

**Universität Ulm**

**Zentrale Einrichtung Elektronenmikroskopie**

**Professor Dr. Paul Walther**

**Neue korrelative mikroskopische Methoden zur  
ultrastrukturellen Lokalisation von *green fluorescent  
protein* und Proteinkinase D2 in kultivierten humanen  
Pankreas-Karzinoidzellen**

---

**Dissertation**

**zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie**

**der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm**

**Holger Krisp**

**Ulm**

**2009**

**Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin**

**1. Berichtserstatter: Prof. Dr. Paul Walther**

**2. Berichtserstatter: PD Dr. Götz von Wichert**

**Tag der Promotion: 15. Januar 2010**

## Inhaltsverzeichnis

|                                                                     |           |
|---------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b>                                        | <b>IV</b> |
| <b>1. Einleitung</b>                                                | <b>1</b>  |
| 1.1. <u>Proteinkinase D2 (PKD2)</u>                                 | 1         |
| 1.1.1. <u>Proteinkinasen</u>                                        | 1         |
| 1.1.2. <u>Klassifikation</u>                                        | 1         |
| 1.1.3. <u>Aktivierungsmechanismen</u>                               | 3         |
| 1.1.4. <u>Golgi-Apparat und PKD</u>                                 | 4         |
| 1.2. <u>Grün Fluoreszierendes Protein (GFP)</u>                     | 6         |
| 1.3. <u>Elektronenmikroskopie</u>                                   | 7         |
| 1.3.1. <u>Transmissionselektronenmikroskop (TEM)</u>                | 8         |
| 1.3.2. <u>Raster-Transmissionselektronenmikroskop (STEM)</u>        | 10        |
| 1.3.3. <u>Präparationsmethoden in der Elektronenmikroskopie</u>     | 11        |
| 1.3.3.1. <i>Chemische Fixation</i>                                  | 12        |
| 1.3.3.2. <i>Hochdruckkryofixation</i>                               | 12        |
| 1.3.3.3. <i>Gefriersubstitution</i>                                 | 14        |
| 1.4. <u>Ziel der Arbeit</u>                                         | 14        |
| <b>2. Materialien</b>                                               | <b>15</b> |
| 2.1. <u>Chemikalien</u>                                             | 15        |
| 2.2. <u>Lösungen, Medien und Puffer</u>                             | 15        |
| 2.3. <u>Enzyme, Marker und Kits</u>                                 | 18        |
| 2.4. <u>Zelllinien</u>                                              | 18        |
| 2.5. <u>Pankreasgewebe</u>                                          | 18        |
| 2.6. <u>Geräte und Verbrauchsmaterialien</u>                        | 18        |
| 2.7. <u>Antikörper</u>                                              | 20        |
| 2.8. <u>Software</u>                                                | 21        |
| <b>3. Methoden</b>                                                  | <b>22</b> |
| 3.1. <u>Molekular- und Zellbiologie</u>                             | 22        |
| 3.1.1. <u>Transfektionsmethoden</u>                                 | 22        |
| 3.1.1.1. <i>Nucleofector-Transfektion</i>                           | 22        |
| 3.1.1.2. <i>Transfektion mit Nanofektin</i>                         | 23        |
| 3.1.2. <u>Kontrolle der Transfektionsrate</u>                       | 23        |
| 3.2. <u>Elektronenmikroskopie</u>                                   | 24        |
| 3.2.1. <u>Vorbereitung der Saphirdisks</u>                          | 24        |
| 3.2.2. <u>Formvarbefilmung der Kupfernetzchen und Lochblenden</u>   | 24        |
| 3.2.3. <u>Chemische Fixation und Einbettung in Epon und LR-Gold</u> | 25        |
| 3.2.4. <u>Hochdruckkryofixation</u>                                 | 27        |
| 3.2.4.1. <i>Pankreasgewebe</i>                                      | 27        |
| 3.2.4.2. <i>Cellulosekapillare</i>                                  | 27        |
| 3.2.4.3. <i>Saphirdisks</i>                                         | 28        |
| 3.2.4.4. <i>Kryosubstitution und Einbettung</i>                     | 29        |

