wie beispielsweise dem Somatostatin-Rezeptor 5 (SSTR5), dem  $\beta$ 1-adrenergen Rezeptor ( $\beta$ 1AR), dem metabotropen Glutamatrezeptoren 5 (mGluR5) sowie CFTR (Cheng et al. 2002, He et al. 2004, Klüssendorf et al. 2021, Swiatecka-Urban et al. 2002, Wente et al. 2005).



**Abbildung 1.4 Schematische Darstellung der Domänenstruktur von PIST und Beispiele von Interaktionspartnern.**

PIST enthält zwei *Coiled-coil*-Domänen (CC), wobei die zweite Domäne eine Leucin-Zipper-Region (LZ) beinhaltet. Darauf folgend ist eine Linker-Region definiert. Dieser Region schließt sich die PDZ-Domäne an. Über alle Domänen kann PIST mit verschiedenen Proteinen auf unterschiedlichste Art und Weise interagieren.

Durch die Lokalisierung von PIST am TGN wird angenommen, dass PIST über seine PDZ-Domäne transient mit Membranproteinen im Rahmen des anterograden und retrograden Transportes interagiert und damit maßgeblich die subzelluläre

Verteilung bestimmt (Bauch et al. 2014, Cuadra et al. 2004, Gentzsch et al. 2003, Koliwer et al. 2015).

Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass PIST nach Überexpression den SSTR5 und  $\beta$ 1AR am Golgi-Apparat zurückhält (Bauch et al. 2014, He et al. 2004, Koliwer et al. 2015). Der gleiche Einfluss von PIST findet sich auch im Zusammenhang mit Cadherin23, welches zur Familie der calciumabhängigen Zelladhäsionsmoleküle gehört (Siemens et al. 2004, Xu et al. 2010). Zudem stabilisiert PIST SSTR5, indem es die lysosomale Degradation verhindert. Durch eine Überexpression führt dies zu einer Zunahme der zellulären SSTR5-Proteinmenge. Ohne PDZ-Liganden wird das Recycling von SSTR5 an die Plasmamembran gehemmt (Bauch et al. 2014, Wente et al. 2005). Auch wenn PIST die Menge an  $\beta$ 1AR an der Plasmamembran reduziert, werden internalisierte  $\beta$ 1AR durch PIST vor postendozytotischer Degradation geschützt (Koliwer et al. 2015). Zusätzlich verhindert PIST die Ubiquitinierung des metabolischen Glutamatrezeptors mGluR5 und verstärkt dessen Expression (Cheng et al. 2010b). Klüssendorf et al. konnten zeigen, dass PIST zu der korrekten subzellulären Sortierung des mGluR5 *in vivo* beiträgt (Klüssendorf et al. 2021).

Im Gegensatz dazu wird die Proteinmenge von anderen Proteinen mit einem PDZ-Liganden, wie beispielsweise CFTR, CIC-3B (*chloride channel-3B*), einem Chloridkanal, und MUC3 (*membrane-associated mucins 3*), ein transmembranes Mucin, durch die Überexpression von PIST reduziert. Die Reduktion von MUC3 kann durch Koexpression von CFTR rückgängig gemacht werden. Dies deutet daraufhin, dass CFTR und MUC3 um die Bindung an PIST konkurrieren (Gentzsch et al. 2003, Pelaseyed und Hansson 2011).

Auch im Zusammenhang mit SLC26A9, einem Mitglied der Anionentransporterfamilie SLC26 (*solute-linked carrier 26*), konnte ein negativer Effekt von PIST nachgewiesen werden. Der Anionentransporter interagiert wie CFTR sowohl mit NHERF1 als auch mit PIST. Die Koexpression von SLC26A9 mit F508del-CFTR führt zu einer verstärkten Interaktion von SLC26A9 mit PIST und hierdurch zu einer intrazellulären Retention von SLC26A9 (Bertrand et al. 2017).

Insgesamt wird deutlich, dass die Aufgabe beziehungsweise Rolle von PIST stark von dem jeweiligen Interaktionspartner abhängig ist und derzeit noch aktueller Forschungsgegenstand ist (Bauch et al. 2014, Cuadra et al. 2004, Gentzsch et al. 2003, Koliwer et al. 2015).

## 1.7 Das CFTR-interagierende Protein NHERF1

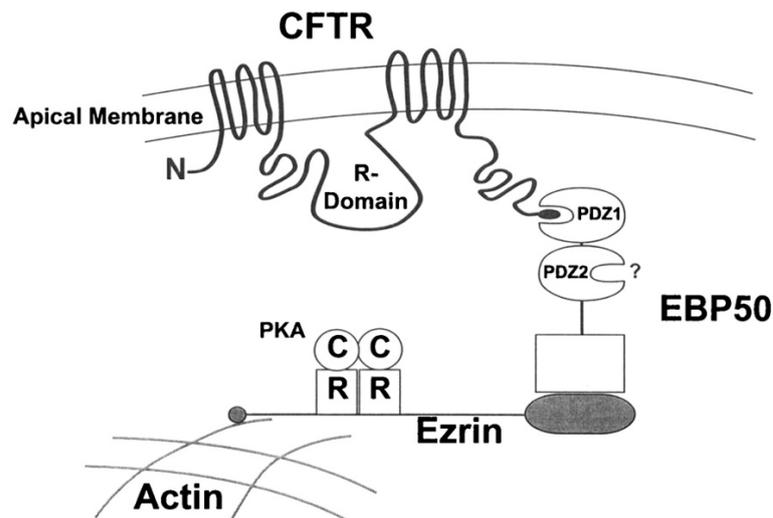
NHERF1, welches auch als *50-kDa Ezrin binding protein* (EBP50) bekannt ist, besteht aus zwei PDZ-Domänen und einer Ezrin-Bindungsdomäne (EBD) (Abbildung 1.5).



**Abbildung 1.5 Schematische Darstellung der Domänenstruktur von NHERF1.**  
NHERF1 enthält zwei PDZ-Domänen und eine Ezrin-Bindungsdomäne (EBD).

Über die beiden PDZ-Domänen kann NHERF1 mit mehr als 30 Proteinen interagieren. Dabei binden die meisten Proteine an PDZ-1 und nur wenige an PDZ-2 (Saponaro et al. 2014).

Wang et al. zeigten erstmals, dass NHERF1 über seine PDZ-Domänen mit dem PDZ-Liganden von CFTR interagiert (Moyer et al. 1999, Wang et al. 1998). Dabei weist die Bindung zu der PDZ-1 eine höhere Affinität auf (Short et al. 1998). NHERF1 ist für die apikale Sortierung von CFTR essentiell und stabilisiert CFTR an der Plasmamembran (Guggino und Banks-Schlegel 2004, Moyer et al. 2000). Es wird angenommen, dass NHERF1 CFTR am Aktinzytoskelett verankert, indem NHERF1 über seine EBD mit Ezrin interagiert, das wiederum mit Aktin vernetzt ist. NHERF1, welches hauptsächlich an der apikalen Plasmamembran in epithelialen Zellen lokalisiert ist, fungiert somit als Gerüstprotein (Haggie et al. 2006, Shenolikar und Weinman 2001, Short et al. 1998, Sun et al. 2000b). Ohne die Bindung von Ezrin an EBD kommt es zu intramolekularen Interaktionen im NHERF1. Diese führen zu der Bindung der letzten drei Aminosäuren am C-Terminus an PDZ-2, sodass anderen PDZ Liganden eine Bindung an PDZ-2 verwehrt bleibt (Morales et al. 2007). Darüber hinaus wird vermutet, dass NHERF1 zu einer erfolgreichen Integration von CFTR in einen funktionellen Signalkomplex führt, welcher für die Aktivierung von CFTR erforderlich ist. Ezrin besitzt eine Bindungsstelle für die regulatorische Untereinheit Typ II der Proteinkinase A (PKA). Die Bindung von PKA an den CFTR/NHERF1/Ezrin Komplex könnte somit die PKA-abhängige Phosphorylierung und somit die Aktivierung von CFTR ermöglichen (Abbildung 1.6) (Monterisi et al. 2012, Short et al. 1998, Sun et al. 2000a). Außerdem hält der CFTR/NHERF1/Ezrin/Aktin-Komplex unter anderem die Organisation der *Tight Junctions* und deren Barrierefunktion aufrecht (Castellani et al. 2012).



**Abbildung 1.6 Modell der Interaktion von CFTR, NHERF1 und Ezrin an der apikalen Plasmamembran. (aus: Short et al. 1998)**

CFTR interagiert mit NHERF1 (EBP50) über PDZ-1. Der C-Terminus von NHERF1 interagiert mit Ezrin. Über Ezrin ist NHERF1 und somit auch CFTR mit dem Aktinzytoskelett verankert. Ezrin bindet PKA und wird auf diese Weise in unmittelbarer Nähe des CFTR positioniert.

Darüber hinaus konnten Favia et al. in Überexpressionsexperimenten mit Wildtyp-NHERF1 (wtNHERF1) in einer Zelllinie, die wtCFTR exprimiert, ein signifikant erhöhtes Aufkommen des CFTR an der Plasmamembran sowie eine gesteigerte Aktivität zeigen (Favia et al. 2010). Im Gegensatz dazu konnten Cheng et al. den positiven Effekt von NHERF1 auf die Leitfähigkeit von CFTR und dessen Anreicherung an der Plasmamembran in nicht polarisierten Zellen nur im Vergleich zu überexprimiertem PIST aufzeigen. Durch Überexpression von NHERF1 alleine bleibt eine Erhöhung des CFTR-vermittelten Chloridstroms sowie eine vermehrte Expression an der Plasmamembran aus (Cheng et al. 2002). Die Überexpression von NHERF1 in einer Zelllinie, die homozygot für die p.F508del-Mutation ist, führte zu einer Umverteilung von zytosolischen F508del-CFTR wieder an die Plasmamembran und zu einer Rettung der CFTR-abhängigen Chloridsekretion (Favia et al. 2010).

Neben NHERF1 interagiert auch *Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>exchanger-3 regulatory factor 2* (NHERF2), auch bekannt als *exchanger 3 kinase A regulatory protein* (E3KARP), mit CFTR. NHERF1 und NHERF2 sind eng verwandte Proteine, die in 52 % der Proteinsequenz identisch sind. Wie NHERF1 besitzt auch NHERF2 zwei PDZ-Domänen (Yun et al. 1998). Sowohl CFTR als auch *Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 3* (NHE3, auch: *solute carrier family 9 member 3*, SLC9A3), ein Natrium-Protonen-Austauscher, interagieren mit NHERF2. Dabei steuert NHERF2 beide Transporter über seinen regulatorischen Komplex mit Ezrin und PKA (Bagorda et al. 2002).

*Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger-3 regulatory factor 3* (NHERF3), auch bekannt als *CFTR-associated protein, 70 kD* (CAP70) oder *PDZ-containing kidney protein 1* (PDZK1), und *Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger-3 regulatory factor 4* (NHERF4) sind weitere PDZ-Domänen-Proteine aus der NHERF-Familie, die mit CFTR interagieren. NHERF3 ist an der apikalen Plasmamembran konzentriert und enthält vier PDZ-Domänen, von denen drei an den C-Terminus von CFTR binden können. NHERF3 verstärkt, ähnlich wie NHERF1, die CFTR-Aktivität und erhöht die Permeabilität von CFTR für Chlorid (Guggino und Stanton 2006, Wang et al. 2000).

### **1.8 Die Rolle von PIST im Zusammenhang mit CFTR und NHERF1**

Cheng et al. hatten als Erste 2002 beschrieben, dass PIST mit CFTR über die PDZ-Domäne interagiert. Deren Forschung zeigte *in vitro*, dass überexprimiertes PIST die Expression von CFTR an der Plasmamembran reduziert, indem PIST die CFTR-Halbwertszeit an der Plasmamembran verringert und die Retention von CFTR innerhalb der Zelle begünstigt (Cheng et al. 2002, Cheng et al. 2004). Überexprimiertes PIST ruft dosisabhängig eine Reduktion der CFTR-Proteinmenge hervor (Cheng et al. 2004, Gentzsch et al. 2003). Es bleibt unklar, ob PIST mit seinem negativen Effekt den anterograden oder den retrograden Transport von CFTR beeinflusst. Über Kofunktion von NHERF1 kann dieser Effekt von PIST aufgehoben werden. NHERF1 und PIST konkurrieren funktionell um die Bindung an den PDZ-Liganden von CFTR (Alshafie et al. 2014, Cheng et al. 2002, Cheng et al. 2004).

In einer weiteren Veröffentlichung stellte sich heraus, dass PIST die lysosomale Degradation von reifem CFTR fördert und keine Auswirkung auf die gesamte Reifung von CFTR hat. Tc10, ein Protein aus der Familie der kleinen Rho-GTPasen, kann durch die Interaktion mit der zweiten *Coiled-coil*-Domäne die von PIST vermittelte Degradation von CFTR rückgängig machen (Cheng et al. 2005).

An der Degradation von reifem (post-ER) CFTR sind neben PIST auch Syntaxin6 und MARCH2 in einem gemeinsamen Komplex beteiligt (Cheng et al. 2010a, Cheng und Guggino 2013).

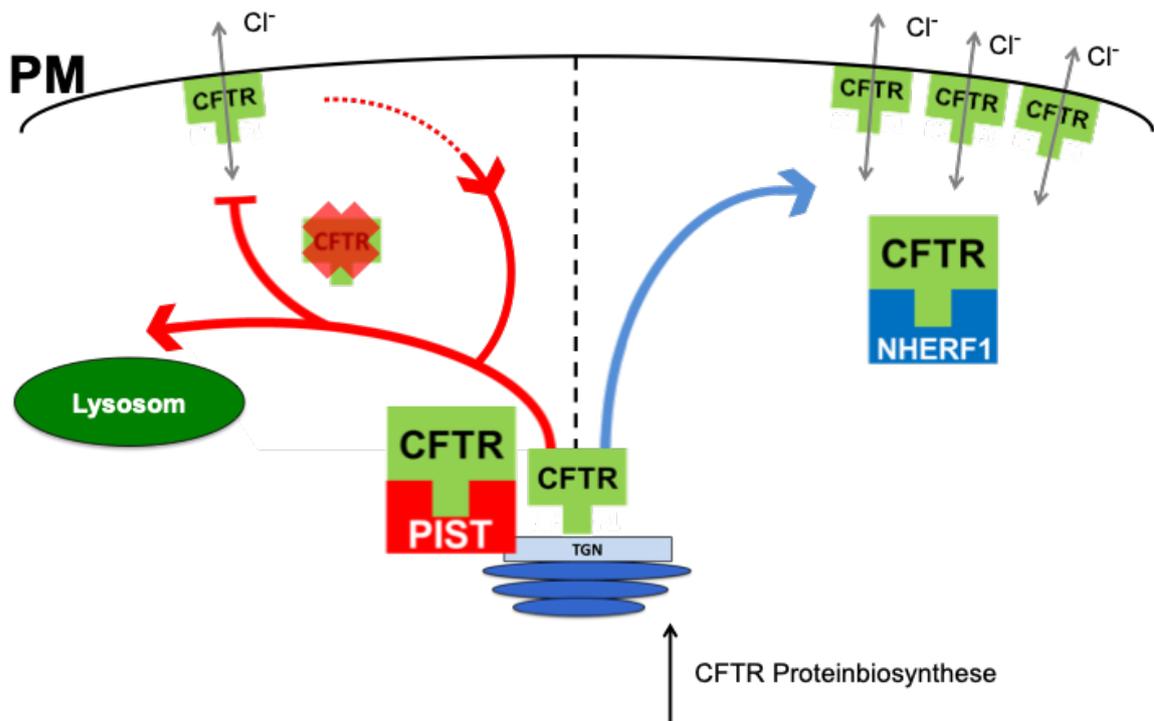
Auch im Zusammenhang mit der krankheitsassoziierten p.F508del-Mutation des CFTR konnte gezeigt werden, dass F508del-CFTR durch PIST im ER zurückgehalten und anschließend degradiert wird. Durch die Inhibition von PIST kann nicht nur die Zelloberflächenexpression von F508del-CFTR, sondern auch der

Chloridstrom in polarisierten Bronchialepithelzellen erhöht werden. Somit nehmen Bergbower et al. an, dass PIST zur Schwere der zystischen Fibrose beiträgt (Bergbower et al. 2018, Wolde et al. 2007).

Cheng et al. entwickelten ein Modell, indem PIST CFTR am TGN zurückhält und reifes CFTR direkt oder nach Endozytose zum Lysosom transportiert. PIST wird als ein Negativregulator beschrieben, dessen funktionaler Gegenspieler NHERF1 ist (Abbildung 1.7) (Bergbower et al. 2018, Cheng et al. 2002, Cheng et al. 2004). Aufgrund des derzeitigen Forschungsstandes wurden CFTR-Stabilisatoren, die die PIST-PDZ-Domäne kompetitiv inhibieren, als therapeutischer Ansatz für die Behandlung von zystischer Fibrose vorgeschlagen (Bergbower et al. 2018, Cheng et al. 2004, Cushing et al. 2010, Wolde et al. 2007).

Cushing et al. zeigten, dass die Halbwertszeit von F508del-CFTR über eine Hemmung der PDZ-Domäne von PIST verlängert werden kann (Cushing et al. 2010). An verschiedenen PDZ-Domänen-Inhibitoren wird derzeit geforscht (Amacher et al. 2013, Amacher et al. 2011, Amacher et al. 2014, Holt et al. 2019, Kundu et al. 2012, Qian et al. 2015, Roberts et al. 2012, Vouilleme et al. 2010). Methyl-3,4-dephostatin (MD) und Ethyl-3,4-dephostatin (ED) sind Beispiele für potenzielle, niedermolekulare PDZ-Inhibitoren für PIST, die einen Cysteinrest der PIST-PDZ-Domäne modifizieren (Zhao et al. 2018). Es konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der PIST-PDZ-Domäne in Bronchialepithelzellen eines ZF-Patienten die apikale Expression von F508del-CFTR erhöht und das mutierte CFTR stabilisiert (Cushing et al. 2010, Wolde et al. 2007).

In Bezug auf SSTR5 und  $\beta$ 1AR konnte ebenfalls eine Retention innerhalb der Zelle durch PIST beobachtet werden, genauer beschrieben in Kapitel 1.7. Auch wenn im Zusammenhang mit CFTR, SLC26A9 (Bertrand et al. 2017), CIC-3B (Gentsch et al. 2003) und MUC3 (Pelaseyed und Hansson 2011) ein negativer Effekt von PIST ermittelt wurde, zeigten Bauch et al. sowie Koliwer et al., dass PIST als stabilisierendes Sortierungsprotein fungieren kann, da es unter anderem Membranproteine vor postendozytotischer Degradation schützt und so die zelluläre Proteinmenge steigert (Bauch et al. 2014, Koliwer et al. 2015, Ren et al. 2013). Außerdem zeigten Bauch et al., dass PIST nicht um die Bindung an SSTR5 konkurriert, sondern die Interaktion von NHERF1 mit SSTR5 verstärkt (Bauch et al. 2014).



**Abbildung 1.7 Schematische Darstellung der Rolle von PIST und NHERF1 für CFTR *in vitro*.** PIST und NHERF1 interagieren mit CFTR. Überexpressionsexperimente zeigten, dass PIST CFTR am TGN zurückhält und die Degradation von CFTR fördert. NHERF1 kann durch Kofunktion diesen, von PIST vermittelten Effekt, rückgängig machen. Die Überexpression von NHERF1 führt zu vermehrtem Aufkommen von CFTR an der Plasmamembran (PM), stabilisiert diesen dort und erhöht dessen Aktivität (Favia et al. 2010). PIST und NHERF1 sind unterschiedlich in der Zelle lokalisiert und konkurrieren deshalb funktionell um CFTR (Cheng et al. 2002).

Zusammengefasst spielt PIST eine relevante Rolle in der subzellulären Verteilung des CFTR. Cheng et al. beschreiben PIST als einen Negativregulator, der unter anderem die lysosomale Degradation von CFTR *in vitro* fördert (Cheng et al. 2010a, Cheng et al. 2002, Cheng et al. 2004). Die Rolle von PIST in Bezug auf andere Membranproteine scheint sich allerdings zu unterscheiden. Einige forschende Arbeitsgruppen stellen PIST vielmehr als einen Positivregulator dar (Bauch et al. 2014, Cheng et al. 2010b, Klüssendorf et al. 2021, Koliwer et al. 2015).

## 1.9 Ziel der Arbeit

Die Rolle von PIST ist vielfältig und wird maßgeblich durch den jeweiligen Interaktionspartner bestimmt. Aufgrund dieser Vielfältigkeit soll in dieser Arbeit geklärt werden, ob der aktuelle Forschungsstand in Bezug auf die Interaktion von PIST mit CFTR und dessen Auswirkungen auf andere *in vitro* Modelle und insbesondere ein *in vivo* Modell übertragen werden kann. Interessant ist hierbei die Frage, ob PIST CFTR auch in diesen Modellen in der Zelle zurückhält und den lysosomalen Abbau von CFTR fördert. Weiterhin soll die Funktion von PIST im Zusammenhang mit CFTR und NHERF1, welches als Positivregulator und Gegenspieler von PIST in der Literatur beschrieben ist, ermittelt werden.

Zunächst soll in HEK239-T Zellen die Interaktion von PIST und NHERF1 mit CFTR durch Immunpräzipitation überprüft werden. Darüber hinaus können ebenfalls Veränderungen des CFTR-Proteinlevels in Abhängigkeit von überexprimierten PIST, NHERF1 oder beiden Interaktionspartnern ermittelt und eine Konkurrenz oder Abhängigkeit zwischen PIST und NHERF1 aufgedeckt werden. Eine Variation des CFTR-Proteinlevels sowie eine mögliche funktionelle Konkurrenz oder Abhängigkeit zwischen den genannten Interaktionspartnern kann weiterhin über einen *knockdown* von PIST aufgeschlüsselt werden.

In einem weiteren Schritt soll ferner ein *in vitro* Modell für das Lungenepithel etabliert werden. Hierfür soll in Adenokarzinom-Zellen aus der Lunge, Calu-3 Zellen, PIST über die CRISPR/Cas-Methode herunterreguliert und anschließend auf entsprechenden *Transwells* ausdifferenziert werden, um Veränderungen im CFTR-Proteinlevel mittels Immunblot zu detektieren. Darüber hinaus soll CFTR immunocytochemisch angefärbt und mittels konfokaler Mikroskopie analysiert werden, um die Lokalisation beziehungsweise apikale Sortierung von CFTR in Abhängigkeit von PIST zu ermitteln.

Des Weiteren wird ein besonderer Fokus auf die Analyse von PIST-*knockout*-Mäusen gelegt. Die PIST-*knockout*-Mauslinie wurde zuvor in der Arbeitsgruppe etabliert. PIST-*knockout*-Tiere sollen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen auf ihr CFTR-Proteinlevel mit Hilfe von Membranfraktionierung und Immunblot in verschiedenen Organen (Lunge, Leber und Darm) analysiert werden. Anschließend wird eine immunhistochemische Analyse von der Lunge der Mäuse weitere Aufschlüsse geben, ob PIST eine relevante Rolle in der subzellulären Verteilung von CFTR *in vivo* spielt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien waren entweder von höchster Reinheit oder wurden in analytischer Qualität eingesetzt. Standardchemikalien, die in Tabelle 2.1 nicht aufgeführt sind, wurden von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

**Tabelle 2.1: Übersicht über die verwendeten Chemikalien, Reagenzien, Pulver und Fertiglösungen.**

Bezeichnung	Anwendung/Material	Hersteller
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	SDS-PAGE	Sigma-Aldrich
<i>Complete Mini, EDTA-free</i>	Proteaseinhibitor	Roche Applied Science AG
<i>10x CoralLoad PCR-Buffer</i>	PCR-Puffer	Qiagen
<i>Dako protein block</i>	Blockierlösung (IZ)	Agilent Technologies, Inc.
<i>Dako wash buffer 10x</i>	Waschpuffer(IZ)	Agilent Technologies, Inc.
<i>DirectPCR Tail</i>	Schwanzspitzenlysepuffer	VWR Life Science
dNTPSs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	dNTP Mischung	Thermo Fisher Scientific Inc.
EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin	Reaktives Biotin	Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>10x FastDigest Green Buffer</i>	Restriktions-Puffer	Thermo Fisher Scientific Inc.
Fluoromont G	Eindeckelmedium	<i>Southern Biotech</i>
<i>Hi-Di Formamide</i>	DNA-Sequenzierung	Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>Lenti-X Concentrator</i>	Aufreinigung Lentiviren	Takra Clontech
<i>Lipo-RNAi MAX</i>	Transfektionsreagenz	Thermo Fisher Scientific Inc.
Leupeptin	Proteaseinhibitor	Roche Applied Science AG
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	PCR-Zusatz	Qiagen
<i>Mindori Green Advance DNA Stain</i>	Nukleinsäure-Detektion	Biozym Scientific GmbH
Pepstatin A	Proteaseinhibitor	Roche Applied Science AG
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Proteaseinhibitor	Roche Applied Science AG
Poly-L-Lysin (PLL)	Oberflächen-Beschichtung	Sigma-Aldrich

Polybren	Optimierung lentiviraler Infektion	Millipore
<i>ProLong Diamond Antifade Mountant with DAPI</i>	Eindeckelmedium	Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>5x Q-Solution</i>	PCR-Zusatz	Qiagen
RFP-Trap	Koimmunpräzipitation	ChromoTek, Martinsried
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	30 % Acrylamid-Stammlösung	Carl Roth GmbH + Co. KG
Natriumdodecylsulfat (SDS)	SDS-PAGE	Carl Roth GmbH + Co. KG
<i>TaqMan 2x Universal PCR Master Mix</i>	<i>TaqMan-Mastermix</i>	Thermo Fisher Scientific Inc.
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamine (TEMED)	SDS-PAGE	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Permeabilisierung	Roth, Karlsruhe
<i>TurboFect</i>	Transfektionsreagenz	Thermo Fisher Scientific Inc.

### 2.1.2 Puffer und Lösungen

Für Puffer und Lösungen wurde, wenn nicht anders angegeben, doppelt demineralisiertes Wasser (ddH<sub>2</sub>O) verwendet. Bei Bedarf wurden diese anschließend mittels Autoklavieren (20 Minuten bei 121 °C und 2 bar) oder Sterilfiltration (Filter mit 0,45 µm Porengröße) sterilisiert.