|           |                                                                                                                                                                                                                                 |           |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.5.    | Anfertigung von Semi- und Ultradünnschnitten.....                                                                                                                                                                               | 30        |
| 3.2.6.    | Besonderheiten der Präparation von STEM-Proben.....                                                                                                                                                                             | 31        |
| 3.3.      | <u>Immunmarkierung an LR-Gold Schnitten</u> .....                                                                                                                                                                               | 32        |
| 3.4.      | <u>DAPI-Kernfärbung</u> .....                                                                                                                                                                                                   | 33        |
| 3.5.      | <u>Licht- und Elektronenmikroskope</u> .....                                                                                                                                                                                    | 33        |
| 3.6.      | <u>Statistische Auswertungen</u> .....                                                                                                                                                                                          | 34        |
| 3.6.1.    | Statistische Auswertung der Immunmarkierungen.....                                                                                                                                                                              | 35        |
| 3.6.2.    | Statistische Untersuchungen am Golgi-Apparat.....                                                                                                                                                                               | 36        |
| <b>4.</b> | <b>Ergebnisse</b> .....                                                                                                                                                                                                         | <b>37</b> |
| 4.1.      | <u>Voruntersuchungen</u> .....                                                                                                                                                                                                  | 37        |
| 4.1.1.    | Elektronenmikroskopische Voruntersuchungen.....                                                                                                                                                                                 | 37        |
| 4.1.1.1.  | <i>Einbettungsverfahren für die Immunmarkierung</i> .....                                                                                                                                                                       | 37        |
| 4.1.1.2.  | <i><math>\alpha</math>-Amylase- und Insulin-Immunogoldmarkierung</i> .....                                                                                                                                                      | 40        |
| 4.1.2.    | Lichtmikroskopische Voruntersuchungen an lebenden humanen<br>Karzinoidzellen (BON).....                                                                                                                                         | 42        |
| 4.2.      | <u>Korrelative Mikroskopie an humanen Karzinoidzellen (BON) und exokrinen<br/>Ratten Pankreaskarzinomzellen (AR42J), die mit PKD2-Konstrukt-DNA<br/>transfiziert und mit pmaxGFP-DNA cotransfiziert wurden (Abb. 13A)</u> ..... | 44        |
| 4.2.1.    | Humane Karzinoidzelllinie (BON).....                                                                                                                                                                                            | 44        |
| 4.2.1.1.  | <i>Kombination von Fluoreszenz- und Transmissionselektronen-<br/>mikroskopie an Ultradünnschnitten</i> .....                                                                                                                    | 44        |
| 4.2.1.2.  | <i>GFP-Immunmarkierung</i> .....                                                                                                                                                                                                | 47        |
| 4.2.2.    | Exokrine Ratten-Pankreaskarzinomzelllinie (AR42J).....                                                                                                                                                                          | 51        |
| 4.3.      | <u>Untersuchungen an humanen Karzinoidzellen (BON) transfiziert mit pEGFP<br/>getaggtter PKD2-Konstrukt-DNA (Abb. 13B)</u> .....                                                                                                | 51        |
| 4.3.1.    | Kombination von Fluoreszenz- und Transmissionselektronen-<br>mikroskopie an Ultradünnschnitten.....                                                                                                                             | 51        |
| 4.3.2.    | Immunmarkierung.....                                                                                                                                                                                                            | 52        |
| 4.3.2.1.  | <i>GFP-Immunmarkierung</i> .....                                                                                                                                                                                                | 52        |
| 4.3.2.2.  | <i>PKD2-Immunmarkierung</i> .....                                                                                                                                                                                               | 55        |
| 4.3.2.3.  | <i>Lokalisation des PKD2-Expressionsbereiches mit Hilfe eines Cy3-<br/>Fluoreszenz Sekundärantikörpers</i> .....                                                                                                                | 57        |
| 4.3.3.    | Morphologie des Golgi-Apparates.....                                                                                                                                                                                            | 58        |
| 4.3.3.1.  | <i>Statistische Auswertung der Golgi-Apparate an Ultra-<br/>dünnschnitten (zwei dimensionale TEM Bilder)</i> .....                                                                                                              | 58        |
| 4.3.4.    | Golgimorphologie mit Hilfe von STEM Tomographie.....                                                                                                                                                                            | 60        |
| 4.3.4.1.  | <i>Voruntersuchung an nicht-transfizierten BON Zellen</i> .....                                                                                                                                                                 | 60        |
| 4.3.4.2.  | <i>Untersuchungen der Golgimorphologie an mit pEGFPKD2<br/>transfizierten BON Zellen</i> .....                                                                                                                                  | 63        |
| <b>5.</b> | <b>Diskussion</b> .....                                                                                                                                                                                                         | <b>67</b> |
| 5.1.      | <u>Voruntersuchungen</u> .....                                                                                                                                                                                                  | 67        |
| 5.1.1.    | Elektronenmikroskopische Voruntersuchungen.....                                                                                                                                                                                 | 67        |
| 5.1.1.1.  | <i>Einbettungsverfahren für die Immunmarkierung</i> .....                                                                                                                                                                       | 68        |
| 5.1.1.2.  | <i><math>\alpha</math>-Amylase und Insulin-Immunogoldmarkierung</i> .....                                                                                                                                                       | 69        |

|                                                                                                                                                 |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.1.2. Lichtmikroskopische Voruntersuchungen an lebenden humanen Karzinoidzellen (BON).....                                                     | 70        |
| 5.2. <u>Korrelative Mikroskopie an Karzinoidzellen, die mit PKD2-Konstrukt-DNA transfiziert und mit pmaxGFP-DNA cotransfiziert wurden</u> ..... | 70        |
| 5.3. <u>Untersuchungen an Karzinoidzellen die mit pEGFP getaggtter PKD2-Konstrukt-DNA transfiziert wurden</u> .....                             | 71        |
| 5.3.1. Immunmarkierung.....                                                                                                                     | 72        |
| 5.3.2. Zweidimensionale Charakterisierung des Golgi-Apparates.....                                                                              | 73        |
| 5.3.3. Dreidimensionale Charakterisierung des Golgi-Apparates mit Hilfe von STEM Tomographie.....                                               | 73        |
| <b>6. Zusammenfassung.....</b>                                                                                                                  | <b>74</b> |
| <b>7. Ausblick.....</b>                                                                                                                         | <b>76</b> |
| <b>8. Referenzen.....</b>                                                                                                                       | <b>77</b> |
| <b>9. Anhang.....</b>                                                                                                                           | <b>83</b> |
| 9.1. <u>Rohdaten</u> .....                                                                                                                      | 83        |
| <b>10. Danksagung.....</b>                                                                                                                      | <b>93</b> |
| <b>11. Lebenslauf.....</b>                                                                                                                      | <b>94</b> |

## Abkürzungsverzeichnis

|                 |                                    |
|-----------------|------------------------------------|
| ° C             | Grad Celsius                       |
| µg              | Mikrogramm                         |
| µl              | Mikroliter                         |
| µm              | Mikrometer                         |
| Å               | Ångström (1 Å = 0,1 nm)            |
| Abb.            | Abbildung                          |
| ADP             | Adenosindiphosphat                 |
| Aqua demin.     | Aqua demineralisata                |
| Aqua bidest.    | Aqua bidestillata                  |
| Arf             | ADP-Ribosylierungsfaktor           |
| ATP             | Adenosintriphosphat                |
| BSA             | Bovine serum albumin               |
| bzw.            | Beziehungsweise                    |
| ca.             | circa                              |
| CGN             | cis-Golgi-Netzwerk                 |
| CO <sub>2</sub> | Kohlendioxid                       |
| COP             | Coat protein                       |
| Cy3             | Carbocyanin 3                      |
| D               | Tag                                |
| DAG             | Diacylglycerin                     |
| DAPI            | 4',6-Diamidino-2-phenylindol       |
| DNA             | Desoxyribonucleic acid             |
| EDTA            | Ethylendiamintetraessigsäure       |
| ER              | Endoplasmatisches Retikulum        |
| GDP             | Guanosin-5'-Diphosphat             |
| GEF             | Guanosin-Nucleotid-Austauschfaktor |
| GFP             | Grün fluoreszierendes Protein      |
| GTP             | Guanosin-5'-Triphosphat            |
| h               | Stunde(n)                          |
| mbar            | Millibar                           |
| mg              | Milligramm                         |
| min             | Minute                             |