**Tabelle 2.2: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen.**

Bezeichnung	Zusammensetzung
BBS (2x)	50 mM BES 280 mM NaCl 1,5 mM Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 6,96
Blockpuffer	5 % (v/v) Pferdeserum 0,1 % (v/v) Triton-X in PBS
DAKO-Puffer (1x)	10 % (v/v) 10xDako Target Retrieval pH9 in ddH <sub>2</sub> O
DAPI Färbebad	0,001 mg/ml DAPI in PBS
DNA-Ladepuffer (6x)	10 mM Tris-HCl; pH 7,6

	0,03 % (w/v)	Bromphenolblau
	0,03 %	Xylen-Cyanol FF
	60 %	Glycerol
	60 mM	EDTA
Homogenisierungspuffer	50 mM	Tris/HCl; pH 7,5
	1 mM	EGTA
	5 mM	MgCl <sub>2</sub>
Hypotonischer Puffer	5 mM	Tris/HCl; pH 7,5
	1 mM	EGTA
	5 mM	MgCl <sub>2</sub>
KCM-Puffer (5x)	500 mM	KCl
	150 mM	CaCl <sub>2</sub>
	250 mM	MgCl <sub>2</sub>
Lämmli-Probenpuffer (5x)	300 mM	Tris/HCl; pH 6,8
	50 % (v/v)	Glycerin
	7,5 % (w/v)	SDS
	0,5 M	DTT
	0,01 % (w/v)	Bromphenolblau
PBS (1x)	140 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	10 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,8 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
		pH 7,4
PBS (Immunzytochemie) (10x)	1,37	NaCl
	27 mM	KCl
	65 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O
		pH 7,4
PBS-T	0,05 % (v/v)	Tween 20 in 1x PBS
Poly-L-Lysin-Lösung	0,1 mg/ml	PLL in Boratpuffer
RIPA-Puffer	150 mM	NaCl
	50 mM	Tris/HCl; pH 8,0
	5 mM	EDTA

	0,5 % (w/v)	Natriumdeoxycholat
	1 % (v/v)	NP-40
	0,1 % (w/v)	SDS
SDS-PAGE-Laufpuffer	0,1 % (w/v)	SDS 1x Tris/Glycin
Solution B	0,5 mM	DTT
	2 mM	EDTA in PBS
TAE-Puffer	40 mM	Tris-Acetat; pH 8,0
TBS-T (Immunzytochemie) (10x)	0,5 mM	Tris
	1,5 M	NaCl
	0,5 % (v/v)	Tween pH 7,6
TBS-T (1x)	10 mM	Tris/HCl; pH 8,0
	150 mM	NaCl
	0,1 % (v/v)	Tween 20
TEC-Puffer (20x)	41 mM	Tris
	34 mM	EDTA
	23 mM	Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> pH 7,8
Transferpuffer	0,02 %	SDS
	20 % (v/v)	Methanol 1x Tris/Glycin
Tris/Glycin (10x)	0,25 M	Tris; pH 8,3
	1,92 M	Glycin
Tris-HCL	0,5 M	Tris pH 7,4
Trypsin-Stammläumlösung	50 mM	Tris-HCL
	1 mg/ml	Trypsin
	10,07 mM	CaCl <sub>2</sub> xH <sub>2</sub> O
Trypsin-Gebrauchslösung	50 mM	Tris-HCL
	100 µl	Trypsin-Stammläumlösung

TSB-Puffer	10 %	PEG 3350
	5 % (v/v)	DMSO
	10 µM	MgSO <sub>4</sub>
	10 µM	MgCl <sub>2</sub>
		LB-Medium; pH 6,1
Universalpuffer	100 mM	NaCl
	50 mM	HEPES; pH 7,4
Versene	0,5 mM	EDTA in PBS

### 2.1.3 Medien und Zusätze

**Tabelle 2.3: Verwendete Medien und Zusätze für molekularbiologische Arbeiten.**

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Antibiotika	100 µg/ml	Ampicillin
	50 µg/ml	Kanamycin
	15 µg/ml	Tetrazyklin
Lagermedium	10 % (v/v)	FBS
	10 % (v/v)	Glycin in MEM/DMEM
LB-Agar	15 mg/ml	Agar ad LB-Medium
LB-Medium	10 mg/ml	Trypton
	5 mg/ml	Hefeextrakt
	5 mg/ml	NaCl
		pH 7,5

**Tabelle 2.4: Verwendete Medien und Zusätze für zellbiologische Arbeiten.**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM)	Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>Fetal Bovine Serum</i> (FBS)	Sigma-Aldrich
<i>Hank's Balanced Salt Solution</i> (HBSS)	Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>Minimum Essential Media</i> (MEM)	Thermo Fisher Scientific Inc.
Penicillin / Streptomycin	Thermo Fisher Scientific Inc.
Opti-MEM (serumreduziertes Medium mit GlutaMAX)	Thermo Fisher Scientific Inc.
10x Trypsin	Thermo Fisher Scientific Inc.

**Tabelle 2.5: Zusammensetzung der verwendeten Medien für zellbiologische Arbeiten.**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
HBSS/Pen/Strep	100 µg/ml Penicillin/Streptomycin in HBSS
Kulturmedium für HEK293-T	10 % (v/v) FBS 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin in DMEM
Kulturmedium für Calu-3	10 % (v/v) FBS 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin 1 µM Simvastatin in MEM
Einfriermedium für HEK293-T & Calu-3	10 % (v/v) FBS 10 % (v/v) DMSO in DMEM

## 2.1.4 Kits, Enzyme und Standards

**Tabelle 2.6: Verwendete Kits, Enzyme und Standards.**

<b>Kits</b>	<b>Hersteller</b>
<i>NukleoBond Xtra Midi Kit</i>	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
<i>BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit</i>	Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>WesternBright</i> Chemilumineszenzsubstrat für Film	Biozym Scientific GmbH
<i>DC-Protein Assay Kit</i>	Bio-Rad Laboratories, Inc
<b>Enzyme</b>	<b>Hersteller</b>
<i>FastDigest</i> -Restriktionsendonukleasen	Thermo Fisher Scientific Inc.
Proteinase K	Sigma-Aldrich
<b>Standards</b>	<b>Hersteller</b>
<i>PageRuler Plus Pre-Stained Protein Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific Inc.

## 2.1.5 Oligonukleotide

### 2.1.5.1 Sequenzierung

GFP rev                    **AGCTCGACCAGGATGGGCACC**

SP6 rev                    **GATTTAGGTGACACTATAG**

### 2.1.5.2 Genotypisierung von Mäusen

WT-for                    **GCT TTG ACG TGA AGC TGC CC**

WT-rev                    **CCA CCT ACG GTC CCA TTC AG**

3'-rev                    **CCA CCT ACG GTC CCA TTC AG**

5'-rev                    **TTG ATA TCG TGG TAT CGT TAT GCG**

## 2.1.6 Vektoren

### 2.1.6.1 Zur Verfügung gestellte Vektoren

**Tabelle 2.7: Zur Verfügung gestellte Vektoren.**

Name	Herkunft
GFP-NHERF1	AG Kreienkamp
<i>Flag</i> -NHERF1	AG Kreienkamp
GFP-PIST	AG Kreienkamp
<i>Flag</i> -PIST	AG Kreienkamp
GFP/FUW	AG Kreienkamp
PIST-GFP/FUW	AG Kreienkamp
PIST sh4/pGipz	AG Kreienkamp
Kontrolle sh/pGipz	AG Kreienkamp
pMD2.G	Addgene (Plasmid #12259)
psPAX.2	Addgene (Plasmid #12260)
Crispr Vektor	Genscript

## 2.1.7 Antikörper

### 2.1.7.1 Primärantikörper

**Tabelle 2.8: Primärantikörper.**

Antigen	Wirt	Western Blot	Immunzytochemie	Quelle
Actin	Kaninchen	1:1000	-	Sigma-Aldrich
$\beta$ -Actin	Maus	1:1000	-	Abcam
Biotin	-	-	1:700	Rockland
CFTR	Maus	1:1000	-	CFFT
CFTR	Kaninchen	1:1000	-	Cell Signaling
CFTR	Maus	-	1:100/1:200	Chemicon

CFTR	Kaninchen	-	1:200	Bioss
<i>Flag</i>	Kaninchen	1:2000	1:1000	Sigma-Aldrich
<i>Flag</i>	Maus	1:1000	1:1000	Sigma-Aldrich
GAPDH	Maus	1:1000	-	Antibodies-online
GFP	Maus	1:1000	-	Coavance
Occludin	Ziege	-	1:400	Santa Cruz Biotechnology
PIST	Meer- schweinchen	1:1000	1:1000	AG Kreienkamp
PIST	Kaninchen	1:1000	1:300	Sigma-Aldrich
PIST	Kaninchen	-	-	Sigma-Aldrich
RFP	Ratte	1:1000	-	ChromoTek
Transferrin- Rezeptor	Maus	1:1000	-	Thermo Fisher Scientific Inc.
Transferrin- Rezeptor	Kaninchen	1:1000	-	Abcam

### 2.1.7.2 Sekundärantikörper

**Tabelle 2.9: Sekundärantikörper.**

Spezifität	Markierung	Wirt	Verdünnung	Quelle
Kaninchen	HRP	Ziege	1:2500	Dianova
Kaninchen	Alexa-Fluor 488	Ziege	1:2000	Thermo Fisher Scientific Inc.
Kaninchen	Cy3	Ziege	1:500	Dianova
Kaninchen	Alexa-Fluor 488	Ziege	1:600	MobiTec
Kaninchen	Alexa-Fluor 594	Ziege	1:750	MobiTec
Maus	HRP	Ziege	1:2500	Dianova

Maus	Cy3	Ziege	1:500	Dianova
Maus	Alexa-Fluor 488	Ziege	1:600	MobiTec
Maus	Alexa-Fluor 594	Ziege	1:750/1250	MobiTec
Meerschweinchen	HRP	Ziege	1:2500	ImmunoReagent
Meerschweinchen	Alexa-Fluor 633	Ziege	1:1000	Thermo Fisher Scientific Inc.
Meerschweinchen	Alexa-Fluor 555	Ziege	1:2000	Thermo Fisher Scientific Inc.
Ratte	HRP	Ziege	1:2500	Dianova
Ziege	Alexa-Fluor 488	Affe	1:400	Biomol

### 2.1.8 Organismen

E. coli-Bakterien vom Stamm Top10F' wurden für Retransformationen verwendet. Für zellbiologische Methoden wurden die Zelllinien HEK293-T (*human embryonic kidney*, ATCC, Manassas, USA) und Calu-3 (*human lung adenocarcinoma*, Geschenk von Dr. Regina Scherließ, Universität Kiel, Deutschland) verwendet. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Mäuse hatten den genetischen Hintergrund von B57BL/6N und wurden in der Versuchstierhaltung des UKE gehalten.

### 2.1.9 Geräte und Softwares

**Tabelle 2.10: Geräte.**

Geräte	Anwendung	Hersteller
<i>ABI PRISM 3500 Genetic Analyser</i>	DNA-Sequenziergerät	Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>FACS Canto II</i>	Analytische Durchflusszytometrie	BD Biosciences
<i>ChemiDoc XRS-System</i>	Detektion von Chemilumineszenz	Bio-Rad Laboratories, Inc.
<i>Epoch Multi-Volume Spectrophotometer-System</i>	Nukleinsäure- und Proteinkonzentration	BioTek Instruments, Inc.

<i>Leica TCS SP5-System</i>	konfokale Laserrastermikroskopie	Leica Microsystems
<i>Leica TCS SP8-System</i>	konfokale Laserrastermikroskopie	Leica Microsystems
<i>Millicell-ERS</i>	Messung des transepithelialen Widerstands	Merck KGaA
<i>Mini-PROTEAN III-System</i>	SDS-PAGE	Bio-Rad Laboratories, Inc.
<i>Mini Trans-Blot-System</i>	<i>Western Blot</i>	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Transilluminator-System	Detektion von Nukleinsäurebanden	Bachofer
<i>Biometra T Gradient Thermocycler</i>	Polymerasekettenreaktion	Biometra GmbH
<i>Mini-PROTEAN III-System</i>	SDS-PAGE	Bio-Rad Laboratories, Inc.
<i>Mini Trans-Blot-System</i>	<i>Western Blot</i>	Bio-Rad Laboratories, Inc.

**Tabelle 2.11: Softwares.**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Anwendung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<i>BD FACSDIVA</i>	Visualisierung und Analyse von FACS-Daten	BD Biosciences
<i>Chromas</i>	Visualisierung und Analyse von DNA-Sequenzen	Technelysium
<i>Microsoft Excel</i>	Statistische Analysen	Microsoft Corporation
<i>Leica LAS X</i>	Visualisierung von Mikroskopie-Daten	Leica Microsystems
<i>GraphPad Prism</i>	Statistische Analysen	GraphPad Software
<i>ImageJ/Fiji</i>	Visualisierung und Analyse von Mikroskopie-Daten	
<i>ImageLab</i>	Visualisierung und Analyse von Chemilumineszenzdaten	Bio-Rad Laboratories, Inc
<i>ZEN</i>	Analyse von Mikroskopie-Daten	Carl Zeiss AG

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese diente der größenabhängigen Auftrennung von DNA-Fragmenten zum Zweck der Fragmentisolierung und Kontrolldokumentation. Die Gele wurden aus 1-1,3 % (w/v) Agarose in TAE Puffer hergestellt. Zusätzlich waren die Gele mit 6 µg/100 ml *Mindori Green Advance* DNA-Farbstoff versehen, um die DNA für die spätere UV-Licht-Detektion zu markieren. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 100 V in TAE-Puffer. Unter UV-Licht konnten anschließend die DNA-Fragmente detektiert werden. Als Größenreferenz diente der *GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder*.

### 2.2.2 Restriktionsverdau von doppelsträngiger DNA

Der Restriktionsverdau ist eine auf den Einsatz von sequenzspezifischen Restriktionsenzymen (DNAsen) basierende sequenzspezifische DNA-Spaltung und diente der Überprüfung von Plasmiden. Für den Restriktionsverdau wurden *FastDigest*-Restriktionsenzyme und *10x FastDigest Green Buffer* verwendet. Die Restriktionsenzyme erkennen spezifisch eine Sequenz von 6-8 Basenpaaren und schneiden die DNA, sodass je nach Enzym 5'- oder 3'- oder keine Überhänge entstehen können. Insgesamt wurden 1-2 µg DNA mit 10x Reaktionspuffer und je 1 U Restriktionsenzym in einem Gesamtvolumen von 30 µl vermischt. Die Ansätze wurden 1 Stunde bei 37 °C inkubiert.

### 2.2.3 Retransformation

Ziel der Retransformation war es, DNA-Plasmide zu vervielfältigen. Hierzu wurden *E.coli*-Bakterien vom Stamm Top10F' verwendet. 1-5 µg DNA wurden mit 20 µl 5x KCM (1:5 Verdünnung) versetzt und auf 100 µl mit Wasser aufgefüllt. Zu dem Ansatz wurden 100 µl kompetente *E.coli*-Zellen, die auf Eis aufgetaut worden waren, hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 20 Minuten auf Eis folgte ein Hitzeschock für 5 Minuten bei 37 °C. Anschließend wurde der Ansatz mit 1 ml LB-Medium ohne Antibiotikum versetzt. Dieser inkubierte für 1 Stunde bei 37 °C bei 300 rpm. Schließlich wurden 50 µl auf einer LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

#### 2.2.4 Isolation von DNA-Plasmiden, kleiner Maßstab (Minipräparation)

3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum wurden mit einer Kolonie von einer LB-Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. 1,5 ml von der Übernacht-Kultur wurden für 30 Minuten bei 20 000 g zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl Resuspensionspuffer (alle Puffer von *Macherey und Nagel*, Düren, Deutschland) aufgenommen und mit weiteren 100 µl Lysepuffer versehen. Nach einer Inkubationszeit von 2 Minuten wurde durch die Zugabe von 100 µl Neutralisationspuffer die Lyse gestoppt und Proteine und chromosomale DNA wurden ausgefällt. Danach wurden diese für 20 Minuten bei 20 000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 120 µl Isopropanol versetzt und invertiert, sodass die DNA ausfällt. Anschließend konnte die DNA durch Zentrifugation für 20 Minuten bei 20000 g präzipitiert und der Überstand verworfen werden. Das Pellet wurde mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen und erneut für 5 Minuten bei 20 000 g abzentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes erfolgte schließlich die Trocknung des Pellets für 15 Minuten an der Luft. Am Ende wurde das Pellet in 50-100 µl Wasser entsprechend der Größe des Pellets resuspendiert.

#### 2.2.5 Isolation von DNA-Plasmiden, großer Maßstab (Midipräparation)

100 ml LB-Medium mit dem geeigneten Antibiotikum wurden mit 1,5 ml einer Übernacht-Kultur angeimpft und bei 37 °C über Nacht unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden für 10 Minuten bei 5 000 g und 4 °C abzentrifugiert. Daraufhin erfolgte die Weiterverarbeitung nach der Anleitung und mit den Bestandteilen des *Kit NucleoBond Xtra Midi/Maxi*. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die optische Dichte in einem Photometer bei 260 nm bestimmt. Zusätzlich konnte die hergestellte DNA mittels eines Testrestriktionsverdau (Kapitel 2.2.2) und einer Sequenzierung (Kapitel 2.2.6) verifiziert werden.

#### 2.2.6 Sequenzierung von DNA-Plasmiden

Die DNA Sequenzierung wurde mit Hilfe des *BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit* nach der Kettenabbruchmethode mit fluorophor-markierten 2',-3'-Dideoxyribonukleosid-Triphosphaten (ddNTPs) nach Sanger et al. durchgeführt. Für einen Sequenzierungsansatz wurden 1 µg der Plasmid-DNA

mit 10 pmol eines sequenzspezifischen Oligonukleotids, 2,5 µl *Half Term Reaction Buffer* und 2 µl *BigDye Terminator Mix* versetzt und mit der Zugabe von ddH<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 10 µl gebracht. Zur Amplifizierung wurde die DNA bei 95 °C initial denaturiert. Anschließend durchlief der Reaktionsansatz in einem Thermocycler insgesamt 25 Zyklen (die Denaturierung für 30 Sekunden bei 95 °C, die Primer-Hybridisierung für 45 Sekunden bei 55 °C und die Elongation für 4 Minuten bei 60 °C). Die DNA-Lösung wurde mit 40 µl ddH<sub>2</sub>O, 5 µl Natriumacetat (3M) und 130 µl 100%igem Ethanol versetzt und gevortext. Nach einer Inkubation von 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde die DNA bei 20 000 g für 30 Minuten bei 4 °C gefällt. Es erfolgte eine Waschung des Pellets mit 500 µl 70%igem Ethanol und eine erneute Zentrifugation bei 20 000 g für 5 Minuten bei 4 °C. Anschließend wurde das Pellet für 10 Minuten bei 50 °C getrocknet und mit 20 µl *Hi-Di Formamide* überschichtet. Zum Schluss konnte die Nukleotidabfolge mit Hilfe des Sequenziergeräts *ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer* im Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf bestimmt werden.

## 2.3 Zellbiologische Methoden

### 2.3.1 Kultivierung von HEK293-T und Calu-3 Zellen

HEK293-T und Calu-3 Zellen lagerten bei  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Um die Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurde ein Aliquot im Wasserbad bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufgetaut und tröpfchenweise langsam mit 10 ml Kulturmedium versetzt. Danach wurden die Zellen für 3 Minuten bei 1 000 g abzentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und auf eine 10 cm Schale überführt und ausplattiert. Für die weitere Kultivierung wurden die Zellen zweimal pro Woche passagiert. Hierzu wurden die Zellen 1-2x mit Versene gewaschen und mit 1 ml 1x Trypsin in Versene für 5-15 Minuten entsprechend der Zelllinie bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. HEK293-T Zellen wurden für 5 Minuten trypsiniert, wohingegen Calu-3 Zellen für 15 Minuten trypsiniert werden mussten. Nachdem sich die Zellen von der Platte und untereinander gelöst hatten, wurden sie in 9 ml Kulturmedium resuspendiert und vereinzelt. Im letzten Schritt erfolgte die Verdünnung und Ausplattierung der Zellen entsprechend der Anwendung.

Für die Lagerung von HEK293-T und Calu-3 Zellen wurden die Zellen wie zuvor mit Versene gewaschen und mit 1x Trypsin in Versene inkubiert und in 9 ml Kulturmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen für 3 Minuten bei 1 000 g abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde nun in 1 ml Einfriermedium resuspendiert ( $1 \times 10^6$  Z/ml) und in Kryoröhrchen überführt. Diese wurden in einer Einfrierhilfe auf  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  heruntergekühlt. Für Langzeitlagerungen lagerten die Kryoröhrchen bei  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 2.3.2 Ausdifferenzierung von Calu-3 Zellen

Calu-3 Zellen wurden auf *Costar Transwells* von *Corning* (Amsterdam, Niederlande) mit einer Porengröße von  $0,4\text{ }\mu\text{m}$  ausdifferenziert. 1,5 ml Kulturmedium wurde zunächst in das basolaterale Kompartiment hinzugegeben. Die Calu-3 Zellen wurden wie in 2.3.1 beschrieben, von der Platte gelöst und in Kulturmedium resuspendiert. Danach wurde die Zellzahl pro Milliliter in einer Neubauerkammer bestimmt. Die Anzahl der Zellen in der Zellsuspension wurde auf  $1 \times 10^5$  Zellen in  $500\text{ }\mu\text{l}$  eingestellt.  $500\text{ }\mu\text{l}$  Zellsuspension wurden pro *well* in das apikale Kompartiment gegeben. Zweimal pro Woche wurde das Kulturmedium des apikalen und basolateralen Kompartiments gewechselt. Die Differenzierung der Calu-3 Zellen erfolgte über einen Zeitraum von 10 Tagen.

Die Differenzierung wurde mittels Messung des transepithelialen Widerstandes zwischen apikalem und basalem Medium überwacht und aufgezeichnet. Als Messgerät diente das *Millicell-ERS*.

### 2.3.3 Transfektion von HEK293-T Zellen mit *TurboFect*

Für die Transfektion von HEK293-T Zellen mit *TurboFect* wurde DMEM ohne Zusätze mit DNA und *TurboFect* versetzt und gut invertiert. Die genauen Mengenangaben kann man der Tabelle 2.12 entnehmen. Bei der Transfektion von mehreren DNA Plasmiden beziehen sich die Angaben auf die gesamte Menge transfizierter DNA. Nach einer Inkubation von 20 Minuten bei Raumtemperatur wurde der Transfektionsansatz tröpfchenweise in das Kulturmedium 80 % konfluenter HEK293-T Zellen gegeben. Nach 4 Stunden erfolgte der Austausch des Kulturmediums gegen frisches.

**Tabelle 2.12: Transfektion von HEK293-T Zellen mit *TurboFect*.**

Größe der Kulturschale	Kulturmedium	DNA (insgesamt)	<i>TurboFect</i>
10 cm-Schale	1 ml DMEM	10 µg	10 µl
6-well-Schale (/well)	400 µl DMEM	4 µg	4 µl
12-well-Schale (/well)	100 µl DMEM	2 µg	2 µl

### 2.3.4 Reverse Transfektion von HEK293-T Zellen mit siRNA

Die reverse Transfektion mit siRNA führte zu einer Herunterregulierung (*knockdown*) von PIST. Hierzu wurde die siRNA GOPC#9 (Sequenz: CAAGGTGTTGGTCCAATTAGA) von der Firma *Qiagen* (Hilden, Deutschland) verwendet. Jeweils 100 µl OptiMEM wurden zum einen mit 8 µl *Lipo-RNAi MAX* und zum anderen mit 80 nM siRNA versetzt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden beide Ansätze vereinigt und für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe des Transfektionsansatzes zu 1 ml vorbereitetem Kulturmedium auf einer 6-well-Schale. Anschließend wurden HEK293-T Zellen auf die Schale direkt ausgesät, die zuvor von einer 10 cm-Schale gelöst (Kapitel 2.3.1) und 1:10 verdünnt wurden.

### 2.3.5 Transfektion von HEK293-T Zellen mit Calciumphosphat zur Virusproduktion

Im Rahmen dieser Arbeit diente die Transfektion von HEK293-T Zellen mit Calciumphosphat der Herstellung von lentiviralen Viren. Hierzu wurden 427,5 µl Wasser mit 15 µg des viralen Vektors, 5 µg psPAX.2 und 2,5 µg pMD2.G versetzt. Abhängig von der DNA-Konzentration der Vektoren konnte das Volumen des zugefügten Wassers variieren. Insgesamt sollte der Transfektionsansatz ein Volumen von 500 µl umfassen. Unter Vortexen wurden zu dem Transfektionsansatz 50 µl CaCl<sub>2</sub> und anschließend 500 µl 2x BBS (langsam) tropfend hinzugefügt. Nach einer 20-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Transfektionsansatz zu dem Kulturmedium gegeben, das nach 4 Stunden gewechselt wurde. 24 und 48 Stunden nach der Transfektion erfolgte die Abnahme des Überstandes mit einer Spritze und die sterile Filtration durch einen 45 µm Filter. Im Anschluss wurde jedes Mal eine Volumeneinheit *Lenti X Concentrator* zu drei Volumeneinheiten Virusüberstand gegeben. Der Ansatz musste mindestens 3 Stunden oder über Nacht bei 4 °C inkubieren, nachdem der letzte Virusüberstand abgenommen wurde. Im nächsten Schritt konnten die lentiviralen Viren für 45 Minuten bei 1 500 g und 4 °C pelletiert werden. Schließlich wurde das Pellet in 400 µl 1x PBS resuspendiert, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

### 2.3.6 Bestimmung des Virus-Titers

Die Konzentration infektiöser Viruspartikel konnte durch Titration in HEK293-T Zellen mit nachfolgender Durchflusszytometrie (engl. *fluorescence activated cell sorting*, FACS) bestimmt werden. In der FACS-Analyse werden die Zellen einerseits ihrer Größe und Granularität nach sortiert, andererseits aber auch nach GFP positiven Zellen, indem die Zellen mithilfe eines Lasers angeregt werden. Dadurch kann die Anzahl der Viruspartikel pro Milliliter Virussuspension berechnet werden. Hierzu wurden 5x 10<sup>4</sup> HEK293-T Zellen pro Vertiefung einer 24-*well*-Schale ausgesät. Die aufkonzentrierte Virussuspension wurde mit 1x PBS 1:10 verdünnt. Im Anschluss wurden in doppelter Ausführung 5, 10 und 4 µl dieser Verdünnung zu den Zellen gegeben und für 48 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Zur Vorbereitung der FACS-Analyse wurde das Medium verworfen und die Zellen 2-mal mit 1x PBS gewaschen. Die Zellen wurden durch eine Inkubation mit 300 µl 1x Trypsin für 5 Minuten bei 37 °C vereinzelt. Danach wurden die Zellen pelletiert

und in 500 µl 1x PBS resuspendiert. Schließlich konnte die Zellsuspension für die FACS-Analyse in 5 ml FACS-Röhrchen (*Falcon 5 ml Polystyarene Round-Bottom Tube*, Thermo Fisher Scientific Inc.) überführt werden. Zur Analyse diente der *FACS Canto II*. Mittels dem Programm *FACSDiva* erfolgte die Auswertung basierend auf folgender Formel:

$$\frac{TU}{ml} = \frac{F*N*D*1\ 000}{V},$$

wobei

*TU*: Transduktionseinheiten (*transduktion units*)

*F*: % GFP positive Zellen

*N*: Anzahl der HEK293-T Zellen

*D*: x-fache Verdünnung

*V*: Volumen mit dem transduziert wurde

### 2.3.7 Infektion von Calu-3 Zellen

Calu-3 Zellen wurden einen Tag zuvor 1:2 auf einer 6-*well*-Platte oder 12-*well*-Schale ausplattiert. 200-300 µl Lentivirus wurden pro Vertiefung zum Kulturmedium gegeben. Der Titer der Virussuspension lag in der Regel zwischen 100 000 000-300 000 000 TU/ml. Zur Erhöhung der Infektionsrate wurde das Kulturmedium zusätzlich mit 8 µg/ml Polybren versetzt und die Platten für 1 Stunde bei 952 g und 37 °C zentrifugiert.

## 2.4 Proteinbiochemische Methoden

### 2.4.1 Lyse von HEK293-T Zellen und Calu-3 Zellen

HEK293-T und Calu-3 Zellen wurden lysiert, um die Proben via *Western Blot* zu analysieren. Die Zellen wurden 2-mal mit Versene gewaschen und anschließend mit RIPA für 15 Minuten auf Eis inkubiert. RIPA selbst war mit 2 µg/ml Pepstatin A, 43 µg/ml PMSF und 10 µg/ml Leupeptin oder Complete-Tabletten (EDTA-frei) versetzt. Danach erfolgte die Überführung der Zellen in ein Reaktionsgefäß und Zentrifugation für 30 Minuten bei 20 000 g bei 4 °C, um die DNA und Zelltrümmer zu pelletieren. Der Überstand wurde mit 5x Lämmli-Probenpuffer 1:5 vermischt. Die Proben lagerten bei -20 °C.

### 2.4.2 Protein-Koimmunpräzipitation (RFP-Trap) mit HEK293-T Zellen

Die Protein-Koimmunpräzipitation diente der Bindung und Präzipitation von RFP-Fusionsproteinen in einem Zelllysat an Agarose-Kügelchen, die mit einem RFP gerichteten Einzeldomän-Antikörper gekoppelt sind. Sofern andere Proteine über eine Protein-Protein-Interaktion an dem Fusionsprotein gebunden sind, werden diese auch indirekt an die RFP-Trap gebunden und präzipitiert.