|      |                                         |
|------|-----------------------------------------|
| ml   | Milliliter                              |
| mm   | Millimeter                              |
| mM   | Millimolar                              |
| ms   | Millisekunden                           |
| nm   | Nanometer                               |
| PBS  | Phosphat buffered saline                |
| PKD  | Proteinkinase D                         |
| PKD2 | Proteinkinase D2                        |
| rpm  | rounds per minute                       |
| RT   | Raumtemperatur                          |
| s.o. | Siehe oben                              |
| STEM | Raster-Transmissionselektronenmikroskop |
| Tab  | Tabelle                                 |
| TEM  | Transmissionselektronenmikroskop        |
| TGN  | Trans-Golgi-Netzwerk                    |
| UV   | Ultraviolett                            |
| V    | Volt                                    |
| ZE   | Zentrale Einrichtung                    |

# 1. Einleitung

## 1.1. Proteinkinase D2 (PKD2)

### 1.1.1. Proteinkinasen

Proteinkinasen stellen die zweitgrößte Proteinfamilie in eukaryonten Zellen dar. Etwa 2-3 % der Gene des menschlichen Genoms kodieren für Proteinkinasen (Hunter & Plowman, 1997). Die 518 bekannten humanen Proteinkinasen regeln Zellwachstum, Migration, Motilität, Differenzierung sowie Apoptose (Manning et al., 2002). Eine unkontrollierte Aktivierung dieser Kinasen führt zu einer Vielzahl von Erkrankungen. Es sind bislang etwa 400 Erkrankungen bekannt, die auf solche Funktionsstörungen zurückzuführen sind (Melnikova, 2004). Die Proteinkinasen gelten daher als eine bevorzugte Zielstruktur für die Entwicklung neuer Medikamente. Bereits heute beeinflussen einige auf dem Markt befindlichen Pharmaka die Kinasewirkung mit steigender Tendenz (Melnikova, 2004).

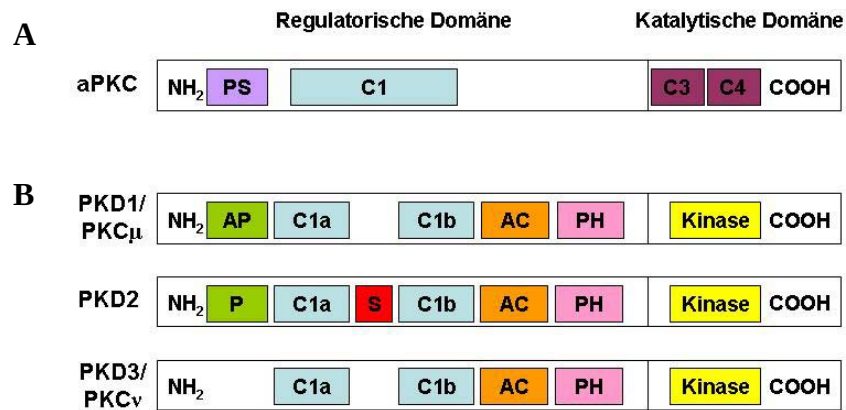
### 1.1.2. Klassifikation

Proteinkinasen können Aminosäuren phosphorylieren und werden nach ihrer Spezifität in zwei Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe phosphoryliert die Hydroxylgruppen der Aminosäuren Serin und Threonin (Serin/Threoninproteinkinasen), während die zweite Gruppe Tyrosin (Tyrosinproteinkinasen) phosphoryliert (Krebs & Beavo, 1979; Robinson et al., 2000). Es sind jedoch auch Kinasen bekannt, die sowohl Serin und Threonin als auch Tyrosin phosphorylieren können (Lindberg et al., 1992).

Die Serin/Threoninproteinkinasen werden aufgrund ihrer Homologie und ihrer katalytischen Domäne wiederum in die AGC-Gruppe (Proteinkinasen A, G und C), die CAMK-Gruppe ( $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin dependent kinases) und die CMGC-Gruppe (Cyclin dependent kinases, MAPKs, GSK3 und CK II) unterteilt (Manning et al., 2002).

Die Proteinkinase D2 gehört zu der Proteinkinase D (PKD) Familie, die aus drei strukturell verwandten Isoformen der Serin/Threoninproteinkinasen besteht: PKD1/PKC $\mu$ , PKD2 und PKD3/PKC $\nu$  (Hayashi et al., 1999; Sturany et al., 2001; 2002; Valverde et al., 1994; Van Lint et al., 2002; Eiseler, 2006; Abb. 1B). 1994 wurde PKD1/PKC $\mu$  zuerst als ein atypisches Mitglied der PKC Familie beschrieben (Johannes et al., 1994; Valverde et al., 1994). Da

jedoch die katalytischen Domänen von PKCs und PKDs nur geringe Ähnlichkeiten aufweisen (Abb.1A) und die katalytische Sequenz der PKDs ihrerseits eine hohe Homologie mit der CAMK-Domäne zeigt, wurden sie später als eine neue Subgruppe der CAMK aufgeführt (Mannig et al., 2002).



**Abb. 1: Vergleich zwischen den aPKCs und der PKD-Familie.**

(A) Schematische Darstellung von aPKCs. Die regulatorische Domäne besteht aus einer Pseudosubstratsequenz (PS) und einer DAG- und Phorbol ester bindenden Domäne (C1). Die katalytische Domäne besteht aus der ATP-bindende (C3) und aus der Substratbindende (C4) Domäne (nach Newton & Johnson, 1998).

(B) Übersicht der PKD-Familie. Bei der PKD1/PKC<sub>μ</sub> enthält die regulatorische Domäne unter anderem einen alanin- und prolinreichen Bereich (AP) während bei der PKD2 stattdessen eine prolinreiche Domäne (P) vorhanden ist. Alle PKDs enthalten cysteinreiche Domänen (C1a/C1b) und sind reich an Aminosäuren (Rykx et al., 2003). PKD2 enthält zusätzliche eine serinreiche Domäne (S) zwischen den C1a und C1b Domänen. Alle PKDs enthalten in ihrer regulatorischen Domäne noch azide Domänen (AC) und Pleckstrin-homologie Domänen (PH) (nach Van Lint et al., 2002).

PKDs sind Zielstrukturen für tumorfördernde Phorbol ester und gelten als ein Hauptangriffspunkt der PKC-Familie. Als Second-Messenger sind sie somit in viele zelluläre Funktionen eingebunden wie z.B. Golgiorganisation, der gerichtete Transport zur Plasmamembran (s.u.), die Regulation der Immunantwort, die Proliferation, die Apoptose und die zytoskelettale Reorganisation und Metastasierung (Rykx et al. 2003; van Lint et al. 2002). PKD2 wird ubiquitär exprimiert. Dabei ist die Expressionsrate in verschiedenen Zell- und Gewebstypen unterschiedlich hoch. Ein vermehrtes Vorkommen von PKD2 im Vergleich zu PKD1 wurde in Zellen von proliferierenden Geweben wie Darmmukosa und Testis, aber auch bei Pankreaskarzinomzellen beobachtet. Die Expressionsrate von PKD2 in Zellen aus einem gesunden Pankreas war dagegen im Vergleich zu PKD1 deutlich geringer (Johannes et al.,

1994; Sturany et al., 2001). Daraus lässt sich schließen, dass PKD2 ein Vermittler der tumorspezifische Eigenschaften sein könnte.

### 1.1.3. Aktivierungsmechanismen

PKDs werden während der Aktivierung an mehreren Stellen phosphoryliert. Die in der Aktivierungsschleife von PKD1 lokalisierte Stellen Ser744 und Ser748 scheinen dabei eine entscheidende Rolle zu spielen (Vertommen et al., 2000; Waldron et al., 2001). Analog hierzu sind bei PKD2 Ser706 und Ser710 zu nennen (Sturany et al., 2002).

Trotz des ähnlichen Aufbaus der PKDs und der daher vermutlich ähnlichen Wirkungsweise konnten mehrere Unterschiede zwischen PKD1 und PKD2 festgestellt werden. Bei PKD 1 führte beispielsweise die Deletion oder Blockade der PH-Domäne und der beiden Zinkfinger zu einer Aktivierung. Die beiden Abschnitte wirken also bei PKD1 inhibitorisch auf die katalytische Einheit (Rykx et al., 2003). Im Gegensatz dazu hat die C1a/C1b Domäne der PKD2 einen positiven Effekt auf die katalytische Aktivität, während ihre PH-Domäne analog der PKD1 als negativer Regulator der Enzymaktivität fungiert (Auer et al., 2005).