Die Lyse und Zentrifugation von HEK293-T Zellen erfolgte wie in 2.4.1 beschrieben. Die verwendeten Puffer waren hierbei RIPA oder IP Puffer, die mit 2 µg/ml Pepstatin A, 43 µg/ml PMSF und 10 µg/ml Leupeptin oder Complete-Tabletten (EDTA-frei) versehen waren. Von dem Überstand wurden 50 µl als Inputprobe abgenommen und mit 5x Lämmli-Probenpuffer 1:5 versetzt. Während der Zentrifugation des Lysats wurden 500 µl RIPA/IP mit 30 µl RFP-Trap vermischt. Die Agarose-Kügelchen (Beads) wurden für 1 Minute bei 1 000 g und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Beads wurden erneut in 500 µl RIPA/IP resuspendiert und zentrifugiert. Das Pellet wurde mit dem restlichen Überstand des Lysats vermischt und für 2 Stunden bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Nach der Inkubation konnten die Beads für 1 Minute bei 1 000 g und 4 °C pelletiert werden. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet wurde mit 500 µl RIPA/IP vermischt. Dann schloss sich eine weitere Zentrifugation an. Auf diese Weise wurde die Matrix 5-mal gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und die Agarose-Kügelchen in 80 µl 1x Lämmli-Probenpuffer resuspendiert. Die Proben lagerten bei -20 °C und konnten über *Western Blot*

Analyse ausgewertet werden. Dabei erfolgte die Normierung der Präzipitatproben in der Regel auf die Inputproben.

### **2.4.3 Western Blot**

Die *Western Blot* Analyse diente der größenabhängigen Auftrennung und der Übertragung von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran, um diese anschließend mit spezifischen Antikörpern zu detektieren und quantifizieren.

Die Auftrennung der Proteine anhand ihres Molekulargewichts erfolgte über eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit diskontinuierlichem Puffersystem. Das Gel für die SDS-PAGE wurde mit dem BioRad (München, Deutschland) Protean II-System gegossen und wies eine Dicke von 1,5 mm auf. Je nach Größe der zu trennenden Proteine konnte die Konzentration von Polyacrylamid im Trenngel zwischen 8 % und 10 % variieren. Die Gele wurden entsprechend der Tabelle 2.12 gegossen. Für den Größenvergleich der Proteine wurde der Proteinmarker *PageRuler Plus Pre-Stained Protein Ladder* (10-250 kDa) verwendet. Das Gel wurde mit jeweils 15 µl einer Probe und 10 µl Proteinmarker beladen. Die Elektrophorese erfolgte für 15 Minuten bei 100 V (Sammelgel) und dann für weitere 70 Minuten bei 150 V (Trenngel) in SDS-PAGE-Laufpuffer bei Raumtemperatur.

Im Anschluss wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (0,45 µm, GE Healthcare, München, Deutschland) übertragen. Für den Proteintransfer diente die Transfer-Kammer von BioRad (München, Deutschland), die entsprechend der Herstellerangaben verwendet wurde. Der Transfer erfolgte für 120 Minuten bei 400 mA in Transferpuffer bei Raumtemperatur. Zur Kühlung des Systems wurde ein Eisblock eingelegt. Nach dem Transfer wurden die Membranen in 5 % Milchpulver in TBS-T für 30 Minuten unter Schwenken geblockt. Anschließend inkubierten die Membranen in den entsprechenden Antikörpern über Nacht bei 4 °C unter Rotation (Tabelle 2.8). Hiernach wurden die Membranen 3-mal für 10 Minuten in TBS-T unter Schwenken gewaschen. Diese inkubierten sodann für 1 Stunde mit einem HRP-gekoppelten Zweitantikörper in PBS bei Raumtemperatur (Tabelle 2.9). Nach drei weiteren Waschschrritten konnten die HRP-Zweitantikörper mittels der ECL Methode (*WesternBright* Chemilumineszenz Substrat für Film) detektiert und mit dem *ChemiDoc XRS*-System und der Software *Quantity One* entwickelt werden. Die ECL-Methode wurde nach Angaben des

Herstellers angewandt. Die Quantifizierung der Signalintensität erfolgte mit dem Programm *ImageLab*.

**Tabelle 2.13: Herstellung von Trenngel und Sammelgel für SDS-PAGE.**

	Trenngel		Sammelgel
	8 %	10 %	
H <sub>2</sub> O (ml)	2,3	1,9	1,4
Gel 30 AA (ml)	1,3	1,7	0,3
1,5 Tris; pH 8,8 (ml)	1,3	1,3	-
1,0 Tris; pH 6,8 (ml)	-	-	0,3
100 % SDS (µl)	50	50	20
10 % APS (µl)	50	50	20
TEMED (µl)	4	4	1

## 2.4.4 Nachweis von Antigenen

### 2.4.4.1 Immunzytochemie

Die Zellen wurden für die Analyse mit einem konfokalen Mikroskop auf Deckgläschen (18 mm Durchmesser, Karl Hecht GmbH + Co. KG, Sondheim, Deutschland) ausplattiert und für 20 Minuten mit 4 % PFA in PBS bei Raumtemperatur fixiert. Zuvor waren die Deckgläschen mit 1 mg/ml Poly-L-Lysin in PBS für 20 Minuten bei Raumtemperatur beschichtet und danach 5-mal mit Wasser gewaschen worden. Nach der Fixierung der Zellen wurden diese 3-mal für je 10 Minuten mit kaltem 1x PBS unter Schwenken gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch die Zugabe von 0,1 % Triton-X in PBS für 3 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert. Hiernach erfolgte ein weiterer Waschschrift wie oben beschrieben. Für das Blocken unspezifischer Bindungsstellen wurden die Zellen für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Schwenken mit 2 % Pferdeserum in PBS inkubiert. Im Anschluss konnte der in 2 % HS in PBS verdünnte Erstantikörper (Tabelle 2.8) auf die Zellen gegeben werden. Nach einer Inkubation

über Nacht bei 4 °C wurde der überschüssige Antikörper in drei Waschschritten abgewaschen. Danach wurden die Zellen mit dem entsprechenden Sekundärantikörper in PBS für 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert (Tabelle 2.9). Im letzten Schritt wurden die Deckgläschen mit einem Tropfen *ProLong Diamond Antifade Mountant with Dapi* auf einen Objektträger (Karl Hecht GmbH + Co. KG, Sondheim, Deutschland) fixiert. Die Objektträger trockneten über Nacht bei Raumtemperatur und lagerten bei 4 °C. Während aller Inkubationszeiten wurden die Deckgläschen möglichst im Dunklen aufbewahrt. Die Analyse erfolgte schließlich mit einem konfokalen Mikroskop.

#### **2.4.4.2 Immunzytochemische Analyse von Paraffinschnitten**

Calu-3 Zellen wurden wie in 2.3.2 beschrieben differenziert. Anschließend wurden die Membranen ausgeschnitten und bei 4 °C über Nacht in 4 % PFA fixiert. In einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Membranen dehydratisiert, um sie schließlich in Paraffin einzubetten. Hiernach konnten die Membranen in Blöcke gegossen werden. Mit einem Mikrotom wurden 5 µm dicke Schnittpräparate erstellt. Die Schnitte wurden in ein warmes Wasserbad (50 °C) überführt, um gestreckt und auf Objektträger aufgezogen zu werden. Diese trockneten sodann auf einer 50 °C warmen Platte für mehrere Stunden. Die Objektträger wurden je nach Weiterverwendung des Antikörpers bei 42 °C oder 60 °C über Nacht gebacken. Für die spätere Färbung mussten die Schnitte entparaffiniert und hydratisiert werden. Dafür wurden die Objektträger durch eine absteigende Alkoholreihe geführt. Um die Epitope zu demaskieren, wurden die Objektträger entsprechend des Antikörpers in 1x TEC-Puffer in H<sub>2</sub>O in der Mikrowelle bei 360 Watt für 2-mal 10 Minuten oder in 1x DAKO-Puffer im Dampfgerar bei 98 °C für 30 Minuten gekocht. 5 Minuten betrug der zweimalige Waschgang der Objektträger. Bei der Benutzung von TEC-Puffer wurden die Schnitte in 1x TBS-T gewaschen, bei DAKO-Puffer wurde 1x PBS verwendet. Für den Gebrauch mancher Antikörper mussten die Schnitte zusätzlich proteolytisch behandelt werden. Diese wurden für 10 Minuten mit 2-3 Tropfen Trypsin-Gebrauchslösung in Wasser bei 37 °C inkubiert. Danach folgte ein weiterer Waschschriff in Wasser für 30 Sekunden und 2-mal 5 Minuten in 1x PBS/1x TBS-T. Um freie unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, mussten die Schnitte für 30 Minuten in Blockpuffer (DAKO-Puffer) oder in *Dako Protein Block* (TEC-Puffer) bei Raumtemperatur inkubiert werden. Danach erfolgte die Verdünnung der

primären Antikörper in dem Blockpuffer (DAKO-Puffer) oder in 1x PBS (TEC-Puffer) entsprechend der Tabelle 2.8 mit anschließendem Auftragen auf die Objektträger. Nach einer Inkubation bei 4 °C über Nacht wurden die Objektträger 3-mal in 1x TBS-T/1x PBS für 5 Minuten gewaschen. Nach einer Verdünnung der Sekundärantikörper in dem Blockpuffer (DAKO-Puffer) oder in 1x PBS (TEC-Puffer) inkubierten die Objektträger für 30 Minuten bei Raumtemperatur (Tabelle 2.9). Nach einem weiteren Waschschrift für 5 Minuten wurden die Objektträger für 1 Minute in ein DAPI-Färbegrad getränkt, um die DNA zu färben. Es erfolgte ein erneutes Waschen der Objektträger (1-mal kurz in PBS, dann 2-mal für 5 Minuten in PBS und schließlich 2-mal für 5 Minuten in ddH<sub>2</sub>O). Nach der Eindeckelung der Schnitte mit Fluromont G trockneten diese über Nacht bei Raumtemperatur. Die Analyse erfolgte mit einem konfokalen Mikroskop. Die Objektträger lagerten bei 4 °C.

## 2.5 Analyse einer *knockout*-Mauslinie

### 2.5.1 Organentnahmen von Mäusen

Für die durchgeführten Organentnahmen von Mäusen wurden die Tiere ausschließlich von qualifizierten Personen getötet. Diese Organentnahmen wurden unter der Nummer Org1088 bei der zuständigen Behörde (Behörde für Justiz und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg) angezeigt.

### 2.5.2 Bestimmung des Genotyps von Mäusen

Zur Bestimmung des Genotyps wurden 2 mm lange Spitzen der Mausschwänze in 50 µl *DirectPCR Tail* (VWR Life Science, Darmstadt, Deutschland), welches mit 0,2 mg/ml Proteinkinase A versetzt war, lysiert. Nach einer Inkubation über Nacht bei 55 °C unter leichtem Schütteln wurde die Proteinkinase A für 45 Minuten bei 85 °C inaktiviert. Im Anschluss wurde das Lysat für 1 Minute bei 20 000 g zentrifugiert und der Überstand für die PCR eingesetzt. Ein Reaktionsansatz bestand aus 1 µl Schwanzspitzenlysat, 2 µl 10x *CoralLoad PCR-Buffer*, 4 µl 5x *Q-Solution*, 1 µl 10 mM Vorwärtsprimer/10 mM Rückwärtsprimer, 0,4 mM dNTP und 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>. Zur Amplifikation wurden im Thermocycler nach einer initialen Denaturierung (1 Minute bei 95 °C) 40 Zyklen durchlaufen (Denaturierung: 30 Sekunden bei 95 °C, Primer-Hybridisierung: 30 Sekunden bei 59 °C, Elongation: 1 Minute bei 72 °C). Mit der finalen Elongation (5 Minuten bei 72 °C) konnten die PCR-Produkte durch eine Agarose-Gelelektrophorese ausgewertet werden. In Abschnitt 2.1.5.2 sind die verwendeten Oligonukleotide dargestellt.

### 2.5.3 Isolierung von Darmepithelzellen

Zur Isolierung von Darmepithelzellen wurde der Dünndarm aus der Maus isoliert, der Länge nach aufgeschnitten, vereinigt und für 15 Minuten in 0,04 % (v/v) Natriumhypochlorit in PBS inkubiert, um Darmbakterien abzutöten. Im Anschluss wurde der Darm in PBS gewaschen und in Solution B auf Eis für 15 Minuten inkubiert. Der Zusatz von DTT und EDTA in der Solution B führt zur Ablösung von den Epithelzellen. Nach der Inkubation wurde der Darm in PBS überführt und für 15 Sekunden gevortext, um schließlich die Epithelzellen in PBS zu lösen. Insgesamt dreimal inkubierte der Darm in Solution B mit anschließendem Vortexen. Die Pelletierung der Epithelzellen erfolgte durch eine Zentrifugation bei 700 g für 10 Minuten; das Pellet wurde mittels Membranfraktionierung weiterverarbeitet.

#### 2.5.4 Membranfraktionierung

Durch Membranfraktionierung konnten Membranproteine angereichert werden, um diese dann besser in der *Western Blot* Analyse detektieren zu können. Nach der Isolation von Lunge, Leber und Darm aus der Maus wurden diese in hypotonem Puffer, der mit 2 µg/ml Pepstatin A, 43 µg/ml PMSF und 10 µg/ml Leupeptin oder Complete-Tabletten versehen war, mit einem Ultraturrax oder durch Pottern lysiert. Das Lysat wurde für 10 Minuten bei 1 000 g und 4 °C zentrifugiert, sodass Zelltrümmer und die Nuclei pelletiert werden konnten. Nach der Überführung des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß konnte das Pellet erneut in hypotonem Puffer resuspendiert und zentrifugiert werden. Mit Vereinigung der Überstände erfolgte eine letzte Zentrifugation. Sodann bezeichnet man den Überstand als postnukleäre Fraktion. Diese wurde für 25 Minuten bei 36 600 g bei 4 °C zentrifugiert, um die zytosolische Fraktion von der Membranfraktion zu trennen. Dabei wurde die Membranfraktion pelletiert und zwei weitere Mal gewaschen, indem sie in hypotonem Puffer resuspendiert und für 25 Minuten bei 36 600 g bei 4 °C zentrifugiert wurde. Das Pellet wurde in Homogenisierungspuffer resuspendiert und mit 5x Lämmli-Probenpuffer versetzt. Von der postnukleären und zytosolischen Fraktion wurden jeweils Proben, die mit 5x Lämmli-Probenpuffer versetzt worden waren, für eine folgende *Western Blot* Analyse abgenommen. Zusätzlich wurden von allen drei Fraktionen jeweils Proben ohne 5x Lämmli-Probenpuffer für eine Proteinbestimmung abgenommen. Alle Proben lagerten bei -20 °C bis zur Analyse via *Western Blot*.

#### 2.5.5 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung der Membranfraktionierung erfolgte für die Proben, die ohne 5x Lämmli-Probenpuffer versetzt worden waren, durch eine Verdünnung mit Homogenisierungspuffer. Je 10 µl wurden auf eine 96 well-Platte aufgetragen. Zusätzlich wurden 100 µl Bradford Reagenz hinzugegeben und unter Schwenken für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte mit *Epoch Multi-Volume Spectrophotometer*-System bei 596 nm nach den Angaben des Herstellers. Zur genaueren Analyse der einzelnen Proteinmengen war es in der Regel erforderlich die Proben der Membranfraktionierung für die *Western Blot* Analyse durch Verdünnung mit 1x Lämmli-Probenpuffer auf ein Proteinlevel zu bringen.

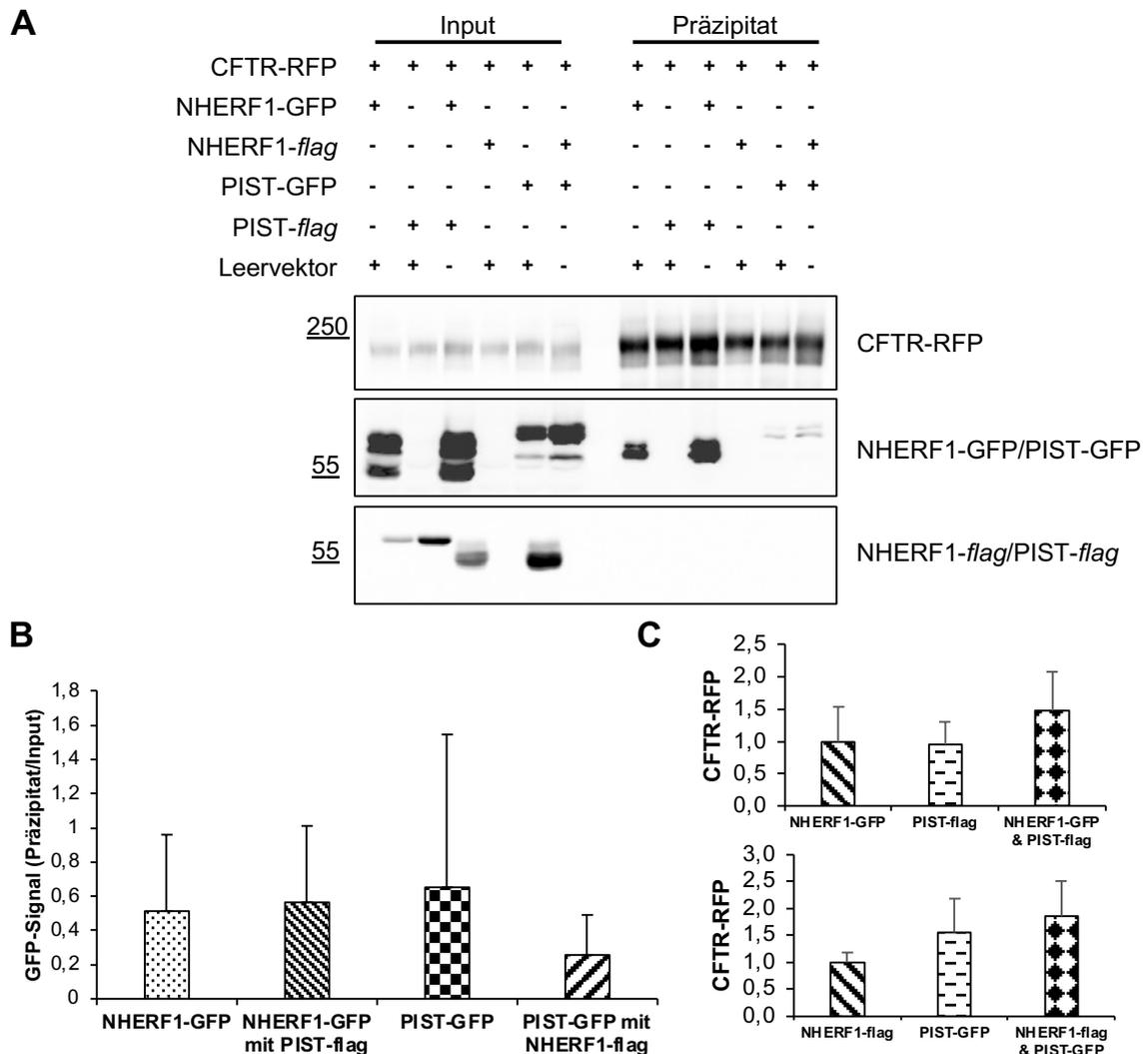
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Die Interaktion von CFTR mit PIST und NHERF1 in HEK293-T Zellen

Die Rolle von PIST ist vielfältig und scheint stark vom jeweiligen Interaktionspartner abhängig zu sein. Cheng et al. beschrieben PIST als einen Negativregulator für CFTR, dessen funktionaler Gegenspieler NHERF1 ist. Beide PDZ-Domänen-Proteine konkurrieren um die Bindung an CFTR (Abbildung 1.7) (Cheng et al. 2002, Cheng et al. 2004, Cheng et al. 2010b). Im Gegensatz dazu konnte im Zusammenhang mit anderen Membranproteinen (SSTR5 und  $\beta$ 1AR) gezeigt werden, dass PIST diese stabilisiert und die Interaktion von NHERF1 mit den Membranproteinen verstärkt (Bauch et al. 2014). In Anlehnung an Cheng et al. galt es zunächst, die Interaktion von PIST und NHERF1 mit CFTR in einem zellulären *in vitro* Modell, den HEK293-T Zellen, zu überprüfen (Cheng et al. 2002, Cheng et al. 2004).

Hierzu wurden HEK293-T Zellen mit Plasmiden für die Expression von CFTR-RFP und den jeweiligen Interaktionspartnern NHERF1 und PIST oder beiden transfiziert. Es wurden NHERF1-GFP und PIST-*flag* sowie in einem zweiten Versuchsansatz NHERF1-*flag* und PIST-GFP exprimiert. Die Zelllysate fanden einerseits Verwendung als Inputprobe, andererseits wurden diese mit einer Agarosematrix inkubiert, die immobilisierte Antikörper gegen mRFP enthielt und so mRFP-Fusionsproteine präzipitierte (RFP-Trap). Im Rahmen der Quantifizierung in Abbildung 3.1 B erfolgte die Normierung der Präzipitatproben auf die Inputproben (Abbildung 3.1). Die Ermittlung der CFTR-Proteinmenge erfolgte durch die Quantifizierung der Inputproben, um anschließend die relative Abweichung zu den Proben, in denen NHERF1 alleine exprimiert war, zu berechnen (Abbildung 3.1 C). Die Koimmunpräzipitation der *flag* markierten Proteine stellte sich als schwierig heraus. Obwohl im Input in der *Western Blot* Analyse ein deutliches Signal detektiert werden konnte, fiel das Signal im Präzipitat deutlich schwächer aus. Aufgrund des - trotz des langen Belichtungszeitraums - schwachen Signals, wurden für die weitere Quantifizierung nur die GFP-Werte verwendet. Die Koimmunpräzipitation von jeweils NHERF1-GFP oder PIST-GFP in Kombination mit CFTR-RFP zeigte, dass beide Proteine mit CFTR-RFP interagierten. NHERF1-GFP konnte auch ohne PIST-*flag* kopräzipitiert werden und umgekehrt (Abbildung 3.1 A). Somit war weder NHERF1 noch PIST abhängig von dem jeweilig anderen, um mit CFTR zu

interagieren. Die Überexpression beider Interaktionspartner (NHERF1 & PIST) veränderte die Menge an kopräzipitierten NHERF1-GFP nicht. Jedoch konnte weniger PIST-GFP kopräzipitiert werden, wenn NHERF1-*flag* ebenfalls überexprimiert wurde. Zwar ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen, doch war eine klare Tendenz zu erkennen (Abbildung 3.1 B).

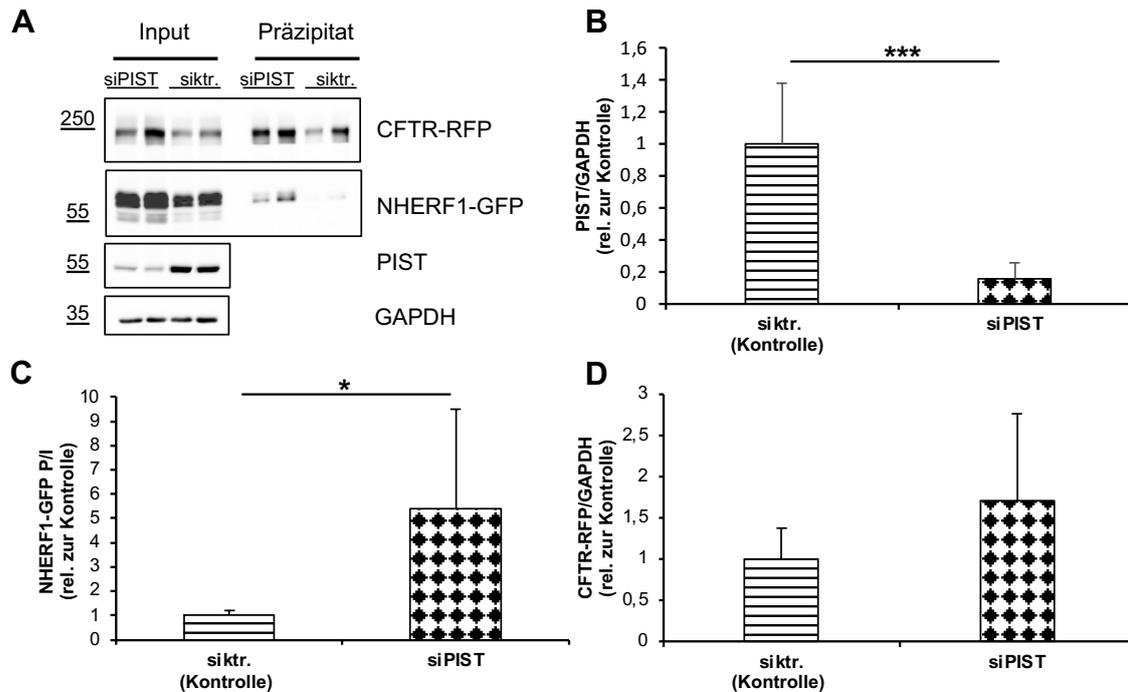


**Abbildung 3.1 PIST und NHERF1 interagieren mit CFTR.**

**A** Hierzu wurden HEK293-T Zellen mit Plasmiden für die Expression von CFTR-RFP und den jeweiligen Interaktionspartnern NHERF1 (+Leervektor) und PIST (+Leervektor) oder beiden transfiziert. Hierbei war PIST mit *flag* und NHERF1 mit GFP markiert und umgekehrt. Anschließend wurden die Zellen lysiert. Eine Inputprobe wurde entnommen und das restliche Lysat wurde mit der RFP-trap Matrix inkubiert. Eine *Western Blot* Analyse wurde durchgeführt. **B** Im Rahmen der Quantifizierung wurden die Signalintensität der Präzipitatproben auf die Inputproben normiert. PIST und NHERF1 interagierten jeweils mit CFTR und ließen sich auch ohne den anderen Interaktionspartner kopräzipitieren. Die Menge an kopräzipitiertem NHERF1 unterschied sich auch in Anwesenheit des kotransfizierten PIST nicht. PIST hingegen konnte weniger präzipitiert werden, wenn NHERF1 kotransfiziert wurde. Allerdings stellte sich dieser Unterschied nicht als signifikant dar. **C** Es wurde die Signalintensität für die Proteinmenge von CFTR-RFP in der Inputprobe quantifiziert und die relative Abweichung zu den Proben, in denen NHERF1 alleine exprimiert war, berechnet. Die Proteinmenge von CFTR-RFP war durch die Überexpression von NHERF1, PIST oder beiden Plasmiden im Input nicht signifikant verändert. (ungepaarter t-test, 2 Seiten; N=4; Standardabweichung)

Dementsprechend verstärkte PIST nicht die Interaktion von CFTR mit NHERF1 wie es im Zusammenhang mit SSTR5 gezeigt wurde (Bauch et al. 2014). Vielmehr wurde die Interaktion von PIST mit CFTR durch NHERF1 abgeschwächt. Des Weiteren war die Proteinmenge von CFTR-RFP durch die Überexpression von NHERF1, PIST oder beiden Plasmiden nicht verändert (Abbildung 3.1 C).

Zur weiteren Untersuchung des Einflusses von PIST auf die Interaktion von NHERF1 mit CFTR wurde in HEK293-T Zellen PIST im Rahmen eines *knockdown*-Experiments herunterreguliert. Ich nutzte die RNA Interferenz (RNAi), die einen regulatorischen Mechanismus eukaryotischer Zellen darstellt, um Gene sequenzspezifisch zu inaktivieren. HEK293-T Zellen wurden mit doppelsträngiger *small interfering* RNA (siRNA), die komplementär zu einem kurzen Abschnitt der PIST-mRNA war, transfiziert, um die Synthese von PIST zu inhibieren (Chen und Zhaori 2011, Dominska und Dykxhoorn 2010, Kim und Rossi 2008). Die verwendete siRNA-Kontrolle codierte eine zufällige, nicht gegen PIST gerichtete Sequenz. Am 3. Tag nach der ersten Transfektion erfolgte eine weitere mit Expressionsvektoren für NHERF1-GFP und CFTR-RFP. Schließlich wurden die Zellen am 5. Tag lysiert. Nach Entnahme einer Inputprobe wurden die RFP-Fusionsproteine im restlichen Lysat mit Hilfe der RFP-Trap immunpräzipitiert. Die Analyse erfolgte durch *Western Blot* mit spezifischen Antikörpern (Abbildung 3.2 A). Um die Effektivität der siRNA für PIST zu überprüfen, wurde auf das Haushaltsprotein GAPDH normiert und die Negativkontrolle auf einen Wert von 100 % gesetzt. Durch den Einsatz von siRNA konnte die PIST-Proteinmenge auf circa 15 % reduziert werden (Abbildung 3.2 B). Die Ermittlung der NHERF1-Proteinmenge erfolgte durch die Normierung der Präzipitátprobe auf die Inputprobe sowie die Berechnung der relativen Abweichung zur Kontrolle (siktr.). Der *knockdown* von PIST führte zu einem signifikanten Anstieg in der Interaktion von NHERF1-GFP mit CFTR-RFP (Abbildung 3.2 C). NHERF1 und PIST konkurrieren somit um die Bindung an CFTR. Zusätzlich wurde die Proteinmenge von CFTR-RFP im Zelllysát bestimmt, indem auf das Haushaltsprotein GAPDH normiert und die relative Abweichung zur Kontrolle (siktr.) berechnet wurde. Ein *knockdown* von PIST führte zu einer Zunahme von CFTR, wobei diese jedoch nicht signifikant ausfiel (Abbildung 3.2 D).



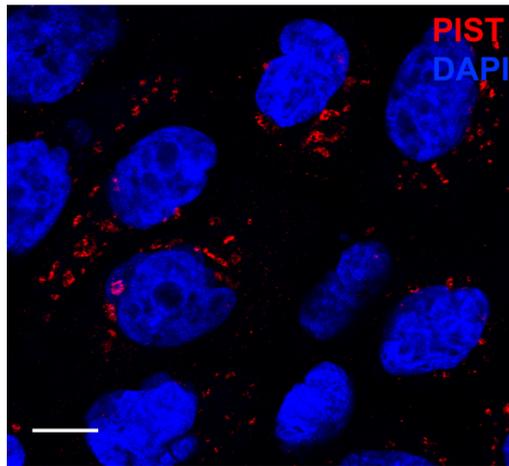
**Abbildung 3.2 PIST und NHERF1 konkurrieren um CFTR.**

**A** In HEK293-T Zellen wurde die Proteinmenge von PIST über die Applikation von siRNA, die gegen PIST gerichtet war, reduziert. Als Negativkontrolle (siktr.) diente eine siRNA, die eine nicht gegen PIST gerichtete Sequenz codierte. Am 3.Tag wurden die Zellen mit Plasmiden für die Expression von CFTR-RFP und NHERF1-GFP transfiziert und am 5. Tag schließlich lysiert. Nach der Entnahme einer Inputprobe wurden die Lysate mit einer Agarosematrix, die RFP-Fusionsproteinen bindet, inkubiert und durch *Western Blot* analysiert. **B** Es wurde auf das Haushaltsprotein GAPDH normiert und die Kontrolle auf einen Wert von 100 % gesetzt. Durch den Einsatz von siRNA konnte die PIST-Proteinmenge auf circa 15 % reduziert werden. **C** Die Präzipitatproben wurden auf die Inputproben normiert (P/I) und die relative Abweichung zur Kontrolle (siktr.) wurde berechnet. Die Interaktion von NHERF1-GFP mit CFTR-RFP war bei einem *knockdown* von PIST signifikant erhöht. **D** CFTR-RFP wurde auf das Haushaltsprotein GAPDH normiert und die relative Abweichung zur Kontrolle wurde berechnet. Die Proteinmenge von CFTR-RFP unterschied sich zwar bei *knockdown* von PIST zur Negativkontrolle, war allerdings nicht signifikant erhöht. (ungepaarter t-test, 2 Seiten; N=3; Signifikanzlevel: \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ; Standardabweichung)

## 3.2 Die Rolle von PIST in dem *in vitro* Modell der Calu-3 Zellen

### 3.2.1 Immunzytochemischer Nachweis des endogenen PIST in Calu-3 Zellen und die Differenzierung der Calu-3 Zelllinie

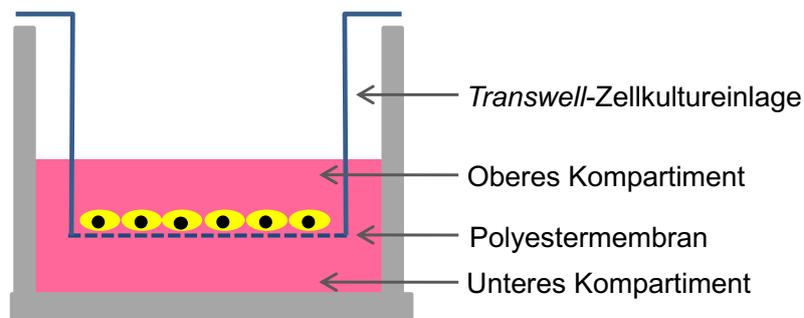
Um die Rolle von PIST im Kontext mit CFTR genauer aufzuschlüsseln, wurde ein weiteres *in vitro* Modell etabliert. Die ausgewählte Calu-3 Zelllinie (*human lung adenocarcinoma*) ist in der Forschung an zystischer Fibrose sehr etabliert und exprimiert sowohl PIST als auch CFTR endogen (Abbildung 3.3.) (MacVinish et al. 2007).



**Abbildung 3.3 Calu-3 Zellen exprimieren endogenes PIST.**

Calu-3 Zellen wurden mit 4 % PFA fixiert und durch Immunzytochemie für das Protein PIST (rot), welches endogen in der Zelllinie vorhanden ist, gefärbt. (Skalierung: 10  $\mu\text{m}$ )

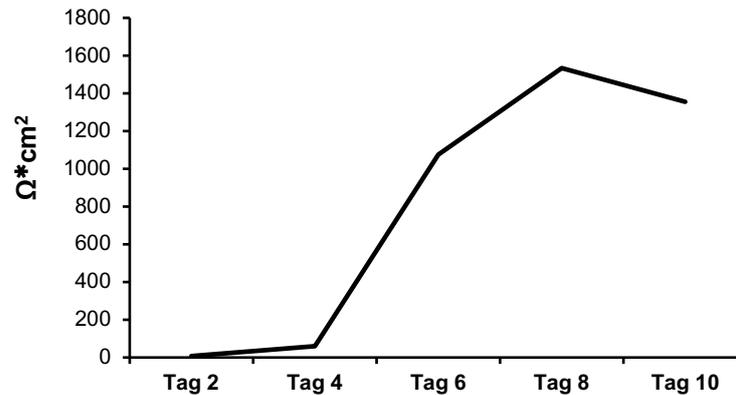
Im ersten Schritt galt es Calu-3 Zellen zu differenzieren, um das Lungenepithel-Modell zu optimieren. Hierzu wurden Calu-3 Zellen auf eine Polyester membran der *Costar Transwells* ausgesät, flüssigkeitsbedeckt kultiviert und für 10 Tage differenziert, genauer beschrieben in Kapitel 2.3.2 (Abbildung 3.4).



**Abbildung 3.4 Aufbau der *Costar Transwells*.**

$1 \times 10^5$  Calu-3 Zellen wurden in dem oberen Kompartiment ausgesät. Die Membran aus Polyester hatte eine Porengröße von 0,4  $\mu\text{m}$  und einen Durchmesser von 1,2 cm. Durch regelmäßige Mediumwechsel konnten die Zellen über einen Zeitraum von 10 Tagen differenzieren.

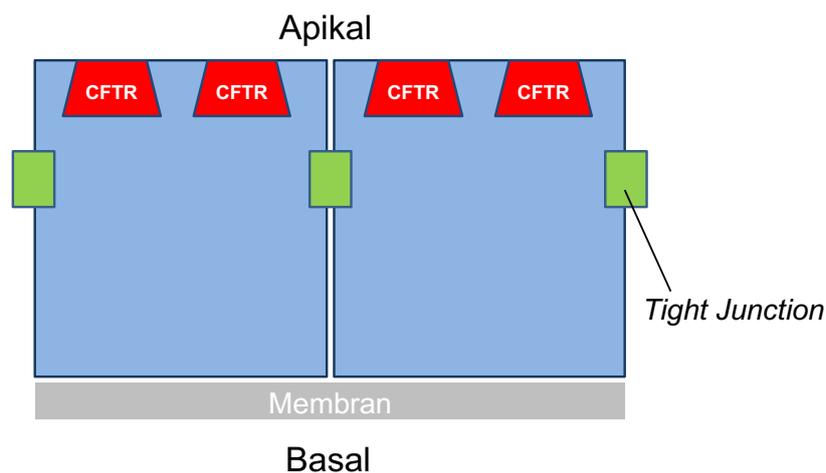
Innerhalb des Differenzierungsprozesses bilden sich unter anderem *Tight Junctions*, ein apikaler und basaler Pol in der Zelle, und ein einschichtiger Zellrasen (Kreft et al. 2015). Dabei lässt sich der Grad der Differenzierung anhand des steigenden transepithelialen Widerstandes (engl. *Transepithelial Electrical Resistance*, TEER) messen. Ein TEER größer als 1 000  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ , ist ein Hinweis auf eine fortgeschrittene Differenzierung (Grainger et al. 2006). Zur Überwachung und Überprüfung der Differenzierung erfolgte die Messung des TEER mit dem Messgerät *Millicell-ERS* (Abbildung 3.5).



**Abbildung 3.5** Der transepitheliale Widerstand von Calu-3 Zellen steigt im Verlauf der Differenzierung auf über 1 000  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ .

Beispielhaft wurde die Differenzierung anhand der Messung des transepithelialen Widerstands eines *Transwells* dargestellt. Als Messgerät wurde das *Millicell-ERS* von *Millipore/Merck* (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Der TEER stieg im Verlauf der 10 Tage deutlich über 1 000  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  an. Ein TEER größer als 1 000  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  ist ein Hinweis auf eine fortgeschrittene Differenzierung (Grainger et al. 2006).

Der transepitheliale Widerstand von Calu-3 Zellen stieg im Verlauf der Differenzierung über 1 000  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  (Abbildung 3.5). Durch Aufstellung einer Zeitreihe konnte die Differenzierung zudem mikroskopisch verifiziert werden. Zur Veranschaulichung ist ein Modell differenzierter Calu-3 Zellen in Abbildung 3.6 dargestellt.

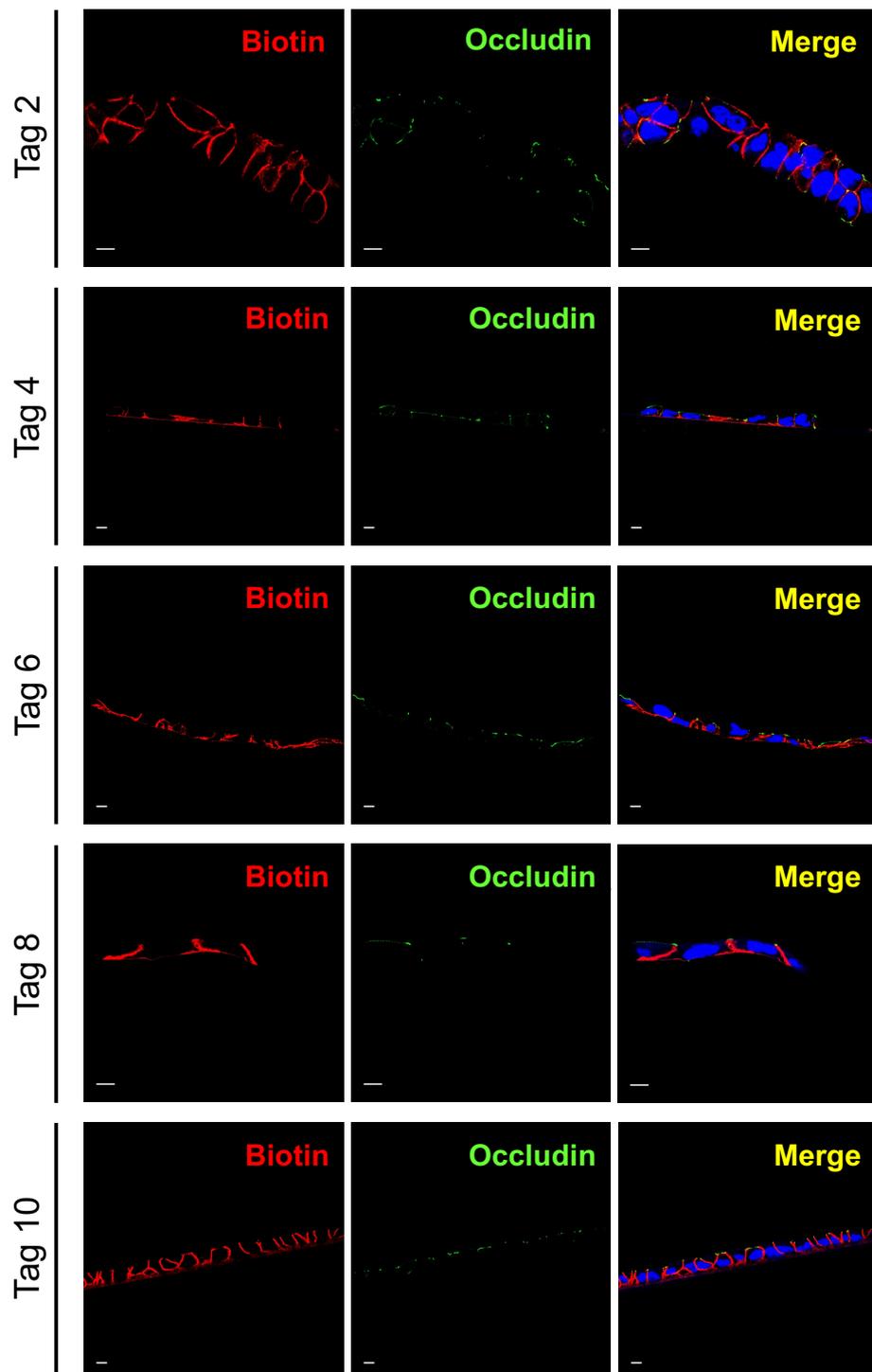


**Abbildung 3.6** Modell differenzierter Calu-3 Zellen.

Indem die Zellen auf einer Polyestermembran der *Costar Transwells* ausgesät werden, differenzieren die Calu-3 Zellen. Die Differenzierung der Zellen definiert sich unter anderem über einen einschichtigen Zellrasen, einen apikalen und basalen Pol sowie die Ausbildung von *Tight Junctions*. CFTR ist hauptsächlich an der apikalen Plasmamembran lokalisiert.

Nach Aussaat erfolgte an Tag 2, 4, 6, 8 und 10 die Inkubation der Calu-3 Zellen mit einem Biotinylierungsreagenz von der basolateralen Seite, das funktionsfähige *Tight Junctions* nicht durchtreten kann (Zorn-Kruppa et al. 2018). Anschließend

wurde Occludin, ein Marker für *Tight Junctions*, immunzytochemisch angefärbt, um den Grad der Differenzierung zu bestimmen (Abbildung 3.6) (Guo et al. 2018). Biotin wurde mit Hilfe von einem fluoreszierenden Streptavidin-Konjugat (*Texas Red*) angefärbt. Für die verwendeten Primärantikörper wurden entsprechende Isotypkontrollen durchgeführt, um die Spezifität und das Ausmaß des Hintergrundsignals zu bestimmen. Es war zu beobachten, dass die Calu-3 Zellen im Verlauf der zehn Tage einen einschichtigen Zellrasen bilden und polarisieren. Am 2. Tag zeigten die Zellen noch keine klare Ausbildung der *Tight Junctions*, wo hingegen am 10. Tag ein deutlicher apikaler und basolateraler Pol zu erkennen war (Abbildung 3.7).

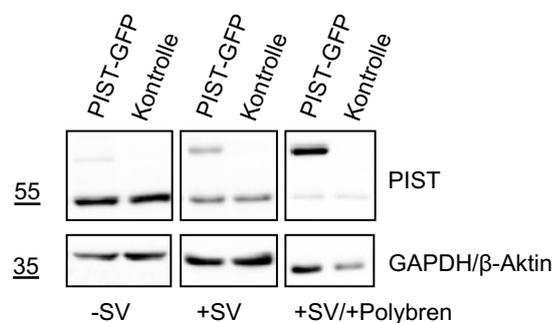


**Abbildung 3.7 Calu-3 Zellen differenzieren in einem Zeitraum von 10 Tagen aus.**

Calu-3 Zellen wurden an Tag 2, 4, 6, 8 und 10 mit 4 % PFA fixiert und Paraffin eingebettet, nachdem sie mit einer Zelldichte von  $1 \times 10^5$  Zellen in 500  $\mu$ l auf einer Polyestermembran der *Costar Transwells* ausgesät worden waren. Vor dem Fixieren wurde die basolaterale Seite der Membranen für 10 Minuten mit einem Biotinylierungsreagenz inkubiert. Später wurden die Schnitte in einer Immunzytochemie für Occludin (grün) und Biotin (rot) gefärbt. Biotin wurde mit Hilfe von einem fluoreszierenden Streptavidin-Konjugat (*Texas Red*) angefärbt. **Tag 2 –Tag 4** zeigte undifferenzierte Calu-3 Zellen, die noch keinen apikalen und basalen Pol gebildet haben. Occludin war in den Zellzwischenräumen noch diffus verteilt. Der einschichtige Zellrasen war noch nicht voll ausgebildet. **Tag 6 –Tag 8** Der apikale und basale Pol war zunehmend stärker ausgeprägt. Biotin konnte nicht mehr durch funktionsfähige *Tight Junctions* durchtreten. Der einschichtige Zellrasen wurde immer dichter. **Tag 10** Es war deutlich zu erkennen, dass Biotin aufgrund funktionsfähiger und apikal verteilter *Tight Junctions* nicht mehr an die apikale Seite der Zelle gelangen konnte. (Skalierung: 10  $\mu$ m)

### 3.2.2 Überexpression bzw. *knockdown* von PIST mittels shRNA im Rahmen von lentiviraler Infektion

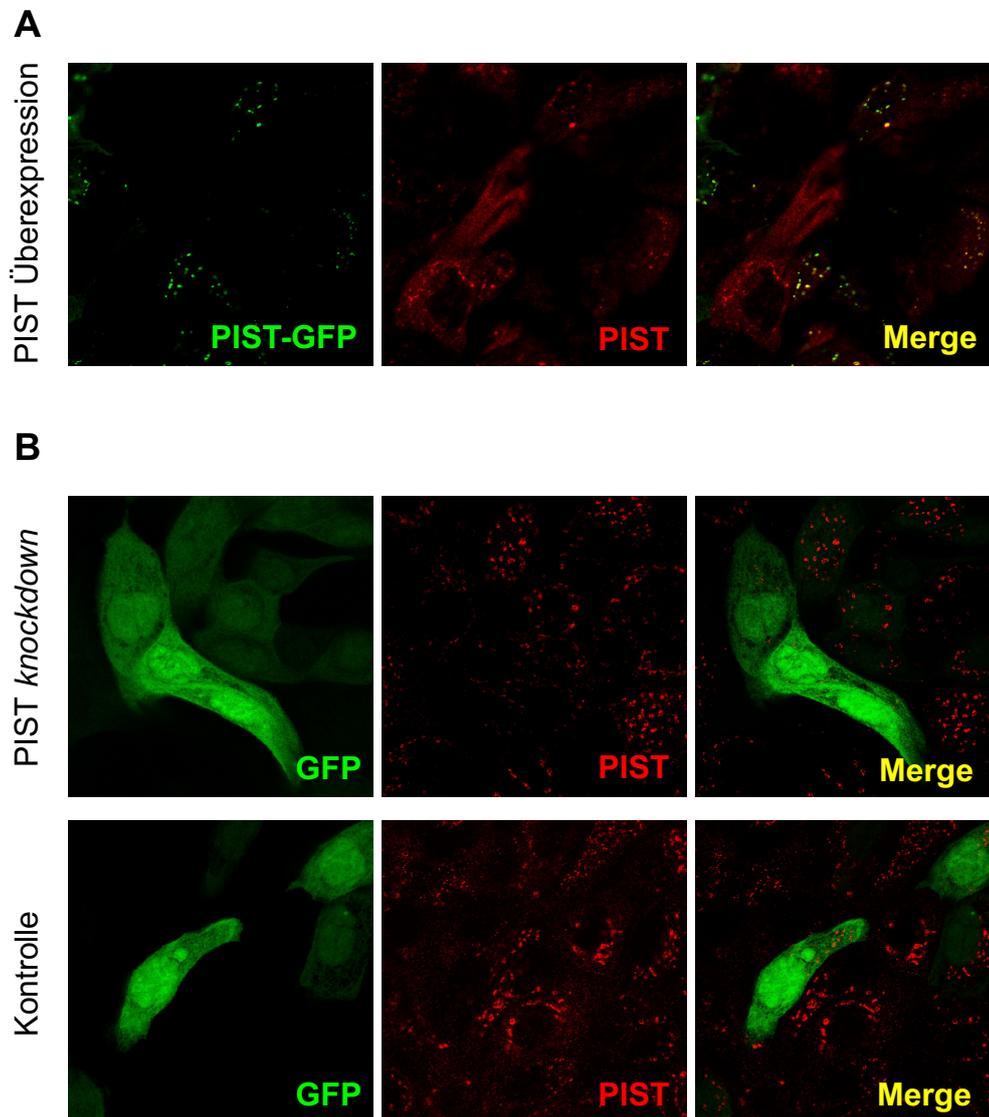
In einem weiteren Schritt galt es zunächst PIST in Calu-3 Zellen mittels lentiviraler Infektion zu überexprimieren oder die PIST-Proteinmenge zu reduzieren. Für den *knockdown* von PIST erfolgte eine Infektion der Calu-3 Zellen mit einem viralen Vektor, welcher einerseits GFP und andererseits eine *short hairpin* RNA (shRNA) für PIST exprimiert. ShRNAs werden im Zytosol über das Protein Dicer in *small interfering* RNA (siRNA) prozessiert, die in diesem Fall die post-transkriptionelle Proteinbiosynthese von PIST inhibieren (Dominska und Dykxhoorn 2010). Die shRNA-Kontrolle codierte eine nicht gegen PIST gerichtete shRNA-Sequenz. Die lentivirale Infektion mit dem Überexpressionsvektor führte zur Expression von einem Fusionsprotein (PIST-GFP); während die Negativkontrolle nur für GFP codierte. Die anfängliche Transduktion stellte sich als ineffizient heraus. Eine mögliche Ursache konnte die natürliche Mukusproduktion von Calu-3 Zellen sein, die die Zellen vor Transfektion und Transduktion besonders schützen (Grainger et al. 2006, Marin et al. 2013). Daher wurden die Calu-3 Zellen vor der Infektion mindestens 2 Wochen in Kulturmedium, welches mit Simvastatin (SV) versetzt war, kultiviert. Simvastatin führt zur Hemmung der  $\beta$ HMG-CoA-Reduktase, wodurch die Mukusproduktion reduziert werden kann (Marin et al. 2013). Darüber hinaus wurde bei der Infektion von Calu-3 Zellen das Kulturmedium zusätzlich mit Polybren, welches ein kationisches Polymer ist, versetzt, um die Infektionsrate zu steigern (Denning et al. 2013). Am 4. Tag der Infektion erfolgte die Lyse der Zellen und anschließend die Analyse via *Western Blot* (Abbildung 3.8).



**Abbildung 3.8 Die Infektionsrate von Calu-3 Zellen kann mittels Simvastatin und Polybren um das 7-fache gesteigert werden.**

Calu-3 Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, die zur Überexpression von PIST-GFP führten. Die Negativkontrolle codierte nur GFP. Die Zellen wurden 4 Tage nach Infektion lysiert und durch *Western Blot* analysiert. Calu-3 Zellen wurden zunächst ohne jegliche Vorbehandlung mit Lentiviren infiziert. In einem weiteren Schritt wurden Calu-3 Zellen 2 Wochen lang vor Infektion mit SV behandelt. Zuletzt wurde das Kulturmedium während der Infektion mit Polybren versetzt. Die Kombination aus SV-Behandlung und dem Einsatz von Polybren erhöhte die Infektionsrate um das 7-fache.

Insgesamt konnte die Infektionsrate der Calu-3 Zellen durch die Behandlung mit Simvastatin und der Anwendung von Polybren um das 7-fache gesteigert werden. Daraufhin wurden die infizierten Zellen mit 4 % PFA fixiert und in einer Immunzytochemie für PIST und DAPI gefärbt. Es folgte eine Analyse der Schnitte mittels konfokaler Mikroskopie (Abbildung 3.9).



**Abbildung 3.9 Calu-3 Zellen weisen trotz *knockdown* ein PIST-Signal auf.**

PIST wurde in Calu-3 Zellen durch lentivirale Infektion entweder überexprimiert (A) oder herunterreguliert (B). Anschließend wurden die Calu-3 Zellen in 4 % PFA fixiert und PIST (rot) immunzytochemisch angefärbt. Dargestellt sind in dieser Abbildung eine Überexpression sowie ein *knockdown* von PIST und die Negativkontrolle. **A** Der PIST-Antikörper erkannte PIST spezifisch, da der Antikörper endogenes PIST sowie PIST-GFP anfärbte. In der Überlagerung stellte sich PIST-GFP daher gelb dar. **B** PIST ließ sich trotz *knockdown* in den infizierten Calu-3 Zellen nachweisen.

Zunächst konnte die Spezifität des PIST-Antikörpers überprüft werden. Hierzu wurde einerseits das PIST-GFP Signal (grün) der lentiviralen Infektion (Überexpression) und andererseits PIST, welches immunzytochemisch (rot) gefärbt

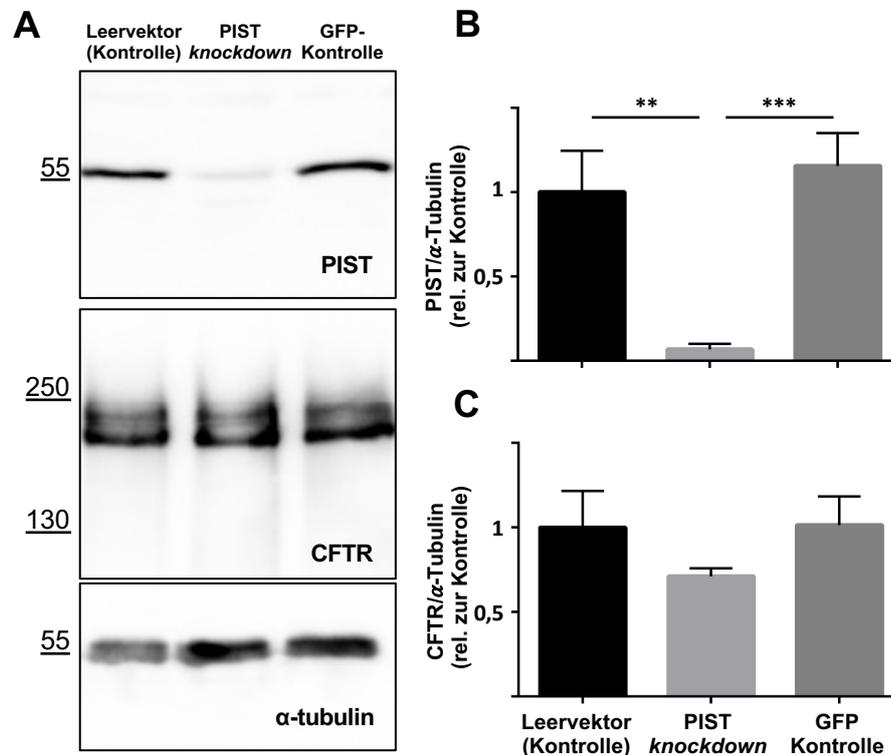
worden war, mittels konfokaler Mikroskopie detektiert. Anschließend erfolgte die Zusammenführung der jeweiligen Bilder, sodass sich eine Überlagerung beider Signaldetektionen gelb darstellt. Im *merge* Bild in Abbildung 3.9 A färbte der PIST-Antikörper nicht nur endogenes PIST (rot), sondern auch PIST-GFP (gelb). Somit konnte die Spezifität des PIST-Antikörpers verifiziert werden. In der konfokalen Mikroskopie zeigte sich weiterhin anhand des GFP-Signals im Rahmen des *knockdowns* von PIST und der Negativkontrolle, dass Calu-3 Zellen zwar erfolgreich infiziert wurden, die Anzahl der infizierten Zellen dennoch weiterhin zu gering ausfiel. Darüber hinaus war es fraglich, ob die shRNA PIST ausreichend herunterregulierte, da infizierte Zellen mit der shRNA für PIST weiterhin ein Signal für PIST aufwiesen (Abbildung 3.9 B).