PKD ist durch diese Autoinhibition nur geringfügig katalytisch aktiv. Für die Auflösung dieser Inhibition bedarf es daher eine Interaktion mit anderen Substanzen.

PKD1 kann durch drei verschiedene Hauptmechanismen aktiviert werden:

1. Aktivierung mittels G-Proteine (GTP-bindende Proteine). Das G-Protein ist ein heterotrimeres Protein, das aus 3 Untereinheiten besteht ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ). Die Aktivierung des Rezeptors sorgt für den Austausch von GDP gegen GTP an der  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins. Daraufhin erfolgt eine Konformitätsänderung und es kann somit in die  $\alpha$ - und die  $\beta\gamma$ -Untereinheit dissoziieren. Die  $G\alpha$ -Untereinheit aktiviert Phospholipase C (PLC), die zu einer Produktion von Diacylglycerin (DAG) führt, das wiederum PKC $\epsilon$  und PKC $\eta$  aktiviert. Diese führen dann zu einer Phosphorylierung von Ser744/Ser748 in der Aktivierungsschleife der PKD. Dieser Mechanismus ist auch für PKD2 nachgewiesen worden, jedoch an Ser706/Ser710 und durch PKC $\alpha$ , PKC $\epsilon$  und PKC $\eta$  (Sturany et al., 2002).
2. Im Golgi-Apparat kann PKD1 durch die direkte Interaktion mit der  $G\beta\gamma$ -Untereinheit und der PH-Domäne aktivieren werden (Jamora et al., 1999).
3. Eine Caspase3 vermittelte Aktivierung (Endo et al., 2000).

PKDs besitzen zusätzlich gewisse Autophosphorylierungsfähigkeiten. Dabei wird Ser748 langsam autophosphoryliert um dadurch die Transphosphorylierung von Ser744 durch PKC $\epsilon$

zu ermöglichen. Somit wird die Aktivierung der PKD1 insgesamt beschleunigt (Waldron et al., 2003).

Da viele Wirkstoffe PKD1 und 2 in vivo über die Aktivierung von PKC aktivieren, wird der PLC-DAG-PKC-Signalweg nun noch näher ausgeführt:

PKDs sind in ihrer inaktiven Form meist im Zytoplasma und zu einem kleineren Teil im Golginetzwerk der Zelle lokalisiert (Rey et al., 2003 und 2004). Die oben genannte Produktion von DAG bewirkt eine Bewegung der PKDs vom Zytosol zur Plasmamembran (Auer et al., 2006; Maeda et al., 2001). Zusätzlich aktiviert DAG PKC $\alpha$ ,  $\epsilon$  und  $\eta$ , die so PKD1 an Ser744 und Ser748 (bzw. an entsprechenden Stellen PKD2) transphosphorylieren können. Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung der PKD und zu einer Aufhebung der PH-Domänen induzierten Autoinhibition. Dieser Prozess ist membrangebunden.

Die aktivierte PKD löst sich anschließend von der Zellmembran und dissoziiert in das Zytoplasma. Gleichzeitig kann die Aktivierung von PKD1 durch den GPCR-DAG-PKC-Signalweg auch zu einer verlängerten zellulären Antwort auf einen kurzen hormonalen Stimulus führen, indem ein kleiner Teil der aktivierten PKD1 mit ihrer C1b Region an die aktivierte G $\alpha$ -Untereinheit bindet, anstatt ins Zytoplasma zu dissoziieren (Oancea et al., 2003). Es gibt also bei PKC1 eine schnelle Antwort via C1a und eine protrahierte, über Stunden dauernde Antwort via C1b (Matthews et al., 2000; Oancea et al., 2003). Ob diese Variation auch für die anderen PKD-Isoformen gilt, ist noch nicht geklärt (Edenfeld, 2008).