### 3.2.3 *Knockdown* von PIST mittels der CRISPR/Cas-Methode

Aufgrund des geringen Erfolges eines *knockdowns* von PIST in Calu-3 Zellen mittels shRNA, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, wurden PIST-defiziente Zellen, in denen PIST mittels der CRISPR/Cas-Methode (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) herunterreguliert wurde, in der Arbeitsgruppe durch Prof. Kreienkamp etabliert. Hierzu wurden HEK293-T Zellen zur Produktion von Lentiviren mit einem lentiviralen Crispr Vektor, der eine *single guide* RNA (sgRNA) mit der Zielsequenz TTCTAATTGGACCAACACCT im Exon 5 des humanen GOPC-Gens exprimiert (crRNA2; in pLentiCRISPRv2), transfiziert. Die Transfektion erfolgte gemeinsam mit dem Verpackungsvektor, psPAX.2, und pMD2.G, welches für ein Hüllprotein des *vesicular stomatitis virus* (VSVg) codiert (Siehe Kapitel 2.3.5). Der gewonnene Virus wurde für die Infektion von Calu-3 Zellen verwendet. Als Kontrolle diente ein lentiviraler Crispr Vektor, der einerseits keine sgRNA trug oder andererseits EGFP exprimiert. Anhand des GFP-Signals konnte eine Infektionsrate von 40-50 % ermittelt werden. Auch nach mehrmaligen Passagieren der Calu-3 Zellen zeigte sich ein stabiles GFP-Signal. In einem weiteren Schritt wurden die infizierten Zellen über eine Puromycin-Resistenz selektiert. Diese Zellen fanden dann für die anschließenden Experimente Verwendung.

Zur Bestätigung eines effizienten *knockdowns* von PIST erfolgte die Lyse der Calu-3 Zellen und anschließende Analyse via *Western Blot* (Abbildung 3.10 A). Dabei wurde die Proteinmenge von PIST, CFTR und  $\alpha$ -Tubulin quantifiziert. PIST und CFTR wurden auf das Haushaltsprotein  $\alpha$ -Tubulin normiert und die relative

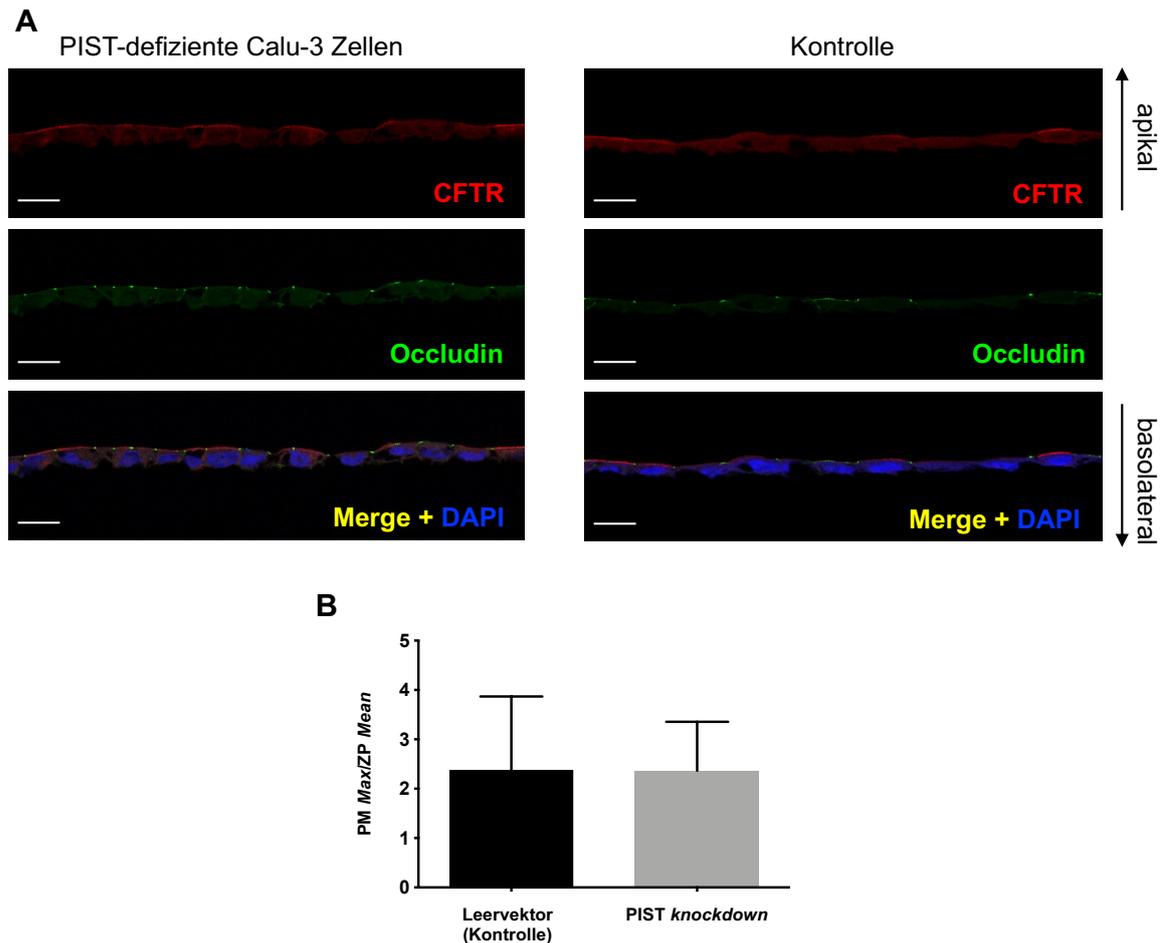
Abweichung zur Kontrolle (Leervektor) wurde berechnet. Eine signifikante Reduktion der Expression von PIST konnte durch die CRISPR/Cas-Methode erzielt werden. Es verblieb eine restliche Expression von 7 % im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 3.10 B). Somit konnten PIST-defiziente Calu-3 Zellen erfolgreich etabliert werden. Dahingegen war die CFTR-Expression bei einem *knockdown* von PIST nicht signifikant verändert (Abbildung 3.10 C).



**Abbildung 3.10 Die Expression von PIST ist durch die CRISPR/Cas-Methode auf 7 % reduziert.** **A** Calu-3 Zellen wurden mit lentiviralen CRISPR/Cas9 Vektoren infiziert, die eine sequenzspezifische sgRNA für PIST trugen. Zur Kontrolle wurde ein Leervektor, sowie eine Expressionskassette für GFP verwendet. Nach einer stabilen Infektion mit dem lentiviralen Plasmid wurden die Calu-3 Zellen lysiert und die Proteinmenge von PIST, CFTR und  $\alpha$ -Tubulin durch *Western Blot* analysiert. **B und C** PIST und CFTR wurden auf  $\alpha$ -Tubulin normiert. Dabei wurde die relative Abweichung zur Kontrolle (Leervektor) berechnet. Die PIST-Proteinmenge konnte um 93 % reduziert werden, wo hingegen die CFTR-Expression nicht signifikant verändert war (\*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ ;  $N=3$ , ANOVA, gefolgt von *Tukey's multiple comparisons test*). Die Experimente wurden zum Teil von Prof. Kreienkamp durchgeführt.

### 3.2.4 Die immunzytochemische Analyse von CFTR in differenzierten Calu-3 Zellen bei *knockdown* von PIST

Nach 10 Tagen Differenzierung erfolgte die Fixierung der PIST-defizienten Calu-3 Zellen und der Negativkontrolle (Leervektor). Mittels Immunzytochemie wurden CFTR, Biotin und Occludin angefärbt und im konfokalen Mikroskop (Sp5 von Leica) analysiert (Abbildung 3.11).



**Abbildung 3.11 Die CFTR-Verteilung in PIST-defizienten Calu-3 Zellen unterscheidet sich nicht im Vergleich zur Kontrolle.**

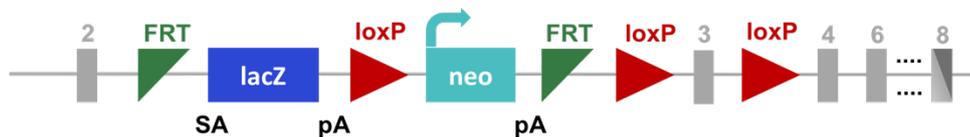
PIST-defiziente Calu-3 Zellen und nur mit dem Leervektor infizierte Zellen (Kontrolle) wurden differenziert und nach 10 Tagen in 4 % PFA fixiert. In der Immunzytochemie wurden CFTR (rot), Occludin (grün) und DAPI (blau) angefärbt. Die Schnitte wurden mit einem konfokalen Mikroskop analysiert und mittels der Software ZEN ausgewertet. Insgesamt wurden jeweils 34 Zellen ausgewertet. **A** CFTR war hauptsächlich an der apikalen Plasmamembran lokalisiert. **B** Die CFTR-Verteilung war in PIST-defizienten Calu-3 Zellen im Vergleich zur Kontrolle nicht verändert. (Skalierung: 20  $\mu\text{m}$ )

Aufgrund der Färbung von Biotin und Occludin konnte eindeutig die apikale Plasmamembran identifiziert werden. CFTR war in PIST-defizienten Calu-3 Zellen und in der Kontrollgruppe an der apikalen Plasmamembran lokalisiert. Es zeigte sich kein Unterschied in der CFTR-Verteilung (Abbildung 3.11 A). Um diese Beobachtung zu bestätigen, wurde die Proteinverteilung von CFTR quantitativ ausgewertet. Zur Auswertung diente die Software ZEN. Hierbei wurde ein linearer Bereich von Interesse mit einer Länge von 10  $\mu\text{m}$  und einer Breite von 2,3  $\mu\text{m}$  festgelegt. Weiterhin erfolgte eine Unterteilung dieses Bereiches in zwei Subregionen, der Plasmamembran (PM) und dem Zytoplasma (ZP). Danach fand eine Normierung des Maximalwertes im Bereich der Plasmamembran auf den

Durchschnittswert im Bereich des Zytoplasmas statt. Die quantitative Auswertung bestätigte die zuvor erwähnte Beobachtung. CFTR war in PIST-defizienten Zellen ähnlich verteilt wie in der Kontrollgruppe (Abbildung 3.11 B).

### 3.3 Die Analyse des CFTR-Proteinlevels in einer PIST-knockout-Mauslinie

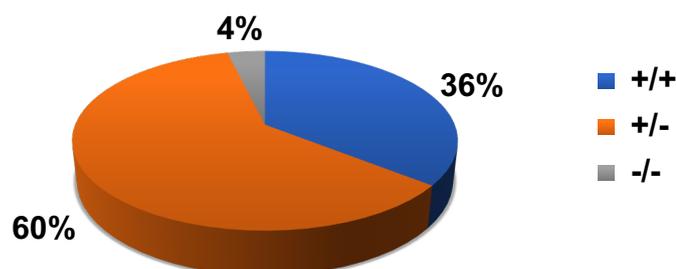
Im Anschluss an die *in vitro* Experimente galt es den Effekt von PIST auf CFTR *in vivo* zu analysieren. Zu diesem Zweck wurde zuvor in der Arbeitsgruppe eine PIST-knockout-Maus (C57BL/6-Gopc<sup>Tm1a</sup>-Mauslinie) nach dem *knockout-first* Prinzip generiert. Ein *targeting* Vektor mit einer *knockout-first* Kasette wurde über homologe Rekombination in das Genom einer Maus mit dem genetischen Hintergrund C57BL/6N integriert (Abbildung 3.12). Durch die integrierte *knockout-first* Kasette entstand ein verkürztes Protein, basierend auf Exon 1 und 2 der kodierenden Sequenz für PIST in Fusion mit der  $\beta$ -Galaktosidase und dem Produkt des Neomycinresistenzgens (Koliwer 2014).



**Abbildung 3.12** Der PIST-knockout targeting Vektor (Tm1a).

Der PIST-knockout targeting Vektor, welcher auch die *knockout-first* Kasette trug, wurde über homologe Rekombination in das Genom der Maus mit dem genetischen Hintergrund C57BL/6N integriert. Durch einen zusätzlichen Spleißakzeptor (SA), welches dem lacZ Gen vorgeschaltet war, wurde das lacZ Gen der mRNA angefügt. Im Anschluss folgte ein Stoppcodon wodurch es zum Abbruch der Translation kommt, und eine Polyadenylierungssequenz (pA). Es entstand ein Fusionsprotein aus der von Exon 1 und 2 kodierenden Sequenz für PIST, der  $\beta$ -Galaktosidase und dem Produkt des Neomycinresistenzgens. (Modifiziert nach <http://www.mousephenotype.org/>)

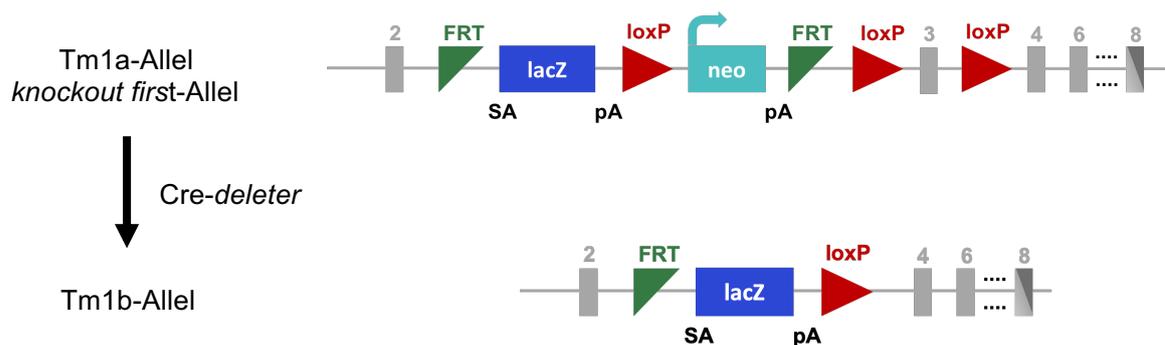
Durch die geringe Rate überlebensfähiger *knockout*-Tiere für das Protein PIST, richtete sich der Fokus der Analyse zu Beginn der Arbeit auf heterozygote Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (Abbildung 3.13).



**Abbildung 3.13** In der C57BL/6-Gopc<sup>Tm1a</sup>-Mauslinie wurden 36 % Wildtyp-, 60 % PIST-heterozygote- und nur 4 % PIST-knockout-Mäuse geboren.

Die C57BL/6-Gopc<sup>Tm1a</sup>-Mauslinie bestand aus insgesamt 479 Tieren. Davon waren 171 Wildtyp-Mäuse, 290 Mäuse heterozygot und nur 18 PIST-knockout-Mäuse.

Um die Rate von PIST-*knockout*-Tieren zu erhöhen, kreuzte die Arbeitsgruppe in die C57BL/6-Gopc<sup>Tm1a</sup>-Mauslinie eine *Cre-deleter*-Mauslinie ein. In den Nachkommen kam es durch die Expression der Cre-Rekombinase zu einer Rekombination zwischen den loxP-Sequenzmotiven innerhalb der Selektionskassette. Das Tm1a-Allel konvertierte zum Tm1b-Allel. Dadurch wurde der Bereich der Selektionskassette mit dem Neomycinresistenzgen und Exon 3 entfernt (Abbildung 3.14). In der C57BL/6-Gopc<sup>Tm1b</sup>-Mauslinie konnte ein weitaus höherer Anteil an PIST-heterozygoten- und PIST-*knockout*-Mäusen gezüchtet werden. Die Analysen fanden unter Verwendung beider PIST-reduzierten Mauslinien statt.



**Abbildung 3.14 Kreuzung der C57BL/6-Gopc<sup>Tm1a</sup>-Mauslinie mit einer *Cre-deleter*-Mauslinie.**

Indem in die C57BL/6-Gopc<sup>Tm1a</sup>-Mauslinie eine *Cre-deleter*-Mauslinie eingekreuzt wurde, konnte über die Cre-Rekombinase das Neomycinresistenzgen sowie Exon 3 entfernt werden. Auch hier entstand ein Genprodukt, welches aus den von Exon 1 und 2 kodierenden Sequenzen von PIST und der  $\beta$ -Galaktosidase bestand. (Modifiziert nach <http://www.mousephenotype.org/>)

Verschiedene Organe der PIST-*knockout*-Mäuse wurde auf die Gesamt-Proteinmenge von CFTR im Vergleich zu PIST-heterozygoten- und Wildtyp-Mäusen untersucht. Es erfolgte eine Analyse von Lunge, Leber und Darm, da in diesen Organen CFTR eine relevante Rolle einnimmt. Dazu war die Isolierung und anschließende Lyse der Organe aus der Maus erforderlich. Durch eine Membranfraktionierung konnte die Membran angereichert werden (Kapitel 2.5.3). Um große Schwankungen in der Beladung der Gele zu vermeiden, wurden die Proben nach der Proteinbestimmung, wie in Kapitel 2.5.4 beschrieben, auf den gleichen Proteingehalt gebracht. Um zu einer Verifizierung der Membranfraktionierung zu gelangen, musste diese im Vergleich zur postnukleären und zytosolischen Fraktion auf die Anreicherung des Transferrin-Rezeptors, einem typischen Membranprotein, und auf den Verlust von GAPDH, einem zytosolischen Protein, mittels *Western Blot* Analyse überprüft werden (Abbildung 3.15). Es wurden immer mindestens zwei Proben analysiert. Hierbei war eine Anreicherung des

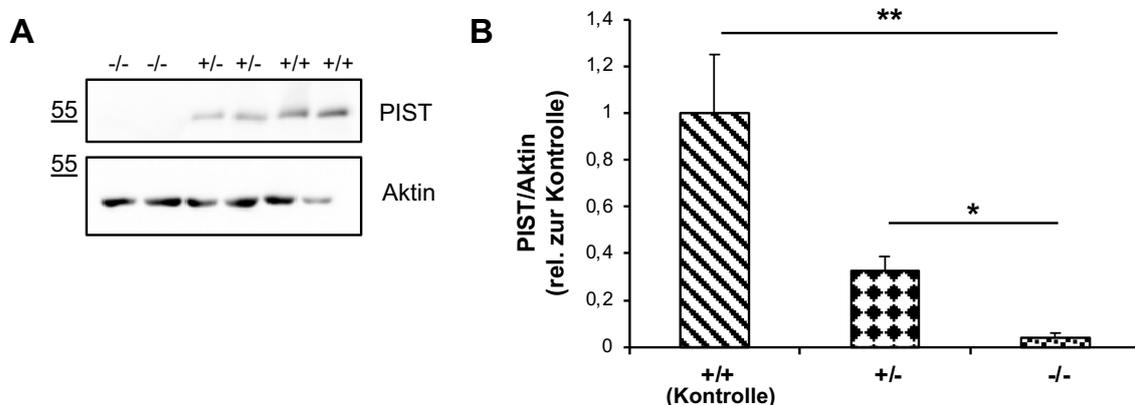
Transferrin-Rezeptors in der Membranfraktion (MF) im Vergleich mit der postnukleären Fraktion (PF) zu beobachten. Darüber hinaus konnte das zytosolische GAPDH nur sehr schwach in der Membranfraktion detektiert werden.



**Abbildung 3.15 Die Membranfraktionierung führt zur Anreicherung des Transferrin-Rezeptors in der Membranfraktion (Lunge).**

Um die Membranfraktionierung zu verifizieren, wurde beispielhaft die postnukleäre Fraktion (PF), die zytosolische Fraktion (ZF) und die Membranfraktion (MF) einer Probe durch *Western Blot* analysiert. Zuvor wurden diese nach einer Proteinbestimmung auf den gleichen Proteingehalt gebracht. Der Transferrin-Rezeptor war in der Membranfraktion im Vergleich mit der postnukleären Fraktion deutlich angereichert. In der zytosolischen Fraktion ist der Transferrin-Rezeptor kaum zu detektieren. GAPDH ließ sich genau gegensätzlich nachweisen.

Zusätzlich erfolgte die Analyse der PIST-Proteinmenge durch *Western Blot* in Lungen-Lysaten, um den funktionellen *knockout* von PIST zu überprüfen (Abbildung 3.16 A). Nach der Normierung von PIST auf das Haushaltsprotein Aktin wurde die relative Abweichung zur Kontrolle (Wildtyp-Mäuse) berechnet. Die PIST-Proteinmenge, hier beispielhaft in der Lunge, war in den PIST-*knockout*-Mäusen kaum nachzuweisen. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der PIST-Proteinmenge im Vergleich von Wildtyp- zu *knockout*-Mäusen (Abbildung 3.16 B).



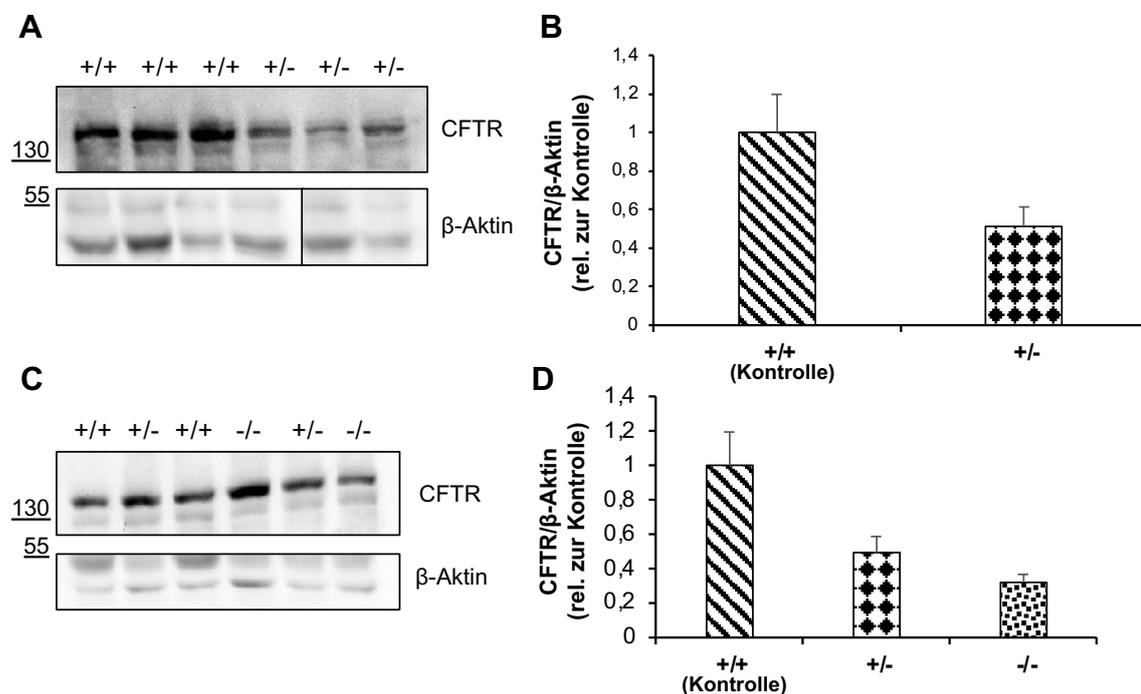
**Abbildung 3.16 Die PIST-Proteinmenge ist in der Lunge von PIST-*knockout*-Mäusen signifikant reduziert.**

**A** Nach der Isolation der Lungen von Wildtyp-, PIST-heterozygoten- und PIST-*knockout*-Mäusen wurden diese lysiert und die Membran mittels Membranfraktionierung angereichert. Im Anschluss wurde die Proteinmenge von PIST durch *Western Blot* Analyse bestimmt. **B** Die Proteinmenge von PIST wurde auf das Haushaltsprotein Aktin normiert sowie die relative Abweichung zur Kontrolle (Wildtyp-Mäuse) berechnet. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der PIST-Proteinmenge in PIST-heterozygoten- und -*knockout*-Mäusen. PIST wurde in PIST-*knockout*-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp fast nicht exprimiert. (ungepaarter t-test, 2 Seiten; N=4; Signifikanzlevel: \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ; Standardfehler)

Anschließend wurde durch *Western Blot* mit spezifischen Antikörpern die Menge an CFTR in den Membranfraktionen der Leber, Lunge und Darm von Wildtyp-, PIST-heterozygoten- und PIST-*knockout*-Mäusen bestimmt (Abbildung 3.17, 3.18, 3.19). Die Normierung von CFTR erfolgte auf das Haushaltsprotein Aktin oder aber das  $\beta$ -Aktin, welches auch an der Membran verankert ist. Anschließend wurde die relative Abweichung zur Kontrolle (Wildtyp-Mäuse) berechnet.

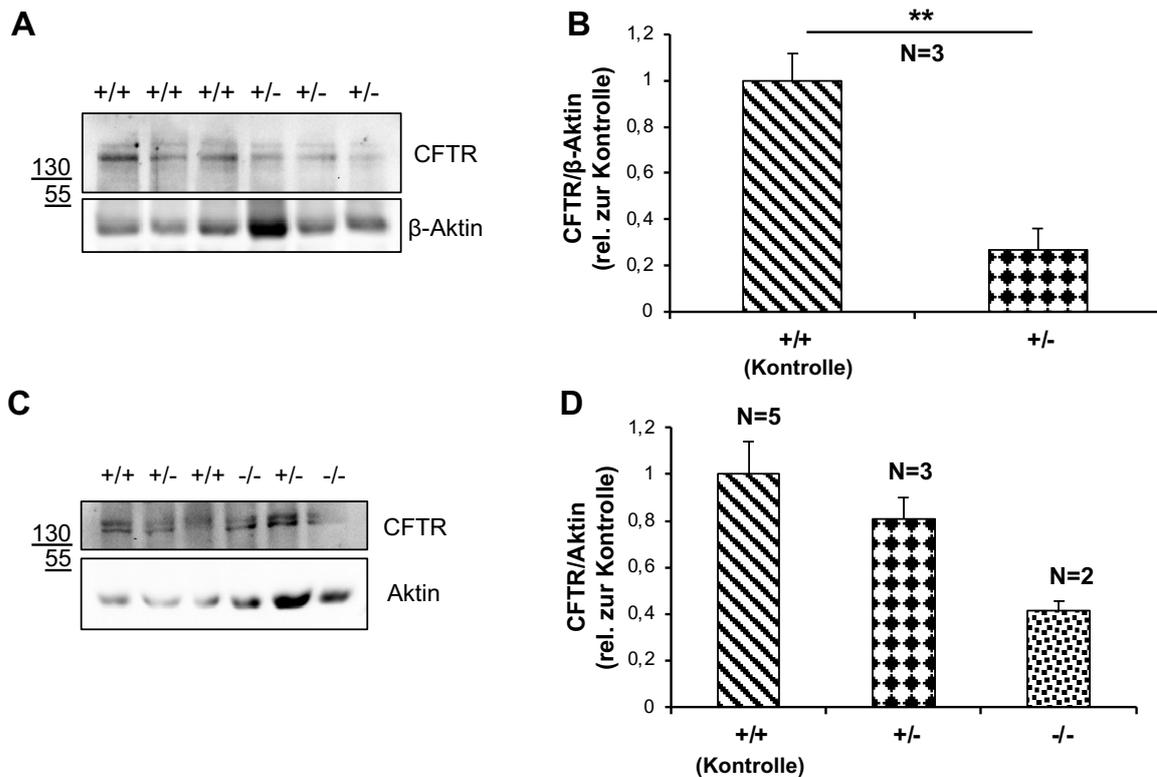
In der Leber konnte gezeigt werden, dass die CFTR-Proteinmenge in PIST-heterozygoten-Tieren reduziert ist (Abbildung 3.17 B). Die PIST-*knockout*-Mäuse wiesen sogar eine noch geringere CFTR-Proteinmenge auf (Abbildung 3.17 D).

Des Weiteren zeigten sich auch in der Lunge, die besonders schwer in der zystischen Fibrose betroffen ist (Cutting 2015), reduzierte CFTR-Proteinmengen in heterozygoten und homozygoten PIST-*knockout*-Mäusen (Abbildung 3.18 D). Der Unterschied zwischen Wildtyp- und PIST-heterozygoten-Tieren stellte sich als signifikant dar (Abbildung 3.18 B).



**Abbildung 3.17 Die Leber von PIST-reduzierten Tieren zeigt reduzierte Proteinmengen für CFTR.**

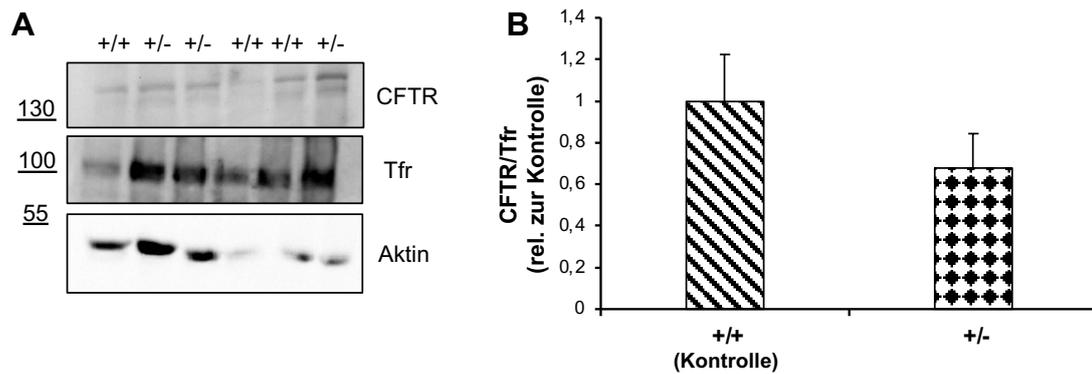
**A und C** Die Leber wurde aus Wildtyp-, PIST-heterozygoten- und PIST-*knockout*-Mäusen isoliert und in hypotonem Puffer lysiert. Im Anschluss wurde die Membran mittels Membranfraktionierung angereichert. Nachdem die Proteinmenge von jeder Probe bestimmt worden war, wurden die Proben auf den gleichen Proteingehalt gebracht und durch *Western Blot* analysiert. **B und D** Die Proteinmenge von CFTR wurde auf  $\beta$ -Aktin normiert sowie die relative Abweichung zur Kontrolle (Wildtyp-Mäuse) berechnet. PIST-heterozygote- und PIST-*knockout*-Mäuse zeigten reduzierte Level von CFTR. (ungepaarter t-test, 2 Seiten; **B**: N=3; **C**: N=2; Signifikanzlevel: \*p  $\leq$  0,05; \*\*p  $\leq$  0,01; \*\*\*p  $\leq$  0,001; Standardfehler)



**Abbildung 3.18 Die Lunge von PIST-heterozygoten-Mäusen zeigt signifikant reduzierte Proteinmengen für CFTR.**

**A und C** Nach der Isolation wurden die Lungen von Wildtyp-, PIST-heterozygoten- und PIST-*knockout*-Mäusen in hypotonen Puffer lysiert. Um große Schwankungen zu vermeiden, wurden die Proben nach erfolgter Proteinbestimmung auf den gleichen Proteingehalt gebracht und schließlich durch *Western Blot* analysiert. **B** Die Proteinmenge von CFTR wurde auf das Haushaltsprotein  $\beta$ -Aktin normiert. Die CFTR-Proteinmenge ist bei PIST-heterozygoten-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen signifikant reduziert. **D** Hierbei wurde die Proteinmenge von CFTR auf Aktin normiert. PIST-heterozygote- und PIST-*knockout*-Mäuse zeigten verringerte Proteinmengen von CFTR. (ungepaarter t-test, 2 Seiten; **B**: N=3, **D**: N=5, N=3 und N=2; Signifikanzlevel: \*p  $\leq$  0,05; \*\*p  $\leq$  0,01; \*\*\*p  $\leq$  0,001; Standardfehler)

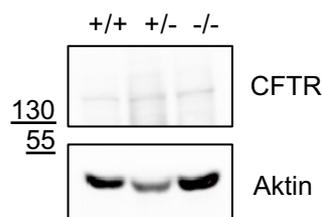
Aufgrund der hohen Relevanz von CFTR im Darm wurde dieser auch analysiert. Zunächst wurde der Darm genau wie die Leber und Lunge lysiert und die Membran mittels Membranfraktionierung angereichert. Anschließend erfolgte die Analyse des Lysats durch *Western Blot* (Abbildung 3.19 A). Die Normierung und Berechnung der relativen Abweichung gleicht der in Lunge und Leber. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der CFTR-Proteinmenge zwischen den verschiedenen Genotypen der Maus, obwohl die Tendenz mit der in Leber und Lunge übereinstimmte (Abbildung 3.19 B).



**Abbildung 3.19** Im Dünndarm von PIST-heterozygoten- und PIST-*knockout*-Mäusen ist die Proteinmenge von CFTR nicht signifikant verändert.

**A** Nach der Isolation des Darms von Wildtyp- und PIST-heterozygoten-Mäusen wurde dieser lysiert und die Membran mittels Membranfraktionierung angereichert. Im Anschluss wurde die Proteinmenge von PIST durch *Western Blot* Analyse bestimmt. **B** Die PIST-Proteinmenge wurde auf den Transferrin-Rezeptor normiert und die relative Abweichung zur Kontrolle (Wildtyp-Mäuse) wurde berechnet. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der CFTR-Proteinmenge. (ungepaarter t-test, 2 Seiten; N=3; Signifikanzlevel: \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ; Standardfehler)

Aufgrund des schwachen CFTR-Signals wurde das Darmepithel aus dem Darmgewebe isoliert, um den prozentualen Anteil von CFTR zu erhöhen. Hierzu musste der Darm direkt nach der Isolierung aus der Maus bei gleichzeitiger Vereinigung von drei Därmen des selben Genotyps weiterverarbeitet werden. Es erfolgte zunächst die Eliminierung der Bakterien in 0,04 % (v/v) Natriumhypochlorit in PBS, gefolgt von der anschließenden Isolierung der Darmepithelzellen und der Lyse dieser mit einem Ultraturrax in hypotonem Puffer (Kapitel 2.5.2). Die Membran wurde mittels Membranfraktionierung angereichert (Kapitel 2.5.3). Aufgrund kleiner Probenmengen musste auf eine Proteinbestimmung verzichtet werden. Die Membranfraktion wurde durch *Western Blot* analysiert. Trotz Isolierung der Darmepithelzellen und der anschließenden Membranfraktionierung blieb die detektierbare Menge von CFTR weiterhin gering (Abbildung 3.20). Zudem konnte die zuvor ermittelte Tendenz im Rahmen der Quantifizierung nicht bestätigt werden.



**Abbildung 3.20** CFTR ist im Dünndarm in geringer Menge detektierbar.

Der Darm wurde jeweils aus Wildtyp-, PIST-heterozygoten- und PIST-*knockout*-Mäusen isoliert und vereinigt. Im Anschluss wurden die Bakterien eliminiert und die Darmepithelzellen isoliert. Diese wurden in hypotonem Puffer lysiert und die Membran mittels Membranfraktionierung angereichert. Die Proteinmenge von CFTR wurde durch *Western Blot* Analyse bestimmt. Trotz Isolierung der Darmepithelzellen und der Membranfraktionierung war CFTR kaum detektierbar.

## 4 Diskussion und Ausblick

### 4.1 Die Interaktion von PIST und NHERF1 mit CFTR in HEK293-T Zellen

In der vorliegenden Dissertation untersuchte ich zunächst die Interaktion von NHERF1 und PIST mit CFTR in zwei zellulären Systemen, den HEK293-T und Calu-3 Zellen. Vorangegangene Studien zeigten auf, dass in COS-7 Zellen durch die Überexpression von PIST die Expression von CFTR an der Plasmamembran reduziert wird, indem CFTR in der Zelle zurück gehalten und über die Lysosomen degradiert wird (Cheng et al. 2002, Cheng et al. 2004). Die Forscher beschrieben PIST als Negativregulator, dessen Effekt sich womöglich sowohl auf den anterograden als auch den retrograden Transport von CFTR auswirkt (Cheng et al. 2002). Darüber hinaus zeigten Cheng et al., dass PIST und NHERF1 funktionell um die Bindung an den PDZ-Liganden von CFTR konkurrieren. Durch Kotransfektion von NHERF1 kann die PIST-vermittelte Degradation von CFTR aufgehoben werden (Cheng et al. 2002). Im Gegensatz dazu ist bereits bekannt, dass die Überexpression von PIST die Interaktion von NHERF1 mit SSTR5, welches auch einen PDZ-Liganden aufweist, verstärkt. Daher ist die Interaktion von PIST und SSTR5 ein entscheidender Faktor für die Bindung von NHERF1 an SSTR5 (Bauch et al. 2014).

Im Rahmen dieser Dissertation konnte durch die Überexpression von CFTR zusammen mit NHERF1, PIST oder beiden Proteinen in HEK293-T Zellen und die anschließende Koimmunpräzipitation eine Interaktion beider PDZ-Domänen-Proteine mit CFTR aufgezeigt werden (Abbildung 3.1 A). Allerdings gab es keine zunehmende Interaktion von NHERF1 mit CFTR in Abhängigkeit von überexprimiertem PIST. Daraus folgt, dass PIST für die Bindung von NHERF1 mit CFTR nicht notwendig ist. Der Unterschied in der Funktion von PIST im Zusammenhang mit SSTR5 und CFTR macht deutlich, dass die Rolle von PIST für jeden Rezeptor unabhängig zu analysieren ist.

Vielmehr führte eine Überexpression beider Interaktionspartner (NHERF1 & PIST) zu einer nicht signifikanten Reduktion des kopräzipitierten PIST im Vergleich zur Expression von PIST allein. Im Gegensatz dazu beeinflusste PIST nicht die Kopräzipitation von NHERF1 (Abbildung 3.1 B). Der *knockdown* von PIST und die anschließende Überexpression von NHERF1 und CFTR resultierte hingegen in einer signifikant erhöhten Interaktion (Abbildung 3.2 C). Es scheint, als sei nicht nur

die Interaktion von PIST mit CFTR im Beisein von NHERF1 beeinflusst, sondern auch die Interaktion von NHERF1 mit CFTR im Beisein von PIST. Dadurch wird die Aussage von Cheng et al., dass NHERF1 und PIST um CFTR konkurrieren, bestätigt. Allerdings muss dabei Berücksichtigung finden, dass NHERF1 eine höhere Affinität zu CFTR als PIST besitzt (Cushing et al. 2008). Zudem war das Verhältnis von NHERF1 im Vergleich zu PIST in beiden oben genannten Experimenten unausgeglichen (Abbildung 3.1 & 3.2). Das hohe NHERF1-Proteinlevel und die höhere Affinität sind vermutlich ein Grund für die verstärkte Interaktion von NHERF1 mit CFTR.

Eine Reduktion der Proteinmenge von CFTR in Abhängigkeit von der Überexpression von PIST, die Cheng et al. in COS-7 Zellen zeigten, konnte in HEK293-T Zellen nicht beobachtet werden (Abbildung 3.1 C) (Cheng et al. 2002, Cheng et al. 2004). PIST führte in den Überexpressionsexperimenten zur keiner Degradierung von reifem CFTR. Ursache für die unveränderte CFTR-Proteinmenge in diesen Experimenten könnte der Unterschied in den zellulären Systemen sein. Es drängt sich die Vermutung auf, dass die Rolle von PIST nicht nur vom Interaktionspartner, sondern auch vom zellulären Kontext abhängig ist.

Allerdings zeigten Cheng et al. in einer weiteren Publikation, dass PIST und Syntaxin6 auch in HEK293 Zellen in Abhängigkeit zu einander die CFTR-Proteinmenge reduzieren. Sie zeigten darüber hinaus, dass ein *knockdown* von PIST zu einem Anstieg der CFTR-Proteinmenge führt (Cheng et al. 2010a). Die in dieser Arbeit durchgeführten *knockdown*-Experimente wiesen ebenfalls einen Anstieg der CFTR-Proteinmenge auf, auch wenn dieser nicht signifikant ausfiel (Abbildung 3.2 D). Daher hätte man erwartet, dass die Überexpression von PIST in Gegenwart des endogenen Syntaxin6 in HEK293-T Zellen einen negativen Effekt auf die CFTR-Proteinmenge haben sollte.

Ferner beschrieben Cheng et al., dass NHERF1 die Reduktion der CFTR-Proteinmenge durch PIST rückgängig machen kann. Dabei bleibt die Expression von CFTR an der Plasmamembran sowie dessen Leitfähigkeit durch die Überexpression von NHERF1 alleine in nicht polarisierten Zellen unbeeinflusst (Cheng et al. 2002). Dieser Effekt konnte in den Überexpressionsexperimenten nicht bestätigt werden, da kein Unterschied in der CFTR-Proteinmenge in den verschiedenen Versuchsansätzen ermittelt werden konnte.

## 4.2 Die Rolle von PIST in der subzellulären Verteilung von CFTR in einem respiratorischen Zellmodell

Die Literatur macht deutlich, dass PIST eine wichtige Rolle in der subzellulären Verteilung von anderen Transmembranproteinen wie SSTR5 und  $\beta$ 1AR einnimmt. CFTR wird typischerweise in Epithelgewebe exprimiert und dort apikal sortiert (Pranke und Sermet-Gaudelus 2014). Nun stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage, ob PIST den CFTR, der über seinen PDZ-Liganden mit PIST interagiert, beeinflusst. Cheng et al. zeigten *in vitro* in undifferenzierten Zellen, dass PIST die Expression von CFTR an der Plasmamembran reduziert und eine dosisabhängige Reduktion der CFTR-Proteinmenge hervorruft. Darüber hinaus begünstigt PIST die Retention von CFTR innerhalb der Zelle, was ebenfalls mit anderen Interaktionspartnern (SSTR5 und  $\beta$ 1AR) beobachtet werden konnte (Bauch et al. 2014, Cheng et al. 2002, Cheng et al. 2004, Gentzsch et al. 2003, Koliwer et al. 2015). Somit könnte PIST in differenzierten Calu-3 Zellen ebenso CFTR innerhalb der Zelle zurückhalten und die CFTR-Proteinmenge reduzieren. Auf der anderen Seite wurde gezeigt, dass PIST Membranproteine positiv beeinflusst, indem es die lysosomale Degradation von SSTR5 verhindert und so zu einer Zunahme der zellulären SSTR5-Proteinmenge führt. Darüber hinaus schützt PIST internalisierte  $\beta$ 1AR vor der postendozytotischen Degradation (Bauch et al. 2014, Koliwer et al. 2015). Dies stützt den theoretischen Ansatz, dass PIST in differenzierten Calu-3 Zellen im Zusammenhang mit CFTR die Rolle eines Positivregulators einnehmen könnte. Möglicherweise trägt PIST somit in epitheliale Gewebe zur apikalen Sortierung und korrekten Integration in Signalkomplexe von CFTR bei. Diese verschiedenen, wichtigen Funktionen, bleiben bei einem Zellmodell mit nicht-polarisierten Zellen unbeachtet.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde erfolgreich ein respiratorisches *in vitro* Modell etabliert, welches in der Forschung im Zusammenhang mit CFTR weitverbreitet ist (Haws et al. 1994). Hierzu wurden Calu-3 Zellen, die endogen CFTR exprimieren, ausdifferenziert (Shen et al. 1994) (Abbildung 3.3 & 3.7). Im Rahmen der Differenzierung wurde sowohl täglich der transepitheliale Widerstand gemessen als auch Calu-3 Zellen im Abstand von zwei Tagen auf die Anwesenheit von Differenzierungsmarkern (Impermeabilität gegenüber einem Biotinylierungsreagenz, sowie die Anwesenheit des *Tight junction* Markers Occludin) untersucht (Abbildung 3.5 & 3.7). Nach 10 Tagen konnte ein deutlicher

Anstieg des transepithelialen Widerstands und die Ausbildung eines apikalen und basalen Pols in der Immunzytochemie ermittelt werden. Beide Punkte sind klare Anzeichen einer Differenzierung. Nachdem PIST über die CRISPR/Cas-Methode auf 7 % herunterreguliert werden konnte (Abbildung 3.10 B), wurden CFTR und Occludin in differenzierten, PIST-defizienten Calu-3 Zellen durch Immunzytochemie angefärbt (Abbildung 3.11 A). CFTR war unverändert an der apikalen Plasmamembran lokalisiert. Auch in der *Western Blot* Analyse zeigte sich kein nennenswerter Unterschied in der CFTR-Proteinmenge (Abbildung 3.10 C).

Es scheint, als spiele der Verlust von PIST in Calu-3 Zellen keine sichtbare Rolle. PIST übernimmt weder die Funktion eines Negativ- noch eines Positivregulators. Calu-3 Zellen weisen einen deutlich höheren Anteil an NHERF1 im Vergleich zu PIST auf, den man via *Western Blot* Analyse feststellen konnte. Auch besitzt NHERF1 ohnehin eine höhere Affinität zu CFTR als PIST (Cushing et al. 2008, Sharma et al. 2016). Daher könnte das unterschiedliche Verhältnis zwischen den Interaktionspartnern, die hohe Affinität von NHERF1 zu CFTR oder eine Kombination aus beiden dazu führen, dass NHERF1 eine weitaus höhere Bindungseffizienz an CFTR erreicht. Weil NHERF1 für die apikale Sortierung von CFTR essentiell ist und CFTR an der Plasmamembran stabilisiert, vermag NHERF1 somit unabhängig von der PIST-Proteinmenge und dessen Auswirkungen die Rolle als effizientes Sortier- und Gerüstprotein einnehmen (Guggino und Banks-Schlegel 2004, Moyer et al. 2000). Es wird ein weiteres Mal deutlich, dass die Rolle von PIST nicht nur vom Interaktionspartner, sondern auch vom zellulären Kontext abhängig ist.

#### **4.3 Untersuchung der Rolle von PIST in der subzellulären Verteilung von CFTR in PIST-*knockout*-Mäusen**

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung der PIST-*knockout*-Mäuse in Bezug auf die Proteinmenge von CFTR. Auch wenn eine andere Arbeitsgruppe eine PIST-*knockout*-Maus zuvor etabliert hatte, so wurde CFTR in dem *in vivo* Modell bisher noch nicht betrachtet (Yao et al. 2002). Zur Analyse wurden Organe wie Lunge, Leber und Darm, die besonders schwer von zystischer Fibrose betroffen sind, isoliert, lysiert und die Membran durch eine Membranfraktionierung angereichert.

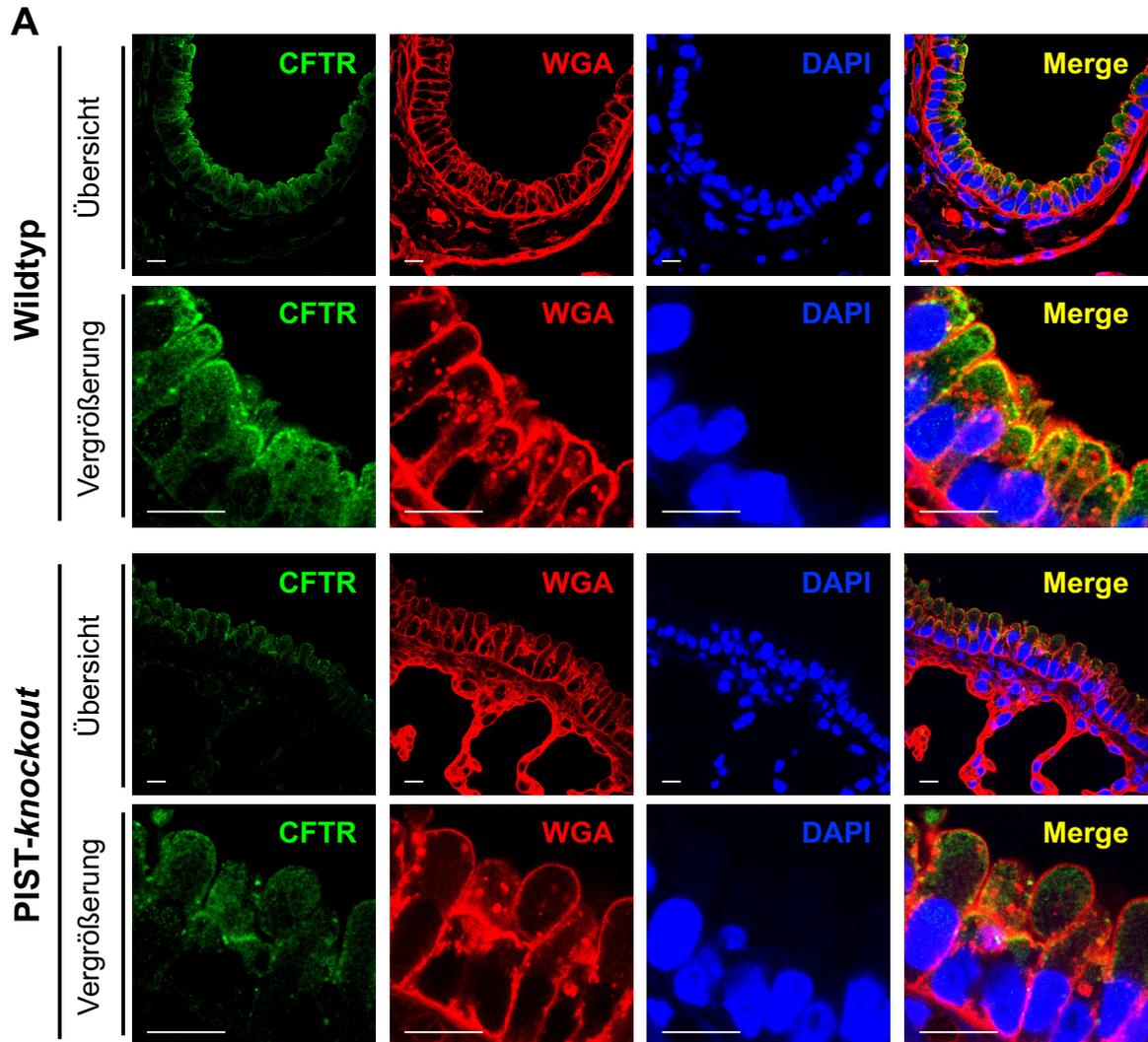
Diese Experimente wurden z.T. dadurch erschwert, dass nur eine sehr geringe Zahl an PIST-*knockout*-Tieren nachgewiesen werden konnte. Daher wurden z.T. heterozygote Tiere in die Analyse mit aufgenommen, um so einen eventuellen Gendosis-Effekt zu analysieren. In der *Western Blot* Analyse der Lunge wurden signifikant reduzierte Proteinmengen von CFTR in PIST-heterozygoten-Tieren beobachtet. Die CFTR-Proteinmenge war im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen um mehr als die Hälfte reduziert (Abbildung 3.18 B). In einem weiteren Versuchsansatz zeigte sich eine Reduktion der CFTR-Proteinmenge in PIST-heterozygoten- und PIST-*knockout*-Mäusen. Der Unterschied fiel jeweils nicht signifikant aus (Abbildung 3.18 D). In der Leber von PIST-heterozygoten- und PIST-*knockout*-Tieren konnten ebenfalls reduzierte CFTR-Proteinmengen detektiert werden, die sich jedoch ebenfalls als nicht signifikant unterschiedlich darstellten (Abbildung 3.17). Auch im Darm zeigte sich ein Unterschied in der CFTR-Proteinmenge zwischen den verschiedenen Genotypen der Mäuse. Allerdings konnte die ermittelte Tendenz nach Anreicherung des Epithels nicht bestätigt werden (Abbildung 3.19 & 3.20). Entsprechend des derzeitigen Forschungsstandes hätte man in heterozygoten oder homozygoten PIST-*knockout*-Mäusen einen Anstieg in der CFTR-Proteinmenge erwarten können (Cheng und Guggino 2013, Cheng et al. 2002, Cheng et al. 2004). Allerdings zeichnet sich in der Analyse von Leber, Lunge und Darm eine gegensätzliche Korrelation ab. Der teilweise oder komplette Verlust von PIST führte zu einer stufenweisen Reduktion der CFTR-Proteinmenge. In der Lunge zeigte sich ein signifikant stabilisierender Effekt von PIST auf die CFTR-Proteinmenge. Jedoch lässt sich in den weiteren Versuchsansätzen mit Lunge, Leber und Darm trotz der gleichen Tendenz keine Signifikanz nachweisen. Dabei ist der Unterschied im Darm zwischen Wildtyp-Mäusen und PIST-heterozygoten-Tieren am geringsten ausgeprägt und konnte nach Isolierung des Darmepithels nicht bestätigt werden. Darüber hinaus sprechen die unterschiedlich stark ausgeprägten Tendenzen der CFTR-Proteinmenge in PIST-reduzierten Tieren dafür, dass die Rolle von PIST nicht nur vom zellulären Kontext *in vitro* abhängig ist, sondern auch *in vivo* von Organ zu Organ leicht variieren kann.

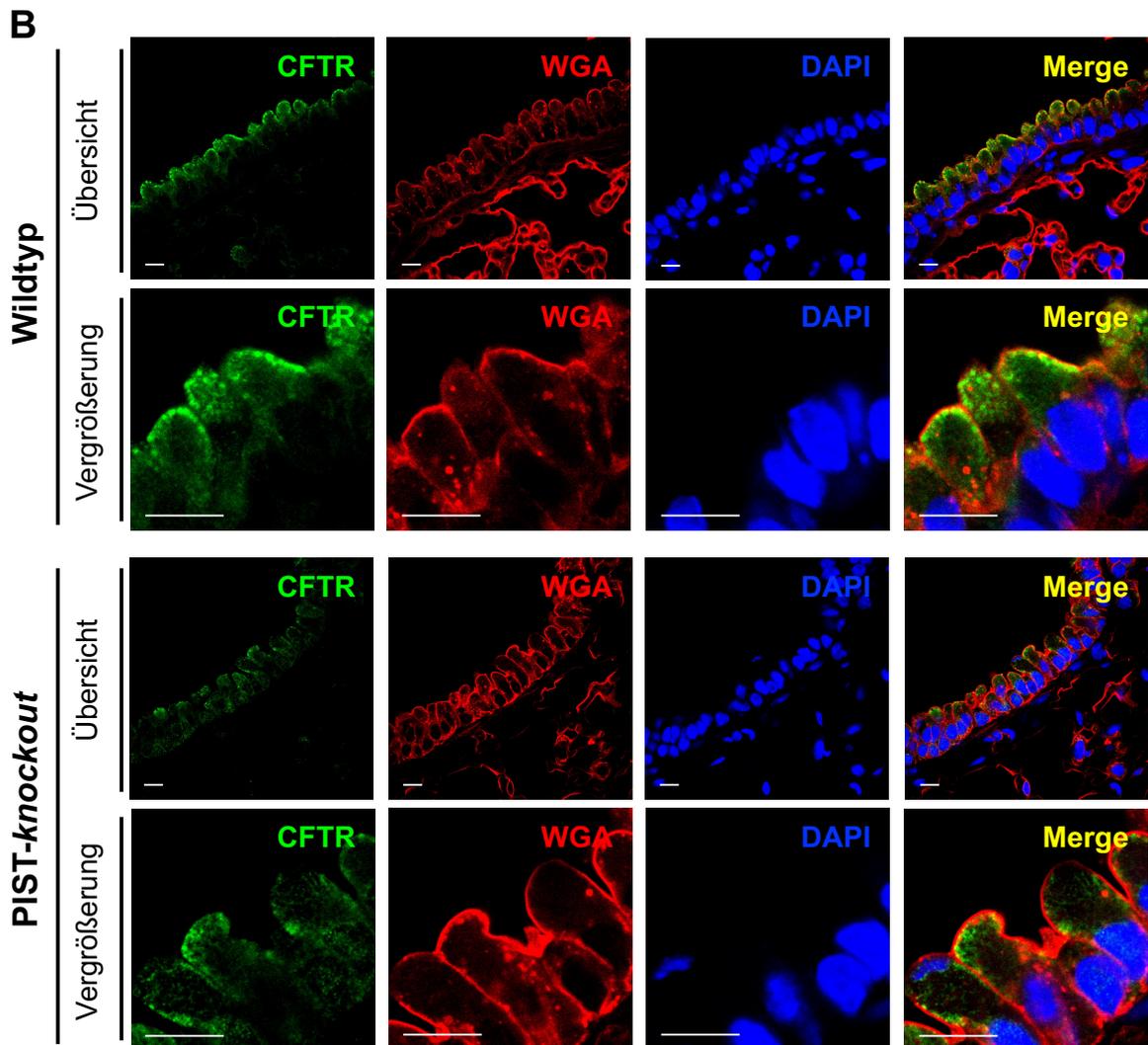
Im Gegensatz zu Calu-3 Zellen lässt sich NHERF1 in epitheliale Gewebe der Maus via *Western Blot* Analyse schwächer detektieren, sodass *in vivo* CFTR eventuell nur in Zusammenarbeit von NHERF1 und PIST apikal sortiert und stabilisiert werden kann. Durch einen Verlust von PIST könnte CFTR nicht nur

fehlerhaft in die Signalkomplexe integriert werden, sondern auch die Sortierung an die apikale Plasmamembran wäre gestört. Diese Fehlverteilung des CFTR könnte Ursache für die reduzierte Proteinmenge des Ionenkanals bei Verlust von PIST sein, die man in Lunge und Leber beobachten konnte.

Um diese Theorie zu überprüfen, wurde die Lokalisation von CFTR in der Lunge von Wildtyp- und PIST-*knockout*-Mäusen untersucht; diese Experimente wurden größtenteils in Kooperation mit Prof. Dr. Catherine Meyer-Schwesinger durchgeführt und sind daher nicht Teil meiner Arbeit. Die Ergebnisse sind aber für diese Diskussion von großer Bedeutung. Dazu wurden Paraffinschnitte verschiedener Organe mit Antikörpern gegen den CFTR sowie mit dem Lektin Weizenkeimagglutinin (*Wheat germ agglutinin*, WGA), welches die Glycocalix der Plasmamembran markiert, gefärbt. Die Analyse erfolgte schließlich mittels konfokaler Mikroskopie (Abbildung 4.1 & 4.2).

Die immunhistochemischen Bilder des Bronchialsystems einer Wildtyp-Maus zeigten eine apikale Sortierung des CFTR. Im Gegensatz dazu war CFTR in PIST-*knockout*-Mäusen in sehr viel geringerer Menge apikal lokalisiert. Darüber hinaus war die gesamte Signalintensität des CFTR im Vergleich zur Wildtyp-Maus reduziert. Somit wird deutlich, dass PIST in Lungengewebe eine entscheidende Funktion in der apikalen Sortierung von CFTR einnimmt. Die stufenweise reduzierte CFTR-Proteinmenge, die in der *Western Blot* Analyse und in der Immunhistochemie gezeigt werden konnte, lässt sich über eine denkbare Fehlverteilung erklären. Eine solche Fehlverteilung könnte zur Degradation von CFTR und letztendlich zu einer Reduktion der CFTR-Proteinmenge führen. PIST trägt somit deutlich zur apikalen Sortierung von CFTR bei und stabilisiert diesen hierdurch. Es bleibt offen, ob PIST eine relevante Rolle in dem anterograden oder auch in dem retrograden Transport und Sortierung von CFTR einnimmt.





**Abbildung 4.1 CFTR ist in Lungengewebe von PIST-knockout-Mäusen nicht apikal sortiert.**

Das Lungengewebe wurde aus den perfundierten Mäusen isoliert und in PFA fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Durch Immunhistochemie wurde CFTR (grün), WGA (rot) und Dapi (blau) angefärbt und mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. **A und B** Die Wildtyp-Maus zeigte eine typische apikale Lokalisierung des CFTR. Im Gegensatz dazu war CFTR in der PIST-knockout-Maus kaum apikal lokalisiert. Darüber hinaus war die gesamte Signalintensität von CFTR im Vergleich zur Wildtyp-Maus reduziert. (Skalierung: 10  $\mu$ m)

Obwohl der Verlust von PIST in der Lunge zu einer mangelnden apikalen Sortierung des CFTR führt, entwickelten die PIST-knockout-Mäuse keinen Phänotyp, der auf eine Erkrankung wie die zystische Fibrose hinweisen würde. In der Literatur wurde gezeigt, dass selbst die Mäuse mit mutiertem CFTR (ZF-Mäuse) keinen dominanten Phänotyp in Bezug auf die Lunge ausprägen (Cutting 2015). Deshalb ist es nach dem derzeitigen Kenntnisstand unwahrscheinlich, dass PIST-knockout-Mäuse einen Phänotyp entwickeln. Allerdings könnte das Alter der Mäuse zum Zeitpunkt der Analysen eine Rolle spielen. Die Tiere wurden im Alter von circa 13 Wochen analysiert, sodass der Zeitraum für die Entwicklung von Symptomen in Bezug auf

die Lunge möglicherweise zu kurz ist. Des Weiteren ist unklar, ob nicht die reduzierte wtCFTR-Menge an der apikalen Plasmamembran in PIST-*knockout*-Mäusen für die Regulation des Wasser- und Salzhaushaltes hinreichend ist.

#### 4.4 Ausblick

In dieser Arbeit wurde verdeutlicht, dass die Rolle von PIST stark vom zellulären Kontext abhängig ist. In HEK293-T Zellen konnte ermittelt werden, dass NHERF1 und PIST unabhängig voneinander mit CFTR interagieren. Dabei konkurrieren beide PDZ-Domänen-Proteine funktionell um die Bindung an CFTR. In PIST-defizienten Calu-3 Zellen blieb sowohl das CFTR-Proteinlevel als auch die apikale Sortierung von CFTR unverändert. In Leber und Lunge von PIST-reduzierten Tieren führte der Verlust von PIST zu einer verringerten CFTR-Proteinmenge. In der Immunhistochemie zeigte sich eine mangelnde apikale Sortierung von CFTR. Es wird deutlich, dass PIST *in vivo* eine zentrale Rolle in der subzellulären Sortierung einnimmt, wohingegen insbesondere in Calu-3 Zellen dieser Funktion keine besondere Bedeutung zukommt.

Es bleibt offen, warum HEK293-T Zellen, die PIST überexprimieren, keine Reduktion des CFTR-Proteinlevels aufwiesen, sowie es Cheng et al. in COS-7 Zellen zeigen konnten (Cheng et al. 2002, Cheng et al. 2004). Dementsprechend könnte ein gleicher Versuchsaufbau mit COS-7 Zellen die Möglichkeit bieten, die verwendeten Plasmide zu überprüfen und die Ergebnisse mit der Literatur abzugleichen.

Auch wenn in Calu-3 Zellen das CFTR-Proteinlevel durch einen *knockdown* von PIST unbeeinflusst bleibt und CFTR weiterhin an die apikale Plasmamembran sortiert wird, könnten künftig diese Ergebnisse mittels Zelloberflächenbiotinylierung und anschließender Biotin-Streptavidin-Präzipitation noch einmal differenziert und genauer quantifiziert werden.

NHERF1 scheint die apikale Sortierung und Stabilisierung von CFTR in Calu-3 Zellen zu ermöglichen. In diesem Zusammenhang sind die hohe Affinität von NHERF1 zu CFTR und das deutlich höhere Aufkommen von NHERF1 relevante Faktoren. Allerdings bleibt offen, wie viel NHERF1 ausreicht, um CFTR apikal zu sortieren und zu stabilisieren. Es könnte von wissenschaftlichem Interesse sein, NHERF1 in PIST-defizienten Calu-3 Zellen herunterzuregulieren, beispielsweise mit

siRNA, um anschließend das CFTR-Proteinlevel durch *Western Blot* zu analysieren und die Lokalisation von CFTR in einer Immunzytochemie zu detektieren.

Weiterhin gibt es viele, offene Forschungsfragen zur Interaktion von NHERF1 und PIST mit CFTR. Dabei gilt es insbesondere zu klären, ob und wenn wie PIST CFTR an NHERF1 weiterreicht. CFTR scheint in PDZ-abhängige, makromolekulare CFTR-Signalkomplexe integriert zu sein, über den es sequentiell reguliert und sortiert wird. Es ist gut möglich, dass neben den in der Literatur bekannten PDZ-Domänen-Proteinen, wie beispielsweise NHERF 1-4, PIST, Shank2, GRASP und MAST205, weitere Proteine, die die apikale Sortierung von Membranproteinen steuern, mit CFTR interagieren und somit regulieren (Bagorda et al. 2002, Gee et al. 2015, Guggino und Stanton 2006, Ren et al. 2013, Wang et al. 2000). Im weiteren Schritt wäre es hoch interessant, die Rolle jedes einzelnen Interaktionspartners nicht nur isoliert, sondern innerhalb der verschiedenen PDZ-abhängigen, makromolekularen CFTR-Signalkomplexe zu ermitteln.

Darüber hinaus sollte die CFTR-Verteilung zwischen PIST-defizienten Calu-3 Zellen und Calu-3 Zellen, in denen PIST, über die in der Literatur genannten therapeutischen Ansätze, herunterreguliert wird, immunzytochemisch verglichen werden (Cushing et al. 2010, Holt et al. 2019, Roberts et al. 2012, Zhao et al. 2018). Außerdem könnte die Leitfähigkeit von CFTR im Calu-3 Zellmodell in Abhängigkeit von einem *knockdown* von PIST gemessen werden, um eine Aussage über die Effizienz von CFTR treffen zu können.

Bisher konnte noch nicht gezeigt werden, ob PIST seine Funktion im anterograden oder im retrograden Transport von CFTR ausübt. Koliwer et al. beobachteten, dass PIST  $\beta$ 1AR nicht nur stabilisiert, sondern auch internalisierte Rezeptoren vor postendozytotischer Degradation schützt (Koliwer et al. 2015). Somit ist es möglich, dass PIST auch im Zusammenhang mit CFTR eine Rolle im retrograden Transport spielt. Es stellt sich die Frage, ob PIST die Internalisierung und das Recycling von CFTR beeinflusst. Hierfür könnte in einem Überexpressionsexperiment mit CFTR und PIST, die jeweils über ein Protein-Tag markiert sind, die Internalisierung und das Recycling von CFTR induziert werden. Anschließend kann eine Analyse mit Hilfe der Durchflusszytometrie über einen Antikörper, der gegen den Protein-Tag des Rezeptors gerichtet und mit einem Fluorophor gekoppelt ist, erfolgen. Weiterhin könnte auch die Lebendzellmikroskopie Aufschlüsse über die Rolle von PIST im anterograden und retrograden Transport liefern.

Im Rahmen der Immunhistochemie stellt sich die Frage, ob die fehlerhafte Sortierung von CFTR in den PIST-*knockout*-Mäusen einen bedeutenden Einfluss auf die Funktion des CFTR hat. Reicht der Chlorid-Transport für die intakte Regulation des Wasser- und Salzhaushaltes von Epithelgewebe in PIST-*knockout*-Mäusen aus? Hierfür könnte eine Langzeitstudie aufgestellt werden, in der insbesondere der Phänotyp der Lunge betrachtet wird.

## 5 Zusammenfassung

Der CFTR ist ein entscheidender Faktor im transepithelialen Ionen- und Wassertransport. Mutationen im Gen des CFTR führen unter anderem zu einer reduzierten Aktivität und zum vermehrten Abbau dieses Ionenkanals, wodurch die zystische Fibrose hervorgerufen wird, die ihrerseits durch einen hochviskosen Schleim charakterisiert ist. Aufgrund dessen besteht ein erhebliches Interesse an Strategien zur Verbesserung der funktionellen Rettung und dem daraus resultierenden erhöhten Plasmamembran-*Targeting* des mutierten Proteins. Eine der am häufigsten vorkommenden Protein-Protein-Interaktionsdomäne ist die PDZ-Domäne. PIST, das eine solche Domäne aufweist, interagiert hierüber mit CFTR. In diesem Zusammenhang wird PIST als Negativregulator beschrieben, der die Expression von CFTR an der Plasmamembran verringert und den lysosomalen Abbau von CFTR begünstigt. NHERF1, das ebenso PDZ-Domänen aufweist, fungiert als funktionaler Gegenspieler von PIST. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von PIST auf die CFTR-Proteinmenge und -Lokalisation in zwei *in vitro* Modellen sowie in einer PIST-*knockout*-Mauslinie analysiert.

Überexpressionsexperimente zeigten, dass PIST und NHERF1 jeweils mit CFTR interagieren und um die Bindung an CFTR konkurrieren. In PIST-defizienten Calu-3 Zellen war die CFTR-Proteinmenge in der *Western Blot* Analyse unverändert. Auch in der konfokalen Mikroskopie stellte sich CFTR ähnlich zur Kontrolle apikal sortiert dar. Der Verlust von PIST spielte in dieser Zelllinie keine sichtbare Rolle. In der Analyse von Lunge und Leber der PIST-*knockout*-Mäuse mittels *Western Blot* konnte kein Anstieg des Gesamt-CFTR-Proteinlevels ermittelt werden. Das deutet wiederum an, dass PIST in Lungenepithelzellen nicht zum Abbau von endogenem wtCFTR beiträgt. Vielmehr zeichnet sich die Tendenz eines reduzierten CFTR-Proteinlevels in PIST-*knockout*-Mäusen ab.

In Bezug auf endogen exprimierten wtCFTR in Mausgeweben kann PIST also nicht als negativer Regulator von CFTR angesehen werden. Experimente einer kooperierenden Arbeitsgruppe zeigten sogar, dass PIST eher als positiver Regulator gesehen werden muss, der zur korrekten apikalen Sortierung des Ionenkanals beiträgt. Es wird deutlich, dass die Funktion von PIST in Bezug auf CFTR stark vom zellulären Kontext abhängig ist.

## 6 Summary

CFTR is a critical factor in transepithelial ion and water transport. Mutations in the CFTR gene lead to reduced activity and increased degradation of this ion channel, causing cystic fibrosis, which is characterized by a highly viscous mucus. That is why there is considerable interest in strategies to improve functional rescue and plasma membrane targeting of the mutant protein.

PDZ domains, represent one of the most abundant protein-protein interaction domains; the PDZ domain of PIST interacts with CFTR. In doing so, PIST is described as a negative regulator reducing the expression of CFTR at the plasma membrane and promoting lysosomal degradation of CFTR. NHERF1, which also contains PDZ domains, is known to be PIST's functional antagonist. In this work, the effect of PIST on CFTR protein levels and localization was analyzed in two *in vitro* models and in a PIST knockout mouse line.

Overexpression experiments showed that PIST and NHERF1 each interact with CFTR as well as compete for binding to the ion channel. In PIST-deficient Calu-3 cells, CFTR protein levels were unchanged in Western blot analysis. In confocal microscopy CFTR was found to be equally sorted to the apical surface when compared to the control. Loss of PIST did not play a visible role in this cell line. In Western Blot analysis of lung and liver from PIST knockout mice no increase of CFTR protein levels was detectable. This suggests that PIST does not contribute to the degradation of endogenous wtCFTR in lung epithelial cells. Rather, a trend of reduced CFTR protein levels in PIST knockout mice was detected. Furthermore, a lack of apical sorting of CFTR was observed.

Thus, with respect to endogenously expressed wtCFTR in mouse tissues, PIST cannot be considered as a negative regulator of CFTR but rather a positive regulator; immunohistochemical analysis of the lung performed by a collaborating group suggested that PIST contributes to the proper apical sorting of the ion channel. Nonetheless, it is clear that the function of PIST in context of the CFTR is strongly dependent on the cellular environment.

## I. Abkürzungsverzeichnis

ABC	<i>ATP-binding cassette</i> (ATP-Bindungskassetten)
AMPAR	$\alpha$ -Amino-3Hydroxy-5Methyl-4-Isoxazolepropionsäure
ASL	<i>Airway surface liquid</i>
ATP	Adenosin-Triphosphat
$\beta$ 1AR	$\beta$ 1 adrenerger Rezeptor
BBS	<i>Borate buffered saline</i>
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CAL	CFTR-assoziiertes Ligand; Synonym für PIST
CC	<i>Coiled coil</i> (Proteindomäne)
CFLD	<i>Cystic fibrosis-associated liver disease</i>
CFRD	<i>Cystic fibrosis related-diabetes</i>
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane regulator</i>
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
Cy3	Cyanine 3
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco`s modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
EBD	Ezrin-Bindungsdomäne
E.coli	<i>Escherichia Coli</i>
ENaC	<i>Epithelial sodium channel</i>
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERAD	ER-assoziierte Degradation
ERGIC	ER-Golgi-Intermediärkompartiment
ERQC	<i>Endoplasmic reticulum quality control</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FBS	Fetales Kälberserum
FIG	<i>Fused in Glioblastoma</i> ; Synonym für PIST
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>

---

GOPC	<i>Golgi-associated PDZ and coiled-coil motif-containing protein</i>
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IP	Immunpräzipitation
IZ	Immunzytochemie
kDA	Kilodalton (1 Dalton=1u)
LZ	Leucin-Zipper-Region
MEM	<i>Minimal essential medium</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NHERF1	<i>Na(+)/H(+) exchanger regulatory factor 1</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDZ	PSD95/Disc large/ZO-1
PIST	<i>Protein interacting specifically with TC10</i>
PKA	Proteinkinase A
PLL	Poly-L-Lysin
PM	Plasmamembran
RFP	<i>Red fluorescent protein</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
sgRNA	<i>Single guide RNA</i>
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>Silencing RNA</i>
SSTR5	Somatostatinrezeptor 5
SV	Simvastatin
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TARP	<i>Transmembrane AMPA receptor regulatory protein</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline and Tween 20</i>
TEER	<i>Transepithelial electrical resistance</i>

TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
WGA	<i>Wheat germ agglutinin</i>
wtCFTR	Wildtyp-CFTR
wtNHERF1	Wildtyp-NHERF1

## II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Die Domänenstruktur von CFTR .....	4
Abbildung 1.2 Transportwege von Membranproteinen zwischen subzellulären Kompartimenten im sekretorischen, lysosomalen und endozytotischen Pfad und einige der beteiligten Proteine. (aus: Bonifacino und Glick 2004) .....	7
Abbildung 1.3 Dreidimensionale Faltung der PDZ-3-Domäne von PSD-95 (Aminosäure 309-393) mit einem PDZ-Liganden. ....	8
Abbildung 1.4 Schematische Darstellung der Domänenstruktur von PIST und Beispiele von Interaktionspartnern. ....	11
Abbildung 1.5 Schematische Darstellung der Domänenstruktur von NHERF1.....	13
Abbildung 1.6 Modell der Interaktion von CFTR, NHERF1 und Ezrin an der apikalen Plasmamembran. (aus: Short et al. 1998).....	14
Abbildung 1.7 Schematische Darstellung der Rolle von PIST und NHERF1 für CFTR <i>in vitro</i> . ....	17
Abbildung 3.1 PIST und NHERF1 interagieren mit CFTR.....	45
Abbildung 3.2 PIST und NHERF1 konkurrieren um CFTR.....	47
Abbildung 3.3 Calu-3 Zellen exprimieren endogenes PIST.....	48
Abbildung 3.4 Aufbau der <i>Costar Transwells</i> . ....	48
Abbildung 3.5 Der transepitheliale Widerstand von Calu-3 Zellen steigt im Verlauf der Differenzierung auf über 1 000 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ . ....	49
Abbildung 3.6 Modell differenzierter Calu-3 Zellen.....	49
Abbildung 3.7 Calu-3 Zellen differenzieren in einem Zeitraum von 10 Tagen aus. ....	51
Abbildung 3.8 Die Infektionsrate von Calu-3 Zellen kann mittels Simvastatin und Polybren um das 7-fache gesteigert werden. ....	52
Abbildung 3.9 Calu-3 Zellen weisen trotz <i>knockdown</i> ein PIST-Signal auf. ....	53
Abbildung 3.10 Die Expression von PIST ist durch die CRISPR/Cas-Methode auf 7 % reduziert.....	55
Abbildung 3.11 Die CFTR-Verteilung in PIST-defizienten Calu-3 Zellen unterscheidet sich nicht im Vergleich zur Kontrolle. ....	56
Abbildung 3.12 Der PIST- <i>knockout targeting</i> Vektor (Tm1a). ....	57
Abbildung 3.13 In der C57BL/6-Gopc <sup>Tm1a</sup> -Mauslinie wurden 36 % Wildtyp-, 60 % PIST-heterozygote- und nur 4 % PIST- <i>knockout</i> -Mäuse geboren. ....	57
Abbildung 3.14 Kreuzung der C57BL/6-Gopc <sup>Tm1a</sup> -Mauslinie mit einer <i>Cre-deleter</i> -Mauslinie.....	58
Abbildung 3.15 Die Membranfraktionierung führt zur Anreicherung des Transferrin-Rezeptors in der Membranfraktion (Lunge).....	59

Abbildung 3.16 Die PIST-Proteinmenge ist in der Lunge von PIST-*knockout*-Mäusen signifikant reduziert.....59

Abbildung 3.17 Die Leber von PIST-reduzierten Tieren zeigt reduzierte Proteinmengen für CFTR.....60

Abbildung 3.18 Die Lunge von PIST-heterozygoten-Mäusen zeigt signifikant reduzierte Proteinmengen für CFTR.....61

Abbildung 3.19 Im Dünndarm von PIST-heterozygoten- und PIST-*knockout*-Mäusen ist die Proteinmenge von CFTR nicht signifikant verändert.....62

Abbildung 3.20 CFTR ist im Dünndarm in geringer Menge detektierbar.....62

Abbildung 4.1 CFTR ist in Lungengewebe von PIST-*knockout*-Mäusen nicht apikal sortiert.....70

### III. Literaturverzeichnis

- Alberts B, Johnson A, Lewis J & Morgan D (2014) *Molecular biology of the cell.*, 6th Revised edition, Garland Publishing Inc. New York.
- Alshafie W, Chappe FG, Li M, Anini Y & Chappe VM (2014) VIP regulates CFTR membrane expression and function in Calu-3 cells by increasing its interaction with NHERF1 and P-ERM in a VPAC1- and PKCepsilon-dependent manner. *Am J Physiol Cell Physiol.* 307: C107-19.
- Amacher JF, Cushing PR, Weiner JA & Madden DR (2011) Crystallization and preliminary diffraction analysis of the CAL PDZ domain in complex with a selective peptide inhibitor. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 67: 600-3.
- Amacher JF, Cushing PR, Bahl CD, Beck T & Madden DR (2013) Stereochemical determinants of C-terminal specificity in PDZ peptide-binding domains: a novel contribution of the carboxylate-binding loop. *J Biol Chem.* 288: 5114-26.
- Amacher JF, Zhao R, Spaller MR & Madden DR (2014) Chemically modified peptide scaffolds target the CFTR-associated ligand PDZ domain. *PLoS One.* 9: e103650.
- Bagorda A, Guerra L, Di Sole F, Hemle-Kolb C, Cardone RA, Fanelli T, Reshkin SJ, Gisler SM, Murer H & Casavola V (2002) Reciprocal protein kinase A regulatory interactions between cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 3 in a renal polarized epithelial cell model. *J Biol Chem.* 277: 21480-8.
- Bauch C, Koliwer J, Buck F, Honck HH & Kreienkamp HJ (2014) Subcellular sorting of the G-protein coupled mouse somatostatin receptor 5 by a network of PDZ-domain containing proteins. *PLoS One.* 9: e88529.
- Bergbower E, Boinot C, Sabirzhanova I, Guggino W & Cebotaru L (2018) The CFTR-Associated Ligand Arrests the Trafficking of the Mutant ΔF508 CFTR Channel in the ER Contributing to Cystic Fibrosis. *Cell Physiol Biochem.* 45: 639-655.
- Bergbrede T, Chuky N, Schoebel S, Blankenfeldt W, Geyer M, Fuchs E, Goody RS, Barr F & Alexandrov K (2009) Biophysical analysis of the interaction of Rab6a GTPase with its effector domains. *J Biol Chem.* 284: 2628-35.
- Bergeron C & Cantin AM (2019) Cystic Fibrosis: Pathophysiology of Lung Disease. *Semin Respir Crit Care Med.* 40: 715-726.
- Bertrand CA, Mitra S, Mishra SK, Wang X, Zhao Y, Pilewski JM, Madden DR & Frizzell RA (2017) The CFTR trafficking mutation F508del inhibits the constitutive activity of SLC26A9. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 312: L912-L925.
- Bezprozvanny I & Maximov A (2001) Classification of PDZ domains. *FEBS Lett.* 509: 457-62.
- Bozoky Z, Krzeminski M, Muhandiram R, Birtley JR, Al-Zahrani A, Thomas PJ, Frizzell RA, Ford RC & Forman-Kay JD (2013) Regulatory R region of the CFTR chloride channel is a dynamic integrator of phospho-dependent intra- and intermolecular interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110: E4427-36.
- Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR & Snyder SH (1991) Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature.* 351: 714-8.

- Bulloch MN, Hanna C & Giovane R (2017) Lumacaftor/ivacaftor, a novel agent for the treatment of cystic fibrosis patients who are homozygous for the F580del CFTR mutation. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 10: S. 1055-1072.
- Cai ZW, Liu J, Li HY & Sheppard DN (2011) Targeting F508del-CFTR to develop rational new therapies for cystic fibrosis. *Acta Pharmacol Sin.* 32: 693-701.
- Castellani S, Guerra L, Favia M, Di Gioia S, Casavola V & Conese M (2012) NHERF1 and CFTR restore tight junction organisation and function in cystic fibrosis airway epithelial cells: role of ezrin and the RhoA/ROCK pathway. *Lab Invest.* 92: 1527-40.
- Charest A, Lane K, McMahon K & Housman DE (2001) Association of a novel PDZ domain-containing peripheral Golgi protein with the Q-SNARE (Q-soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF) attachment protein receptor) protein syntaxin 6. *J Biol Chem.* 276: 29456-65.
- Chen A, Gössling EK, Witkowski L, Bhindi A, Bauch C, Roussy G, Sarret P, Kreienkamp HJ & Stroh T (2012) Regional and subcellular distribution of the receptor-targeting protein PIST in the rat central nervous system. *J Comp Neurol.* 520: 889-913.
- Chen SH & Zhaori G (2011) Potential clinical applications of siRNA technique: benefits and limitations. *Eur J Clin Invest.* 41: 221-32.
- Cheng J, Moyer BD, Milewski M, Loffing J, Ikeda M, Mickle JE, Cutting GR, Li M, Stanton BA & Guggino WB (2002) A Golgi-associated PDZ domain protein modulates cystic fibrosis transmembrane regulator plasma membrane expression. *J Biol Chem.* 277: 3520-9.
- Cheng J, Wang H & Guggino WB (2004) Modulation of mature cystic fibrosis transmembrane regulator protein by the PDZ domain protein CAL. *J Biol Chem.* 279: 1892-8.
- Cheng J, Wang H & Guggino WB (2005) Regulation of cystic fibrosis transmembrane regulator trafficking and protein expression by a Rho family small GTPase TC10. *J Biol Chem.* 280: 3731-9.
- Cheng J, Cebotaru V, Cebotaru L & Guggino WB (2010a) Syntaxin 6 and CAL mediate the degradation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Mol Biol Cell.* 21: 1178-87.
- Cheng J & Guggino W (2013) Ubiquitination and degradation of CFTR by the E3 ubiquitin ligase MARCH2 through its association with adaptor proteins CAL and STX6. *PLoS One.* 8: e68001.
- Cheng S, Zhang J, Zhu P, Ma Y, Xiong Y, Sun L, Xu J, Zhang H & He J (2010b) The PDZ domain protein CAL interacts with mGluR5a and modulates receptor expression. *J Neurochem.* 112: 588-98.
- Cheng SH, Gregory RJ, Marshall J, Paul S, Souza DW, White GA, O'riordan CR & Smith AE (1990) Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell.* 63: 827-34.
- Cho KO, Hunt CA & Kennedy MB (1992) The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein. *Neuron.* 9: 929-42.
- Choo-Kang LR & Zeitlin PL (2001) Induction of HSP70 promotes DeltaF508 CFTR trafficking. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 281: L58-68.
- Christopherson KS, Hillier BJ, Lim WA & Brecht DS (1999) PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain. *J Biol Chem.* 274: 27467-73.
- Clunes MT & Boucher RC (2007) Cystic Fibrosis: The Mechanisms of Pathogenesis of an Inherited Lung Disorder. *Drug Discov Today Dis Mech.* 4: 63-72.

- Coutinho HD, Falcão-Silva VS & Gonçalves GF (2008) Pulmonary bacterial pathogens in cystic fibrosis patients and antibiotic therapy: a tool for the health workers. *Int Arch Med.* 1: 24.
- Cuadra AE, Kuo SH, Kawasaki Y, Bredt DS & Chetkovich DM (2004) AMPA receptor synaptic targeting regulated by stargazin interactions with the Golgi-resident PDZ protein nPIST. *J Neurosci.* 24: 7491-502.
- Cushing PR, Fellows A, Villone D, Boisguerin P & Madden DR (2008) The relative binding affinities of PDZ partners for CFTR: a biochemical basis for efficient endocytic recycling. *Biochemistry.* 47: 10084-98.
- Cushing PR, Vouilleme L, Pellegrini M, Boisguerin P & Madden DR (2010) A stabilizing influence: CAL PDZ inhibition extends the half-life of  $\Delta$ F508-CFTR. *Angew Chem Int Ed Engl.* 49: 9907-11.
- Cutting GR (2015) Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nat Rev Genet.* 16: S. 45-56.
- De Boeck K, Weren M, Proesmans M & Kerem E (2005) Pancreatitis among patients with cystic fibrosis: correlation with pancreatic status and genotype. *Pediatrics.* 115: e463-9.
- Denning W, Das S, Guo S, Xu J, Kappes JC & Hel Z (2013) Optimization of the transductional efficiency of lentiviral vectors: effect of sera and polycations. *Mol Biotechnol.* 53: 308-14.
- Dominska M & Dykxhoorn DM (2010) Breaking down the barriers: siRNA delivery and endosome escape. *J Cell Sci.* 123: 1183-9.
- Doyle DA, Lee A, Lewis J, Kim E, Sheng M & Mackinnon R (1996) Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell.* 85: 1067-76.
- Dungan JS (2010) Carrier screening for cystic fibrosis. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 37: S. 47-59.
- Durno C, Corey M, Zielenski J, Tullis E, Tsui LC & Durie P (2002) Genotype and phenotype correlations in patients with cystic fibrosis and pancreatitis. *Gastroenterology.* 123: 1857-64.
- Elborn JS (2016) Cystic fibrosis. *Lancet.*
- Farinha CM & Amaral MD (2005) Most F508del-CFTR is targeted to degradation at an early folding checkpoint and independently of calnexin. *Mol Cell Biol.* 25: S. 5242-5252.
- Farinha CM, Swiatecka-Urban A, Brautigam DL & Jordan P (2016) Regulatory Crosstalk by Protein Kinases on CFTR Trafficking and Activity. *Front Chem.* 4: S. 1.
- Favia M, Guerra L, Fanelli T, Cardone RA, Monterisi S, Di Sole F, Castellani S, Chen M, Seidler U, Reshkin SJ, Conese M & Casavola V (2010) Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor 1 overexpression-dependent increase of cytoskeleton organization is fundamental in the rescue of F508del cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in human airway CFBE410-cells. *Mol Biol Cell.* 21: 73-86.
- Feng W & Zhang M (2009) Organization and dynamics of PDZ-domain-related supramodules in the postsynaptic density. *Nat Rev Neurosci.* 10: 87-99.
- Garcia MA, Yang N & Quinton PM (2009) Normal mouse intestinal mucus release requires cystic fibrosis transmembrane regulator-dependent bicarbonate secretion. *J Clin Invest.* 119: 2613-22.
- Gee HY, Kim JY & Lee MG (2015) Analysis of conventional and unconventional trafficking of CFTR and other membrane proteins. *Methods Mol Biol.* 1270: 137-54.

- Gentzsch M, Cui L, Mengos A, Chang XB, Chen JH & Riordan JR (2003) The PDZ-binding chloride channel CIC-3B localizes to the Golgi and associates with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-interacting PDZ proteins. *J Biol Chem.* 278: 6440-9.
- Grainger CI, Greenwell LL, Lockley DJ, Martin GP & Forbes B (2006) Culture of Calu-3 cells at the air interface provides a representative model of the airway epithelial barrier. *Pharm Res.* 23: 1482-90.
- Guggino WB (2004) The cystic fibrosis transmembrane regulator forms macromolecular complexes with PDZ domain scaffold proteins. *Proc Am Thorac Soc.* 1: 28-32.
- Guggino WB & Banks-Schlegel SP (2004) Macromolecular interactions and ion transport in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 170: 815-20.
- Guggino WB & Stanton BA (2006) New insights into cystic fibrosis: molecular switches that regulate CFTR. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7: 426-36.
- Guo W, Wang P, Liu ZH & Ye P (2018) Analysis of differential expression of tight junction proteins in cultured oral epithelial cells altered by *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide, and extracellular adenosine triphosphate. *Int J Oral Sci.* 10: e8.
- Gustafsson JK, Ermund A, Ambort D, Johansson ME, Nilsson HE, Thorell K, Hebert H, Sjövall H & Hansson GC (2012) Bicarbonate and functional CFTR channel are required for proper mucin secretion and link cystic fibrosis with its mucus phenotype. *J Exp Med.* 209: 1263-72.
- Haggie PM, Kim JK, Lukacs GL & Verkman AS (2006) Tracking of quantum dot-labeled CFTR shows near immobilization by C-terminal PDZ interactions. *Mol Biol Cell.* 17: 4937-45.
- Haq IJ, Gray MA, Garnett JP, Ward C & Brodlie M (2016) Airway surface liquid homeostasis in cystic fibrosis: pathophysiology and therapeutic targets. *Thorax.* 71: S. 284-7.
- Harris BZ & Lim WA (2001) Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *J Cell Sci.* 114: 3219-31.
- Haws C, Finkbeiner WE, Widdicombe JH & Wine JJ (1994) CFTR in Calu-3 human airway cells: channel properties and role in cAMP-activated Cl<sup>-</sup> conductance. *Am J Physiol.* 266: L502-12.
- He J, Bellini M, Xu J, Castleberry AM & Hall RA (2004) Interaction with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-associated ligand (CAL) inhibits beta1-adrenergic receptor surface expression. *J Biol Chem.* 279: 50190-6.
- Hicks SW & Machamer CE (2005) Isoform-specific interaction of golgin-160 with the Golgi-associated protein PIST. *J Biol Chem.* 280: 28944-51.
- Hillier BJ, Christopherson KS, Prehoda KE, Brecht DS & Lim WA (1999) Unexpected modes of PDZ domain scaffolding revealed by structure of nNOS-syntrophin complex. *Science.* 284: 812-5.
- Holt GT, Jou JD, Gill NP, Lowegard AU, Martin JW, Madden DR & Donald BR (2019) Computational Analysis of Energy Landscapes Reveals Dynamic Features That Contribute to Binding of Inhibitors to CFTR-Associated Ligand. *J Phys Chem B.* 123: 10441-10455.
- Hwang TC & Kirk KL (2013) The CFTR ion channel: gating, regulation, and anion permeation. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 3.
- Ishiguro H, Steward MC, Naruse S, Ko SB, Goto H, Case RM, Kondo T & Yamamoto A (2009) CFTR functions as a bicarbonate channel in pancreatic duct cells. *J Gen Physiol.* 133: 315-26.

- Ito H, Iwamoto I, Mizutani K, Morishita R, Deguchi T, Nozawa Y, Asano T & Nagata K (2006) Possible interaction of a Rho effector, Rhotekin, with a PDZ-protein, PIST, at synapses of hippocampal neurons. *Neurosci Res.* 56: 165-71.
- Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Kitani-Yasuda T, Tsukita S & Tsukita S (1993) The 220-kD protein colocalizing with cadherins in non-epithelial cells is identical to ZO-1, a tight junction-associated protein in epithelial cells: cDNA cloning and immunoelectron microscopy. *J Cell Biol.* 121: 491-502.
- Jensen TJ, Loo MA, Pind S, Williams DB, Goldberg AL & Riordan JR (1995) Multiple proteolytic systems, including the proteasome, contribute to CFTR processing. *Cell.* 83: S. 129-35.
- Kayani K, Mohammed R & Mohiaddin H (2018) Cystic Fibrosis-Related Diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne).* 9: 20.
- Kennedy MB (1995) Origin of PDZ (DHR, GLGF) domains. *Trends Biochem Sci.* 20: 350.
- Kim D & Rossi J (2008) RNAi mechanisms and applications. *Biotechniques.* 44: 613-6.
- Kim JY, Han W, Namkung W, Lee JH, Kim KH, Shin H, Kim E & Lee MG (2004) Inhibitory regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator anion-transporting activities by Shank2. *J Biol Chem.* 279: 10389-96.
- Klüssendorf M, Song I, Schau L, Morellini F, Dityatev A, Koliwer J & Kreienkamp HJ (2021) The Golgi-Associated PDZ Domain Protein Gopc/PIST Is Required for Synaptic Targeting of mGluR5. *Mol Neurobiol.* 58: 5618-5634.
- Kobelska-Dubiel N, Klincewicz B & Cichy W (2014) Liver disease in cystic fibrosis. *Prz Gastroenterol.* 9: S. 136-41.
- Koliwer J (2014) Die Rolle des PDZ-Domänenproteins PIST bei der subzellulären Sortierung von Neurotransmitterrezeptoren. *Naturwissenschaftliche Dissertation.* Universität Hamburg.
- Koliwer J, Park M, Bauch C, Von Zastrow M & Kreienkamp HJ (2015) The golgi-associated PDZ domain protein PIST/GOPC stabilizes the beta1-adrenergic receptor in intracellular compartments after internalization. *J Biol Chem.* 290: 6120-9.
- Kreft ME, Jerman UD, Lasič E, Hevir-Kene N, Rižner TL, Peternel L & Kristan K (2015) The characterization of the human cell line Calu-3 under different culture conditions and its use as an optimized in vitro model to investigate bronchial epithelial function. *Eur J Pharm Sci.* 69: 1-9.
- Kundu R, Cushing PR, Popp BV, Zhao Y, Madden DR & Ball ZT (2012) Hybrid organic-inorganic inhibitors of a PDZ interaction that regulates the endocytic fate of CFTR. *Angew Chem Int Ed Engl.* 51: 7217-20.
- Lee JH, Richter W, Namkung W, Kim KH, Kim E, Conti M & Lee MG (2007) Dynamic regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by competitive interactions of molecular adaptors. *J Biol Chem.* 282: 10414-22.
- Lee TW, Southern KW, Perry LA, Penny-Dimri JC & Aslam AA (2016) Topical cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene replacement for cystic fibrosis-related lung disease. *Cochrane Database Syst Rev.*
- Li L & Somerset S (2014) Digestive system dysfunction in cystic fibrosis: challenges for nutrition therapy. *Dig Liver Dis.* 46: S. 865-74.
- Lorente-Rodriguez A & Barlowe C (2011) Entry and exit mechanisms at the cis-face of the Golgi complex. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3.
- Lu Y, Xiong X, Helm A, Kimani K, Bragin A & Skach WR (1998) Co- and posttranslational translocation mechanisms direct cystic fibrosis

- transmembrane conductance regulator N terminus transmembrane assembly. *J Biol Chem.* 273: 568-76.
- Macvinish LJ, Cope G, Ropenga A & Cuthbert AW (2007) Chloride transporting capability of Calu-3 epithelia following persistent knockdown of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR. *Br J Pharmacol.* 150: 1055-65.
- Madácsy T, Pallagi P & Maleth J (2018) Cystic Fibrosis of the Pancreas: The Role of CFTR Channel in the Regulation of Intracellular Ca(2+) Signaling and Mitochondrial Function in the Exocrine Pancreas. *Front Physiol.* 9: 1585.
- Magalhaes AC, Dunn H & Ferguson SS (2012) Regulation of GPCR activity, trafficking and localization by GPCR-interacting proteins. *Br J Pharmacol.* 165: 1717-1736.
- Marin L, Traini D, Bebawy M, Colombo P, Buttini F, Haghi M, Ong HX & Young P (2013) Multiple dosing of simvastatin inhibits airway mucus production of epithelial cells: implications in the treatment of chronic obstructive airway pathologies. *Eur J Pharm Biopharm.* 84: 566-72.
- Matsui H, Grubb BR, Tarran R, Randell SH, Gatzky JT, Davis CW & Boucher RC (1998) Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell.* 95: S. 1005-15.
- Milewski MI, Mickle JE, Forrest JK, Stafford DM, Moyer BD, Cheng J, Guggino WB, Stanton BA & Cutting GR (2001) A PDZ-binding motif is essential but not sufficient to localize the C terminus of CFTR to the apical membrane. *J Cell Sci.* 114: 719-26.
- Monterisi S, Favia M, Guerra L, Cardone RA, Marzulli D, Reshkin SJ, Casavola V & Zaccolo M (2012) CFTR regulation in human airway epithelial cells requires integrity of the actin cytoskeleton and compartmentalized cAMP and PKA activity. *J Cell Sci.* 125: 1106-17.
- Morales FC, Takahashi Y, Momin S, Adams H, Chen X & Georgescu MM (2007) NHERF1/EBP50 head-to-tail intramolecular interaction masks association with PDZ domain ligands. *Mol Cell Biol.* 27: 2527-37.
- Moran A, Dunitz J, Nathan B, Saeed A, Holme B & Thomas W (2009) Cystic fibrosis-related diabetes: current trends in prevalence, incidence, and mortality. *Diabetes Care.* 32: 1626-31.
- Moyer BD, Denton J, Karlson KH, Reynolds D, Wang S, Mickle JE, Milewski M, Cutting GR, Guggino WB, Li M & Stanton BA (1999) A PDZ-interacting domain in CFTR is an apical membrane polarization signal. *J Clin Invest.* 104: 1353-61.
- Moyer BD, Duhaime M, Shaw C, Denton J, Reynolds D, Karlson KH, Pfeiffer J, Wang S, Mickle JE, Milewski M, Cutting GR, Guggino WB, Li M & Stanton BA (2000) The PDZ-interacting domain of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is required for functional expression in the apical plasma membrane. *J Biol Chem.* 275: 27069-74.
- Naehrig S, Chao CM & Naehrlich L (2017) Cystic Fibrosis: Diagnosis and Treatment. *Dtsch Arztebl Int.* 114: S. 564-74.
- Needham PG & Brodsky JL (2013) How early studies on secreted and membrane protein quality control gave rise to the ER associated degradation (ERAD) pathway: the early history of ERAD. *Biochim Biophys Acta.* 1833: 2447-57.
- Neudauer CL, Joberty G & Macara IG (2001) PIST: a novel PDZ/coiled-coil domain binding partner for the rho-family GTPase TC10. *Biochem Biophys Res Commun.* 280: 541-7.

- Okiyoneda T, Harada K, Takeya M, Yamahira K, Wada I, Shuto T, Suico MA, Hashimoto Y & Kai H (2004) Delta F508 CFTR pool in the endoplasmic reticulum is increased by calnexin overexpression. *Mol Biol Cell*. 15: 563-74.
- Ooi CY, Dorfman R, Cipolli M, Gonska T, Castellani C, Keenan K, Freedman SD, Zielenski J, Berthiaume Y, Corey M, Schibli S, Tullis E & Durie PR (2011) Type of CFTR mutation determines risk of pancreatitis in patients with cystic fibrosis. *Gastroenterology*. 140: 153-61.
- Paasche JD, Attramadal T, Kristiansen K, Oksvold MP, Johansen HK, Huitfeldt HS, Dahl SG & Attramadal H (2005) Subtype-specific sorting of the ETA endothelin receptor by a novel endocytic recycling signal for G protein-coupled receptors. *Mol Pharmacol*. 67: 1581-90.
- Pelaseyed T & Hansson GC (2011) CFTR anion channel modulates expression of human transmembrane mucin MUC3 through the PDZ protein GOPC. *J Cell Sci*. 124: 3074-83.
- Pezzulo AA, Tang XX, Hoegger MJ, Abou Alaiwa MH, Ramachandran S, Moninger TO, Karp PH, Wohlford-Lenane CL, Haagsman HP, Van Eijk M, Bánfi B, Horswill AR, Stoltz DA, Mccray PB, Jr., Welsh MJ & Zabner J (2012) Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung. *Nature*. 487: 109-13.
- Piserchio A, Fellows A, Madden DR & Mierke DF (2005) Association of the cystic fibrosis transmembrane regulator with CAL: structural features and molecular dynamics. *Biochemistry*. 44: 16158-66.
- Pranke IM & Sermet-Gaudelus I (2014) Biosynthesis of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Int J Biochem Cell Biol*. 52: S. 26-38.
- Qian Z, Xu X, Amacher JF, Madden DR, Cormet-Boyaka E & Pei D (2015) Intracellular Delivery of Peptidyl Ligands by Reversible Cyclization: Discovery of a PDZ Domain Inhibitor that Rescues CFTR Activity. *Angew Chem Int Ed Engl*. 54: 5874-8.
- Quinton PM (2008) Cystic fibrosis: impaired bicarbonate secretion and mucoviscidosis. *Lancet*. 372: 415-7.
- Ren A, Zhang W, Yarlagadda S, Sinha C, Arora K, Moon CS & Naren AP (2013) MAST205 competes with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)-associated ligand for binding to CFTR to regulate CFTR-mediated fluid transport. *J Biol Chem*. 288: 12325-34.
- Roberts KE, Cushing PR, Boisguerin P, Madden DR & Donald BR (2012) Computational design of a PDZ domain peptide inhibitor that rescues CFTR activity. *PLoS Comput Biol*. 8: e1002477.
- Rogan MP, Stoltz DA & Hornick DB (2011) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator intracellular processing, trafficking, and opportunities for mutation-specific treatment. *Chest*. 139: 1480-1490.
- Rubenstein RC & Zeitlin PL (2000) Sodium 4-phenylbutyrate downregulates Hsc70: implications for intracellular trafficking of DeltaF508-CFTR. *Am J Physiol Cell Physiol*. 278: C259-67.
- Saint-Criq V & Gray MA (2017) Role of CFTR in epithelial physiology. *Cell Mol Life Sci*. 74: 93-115.
- Saponaro C, Malfettone A, Dell'endice TS, Brunetti AE, Achimas-Cadariu P, Paradiso A & Mangia A (2014) The prognostic value of the Na(+)/ H(+) exchanger regulatory factor 1 (NHERF1) protein in cancer. *Cancer Biomark*. 14: 177-84.
- Sathe M & Houwen R (2017) Meconium ileus in Cystic Fibrosis. *J Cyst Fibros*. 16 Suppl 2: S. 32-39.

- Schaletzky J & Rapoport TA (2006) Ribosome binding to and dissociation from translocation sites of the endoplasmic reticulum membrane. *Mol Biol Cell*. 17: 3860-9.
- Schnúr A, Premchandrar A, Bagdany M & Lukacs GL (2019) Phosphorylation-dependent modulation of CFTR macromolecular signalling complex activity by cigarette smoke condensate in airway epithelia. *Sci Rep*. 9: 12706.
- Sharma N, Larusch J, Sosnay PR, Gottschalk LB, Lopez AP, Pellicore MJ, Evans T, Davis E, Atalar M, Na CH, Rosson GD, Belchis D, Milewski M, Pandey A & Cutting GR (2016) A sequence upstream of canonical PDZ-binding motif within CFTR COOH-terminus enhances NHERF1 interaction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 311: L1170-11182.
- Shen BQ, Finkbeiner WE, Wine JJ, Mrsny RJ & Widdicombe JH (1994) Calu-3: a human airway epithelial cell line that shows cAMP-dependent Cl<sup>-</sup> secretion. *Am J Physiol*. 266: L493-501.
- Sheng M & Sala C (2001) PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu Rev Neurosci*. 24: 1-29.
- Shenolikar S & Weinman EJ (2001) NHERF: targeting and trafficking membrane proteins. *Am J Physiol Renal Physiol*. 280: F389-95.
- Short DB, Trotter KW, Reczek D, Kreda SM, Bretscher A, Boucher RC, Stutts MJ & Milgram SL (1998) An apical PDZ protein anchors the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the cytoskeleton. *J Biol Chem*. 273: 19797-801.
- Siemens J, Lillo C, Dumont RA, Reynolds A, Williams DS, Gillespie PG & Müller U (2004) Cadherin 23 is a component of the tip link in hair-cell stereocilia. *Nature*. 428: 950-5.
- Smith JJ, Travis SM, Greenberg EP & Welsh MJ (1996) Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell*. 85: S. 229-36.
- Songyang Z, Fanning AS, Fu C, Xu J, Marfatia SM, Chishti AH, Crompton A, Chan AC, Anderson JM & Cantley LC (1997) Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science*. 275: 73-7.
- Stutts MJ, Canessa CM, Olsen JC, Hamrick M, Cohn JA, Rossier BC & Boucher RC (1995) CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science*. 269: 847-50.
- Sun F, Hug MJ, Bradbury NA & Frizzell RA (2000a) Protein kinase A associates with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator via an interaction with ezrin. *J Biol Chem*. 275: 14360-6.
- Sun F, Hug MJ, Lewarchik CM, Yun CH, Bradbury NA & Frizzell RA (2000b) E3KARP mediates the association of ezrin and protein kinase A with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in airway cells. *J Biol Chem*. 275: 29539-46.
- Swiatecka-Urban A, Duhaime M, Coutermarsh B, Karlson KH, Collawn J, Milewski M, Cutting GR, Guggino WB, Langford G & Stanton BA (2002) PDZ domain interaction controls the endocytic recycling of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem*. 277: 40099-105.
- Taylor CJ & Aswani N (2002) The pancreas in cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev*. 3: S. 77-81.
- Trejo J (2005) Internal PDZ ligands: novel endocytic recycling motifs for G protein-coupled receptors. *Mol Pharmacol*. 67: 1388-90.
- Vaccaro P & Dente L (2002) PDZ domains: troubles in classification. *FEBS Lett*. 512: 345-9.

- Vankeerberghen A, Cuppens H & Cassiman JJ (2002) The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. *J Cyst Fibros.* 1: S. 13-29.
- Varga K, Jurkuvenaite A, Wakefield J, Hong JS, Guimbellot JS, Venglarik CJ, Niraj A, Mazur M, Sorscher EJ, Collawn JF & Bebok Z (2004) Efficient intracellular processing of the endogenous cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in epithelial cell lines. *J Biol Chem.* 279: S. 22578-84.
- Vashist S & Ng DT (2004) Misfolded proteins are sorted by a sequential checkpoint mechanism of ER quality control. *J Cell Biol.* 165: 41-52.
- Vouilleme L, Cushing PR, Volkmer R, Madden DR & Boisguerin P (2010) Engineering peptide inhibitors to overcome PDZ binding promiscuity. *Angew Chem Int Ed Engl.* 49: 9912-6.
- Wang S, Raab RW, Schatz PJ, Guggino WB & Li M (1998) Peptide binding consensus of the NHE-RF-PDZ1 domain matches the C-terminal sequence of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *FEBS Lett.* 427: 103-8.
- Wang S, Yue H, Derin RB, Guggino WB & Li M (2000) Accessory protein facilitated CFTR-CFTR interaction, a molecular mechanism to potentiate the chloride channel activity. *Cell.* 103: 169-79.
- Wang X, Matteson J, An Y, Moyer B, Yoo JS, Bannykh S, Wilson IA, Riordan JR & Balch WE (2004) COPII-dependent export of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from the ER uses a di-acidic exit code. *J Cell Biol.* 167: 65-74.
- Ward CL & Kopito RR (1994) Intracellular turnover of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Inefficient processing and rapid degradation of wild-type and mutant proteins. *J Biol Chem.* 269: 25710-8.
- Ward CL, Omura S & Kopito RR (1995) Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell.* 83: S. 121-7.
- Wente W, Stroh T, Beaudet A, Richter D & Kreienkamp HJ (2005) Interactions with PDZ domain proteins PIST/GOPC and PDZK1 regulate intracellular sorting of the somatostatin receptor subtype 5. *J Biol Chem.* 280: 32419-25.
- Wolde M, Fellows A, Cheng J, Kivenson A, Coutermarsh B, Talebian L, Karlson K, Piserchio A, Mierke DF, Stanton BA, Guggino WB & Madden DR (2007) Targeting CAL as a negative regulator of DeltaF508-CFTR cell-surface expression: an RNA interference and structure-based mutagenetic approach. *J Biol Chem.* 282: 8099-109.
- Woods DF & Bryant PJ (1991) The discs-large tumor suppressor gene of *Drosophila* encodes a guanylate kinase homolog localized at septate junctions. *Cell.* 66: 451-64.
- Wu Y, Wang S & Li C (2012) In vitro analysis of PDZ-dependent CFTR macromolecular signaling complexes. *J Vis Exp.*
- Xu XZ, Choudhury A, Li X & Montell C (1998) Coordination of an array of signaling proteins through homo- and heteromeric interactions between PDZ domains and target proteins. *J Cell Biol.* 142: 545-55.
- Xu Z, Oshima K & Heller S (2010) PIST regulates the intracellular trafficking and plasma membrane expression of cadherin 23. *BMC Cell Biol.* 11: 80.
- Yao R, Maeda T, Takada S & Noda T (2001) Identification of a PDZ domain containing Golgi protein, GOPC, as an interaction partner of frizzled. *Biochem Biophys Res Commun.* 286: 771-8.

- Yao R, Ito C, Natsume Y, Sugitani Y, Yamanaka H, Kuretake S, Yanagida K, Sato A, Toshimori K & Noda T (2002) Lack of acrosome formation in mice lacking a Golgi protein, GOPC. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99: 11211-6.
- Younger JM, Chen L, Ren HY, Rosser MF, Turnbull EL, Fan CY, Patterson C & Cyr DM (2006) Sequential quality-control checkpoints triage misfolded cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Cell.* 126: 571-82.
- Yun CH, Lamprecht G, Forster DV & Sidor A (1998) NHE3 kinase A regulatory protein E3KARP binds the epithelial brush border Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE3 and the cytoskeletal protein ezrin. *J Biol Chem.* 273: 25856-63.
- Zabner J, Smith JJ, Karp PH, Widdicombe JH & Welsh MJ (1998) Loss of CFTR chloride channels alters salt absorption by cystic fibrosis airway epithelia in vitro. *Mol Cell.* 2: S. 397-403.
- Zhang Z, Liu F & Chen J (2017) Conformational Changes of CFTR upon Phosphorylation and ATP Binding. *Cell.* 170: 483-491.e8.
- Zhao Y, Cushing PR, Smithson DC, Pellegrini M, Pletnev AA, Al-Ayyoubi S, Grassetti AV, Gerber SA, Guy RK & Madden DR (2018) Cysteine modifiers suggest an allosteric inhibitory site on the CAL PDZ domain. *Biosci Rep.* 38.
- Zorn-Kruppa M, Vidal YSS, Houdek P, Wladykowski E, Grzybowski S, Gruber R, Gorzelanny C, Harcup J, Schneider SW, Majumdar A & Brandner JM (2018) Tight Junction barriers in human hair follicles - role of claudin-1. *Sci Rep.* 8: 12800.

## IV. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die durch ihre fachliche und persönliche Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zuerst gebührt mein ganz besonderer Dank Prof. Hans-Jürgen Kreienkamp, für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können und für die Betreuung. Auch für die hilfreichen Anregungen und die konstruktive Kritik bei der Erstellung dieser Arbeit möchte ich mich herzlich bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Kreienkamp, Kindler, Kutsche und Rosenberger des Instituts für Humangenetik für das freundschaftliche Miteinander, das tolle Arbeitsklima und die hilfreichen Diskussionen bedanken. Besonders möchte ich an dieser Stelle Dr. André Friedrich, Dr. Edward Pan, Dr. Fatemeh Hasani-Nia, Dr. Judith Koliwer, Dr. Malte Klüssendorf, Dr. Victoria Martens und Hans-Hinrich Hönck hervorheben. Die tolle Zusammenarbeit und Unterstützung in wissenschaftlicher Hinsicht haben diese Arbeit maßgeblich beeinflusst. Ein großer Dank gilt hier im besonderen Dr. Judith Koliwer und Dr. Malte Klüssendorf für die hervorragende und geduldige Einarbeitung in dieses Projekt. Dr. Victoria Martens, Thomas Baumeister und mein Vater haben mir durch das kritische Korrekturlesen der Arbeit sehr geholfen. Auch hierfür ein herzliches Dankeschön. Mein Dank gilt auch den zahlreichen Personen, die durch Ihre Unterstützung und Hilfe, Teile dieser Arbeit erst ermöglicht haben (willkürliche Reihenfolge): Prof. Dr. med. Catherine Meyer-Schwesinger, Dr. Katja Bäsler, Pia Houdek, Sabine Vidal-y-sy und Ewa Wladykowski sowie den MitarbeiterInnen der Versuchstierhaltung und der Mikroskopie Facility des UKE.

Finanziert wurde das Projekt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Graduiertenkollegs 1459 „Sortierung und Interaktionen zwischen Proteinen subzellulärer Kompartimente“. Daher möchte ich mich insbesondere bei Prof. Dr. Thomas Braulke und Dr. Dorthe Labontè für die Organisation des Graduiertenkollegs bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht und mich in all meinen Entscheidungen unterstützt haben. Schließlich danke ich meinen Freunden während der Studienzeit für viele sehr schöne Jahre in Hamburg.

## V. Lebenslauf

Lebenslauf aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht enthalten.

## **VI. Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....