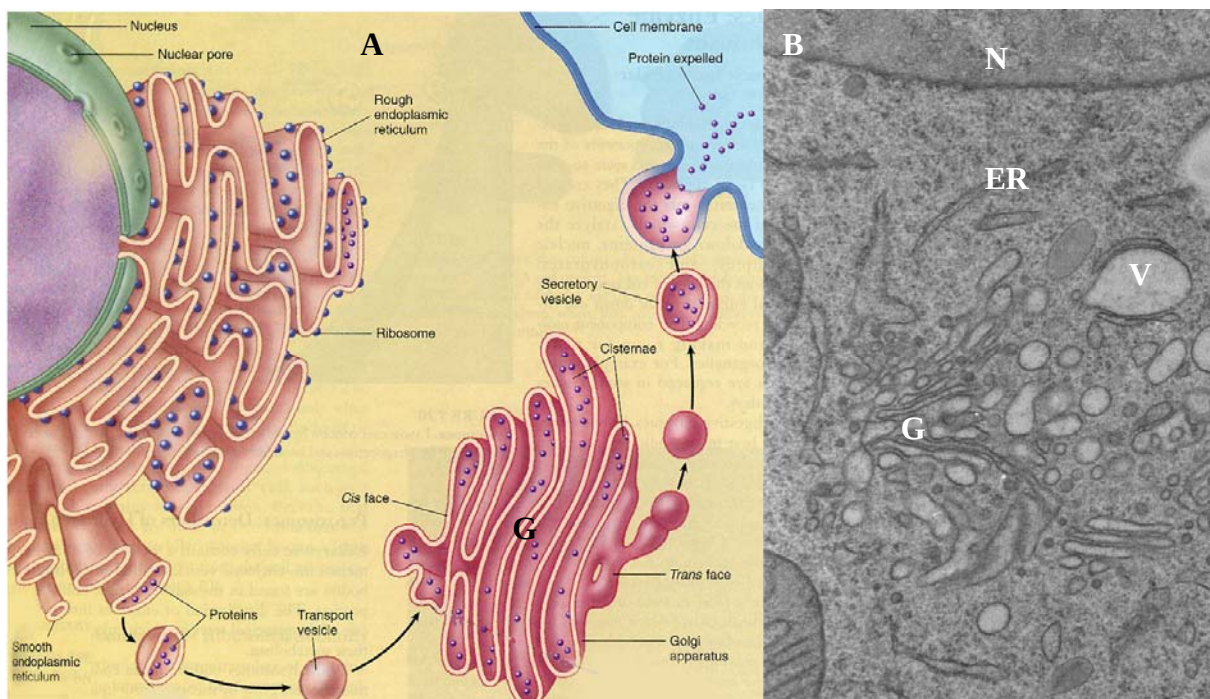
In Experimenten lässt sich die DAG Aktivierung durch Phorbolester, wie zum Beispiel 12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat (TPA) und Phorboldibutyrat (PDBu), nachahmen (Waldron et al., 2001; Zugaza et al., 1996).

#### 1.1.4. Golgi-Apparat und PKD

Der Golgi-Apparat zählt zu den Zellorganellen und bildet einen membranumschlossenen Reaktionsraum innerhalb der Zelle. Er besteht aus mehreren Zisternen und nimmt eine Schlüsselrolle im sekretorischen Transportsystem ein. Die relative Ausdehnung des Golgi-Apparates hängt eng mit der Aktivität und Funktion zusammen und kann daher stark variieren. Meist befindet sich der Golgi-Apparat nahe dem Zellkern und weist eine deutliche Polarisierung auf. Die dem endoplasmatischen Retikulum (ER) zugewandte Seite ist das cis-Golgi-Netzwerk (CGN). Vom CGN können Vesikel vom ER empfangen, jedoch auch zu diesem geschickt werden. Die dem ER abgewandte Seite wird als trans-Golgi-Netzwerk

(TGN) bezeichnet (Abb. 2). Bei der Sekretion werden unreife Vesikel im TGN abgeschnürt und durch schnellen Mikrotubulus-assoziierten Transport in den submembranen Reservepool überführt. Dort erfolgt eine Reifung zu Sekretgranula, die dann mit Hilfe des Aktinzytoskeletts exozytiert werden (Tooze et al., 1991). Störungen dieser grundlegenden Mechanismen sind Krankheitsbilder wie die akute Pankreatitis (fehlgeleitete Sekretion) oder neuroendokrine Tumore (Hypersekretion).

Zusammenfassend lässt sich sagen das das Golgi-System als Verteilungs- und Sortierstation zahlreicher Proteine im sekretorischen Transportsystem fungiert und für Recyclingprozesse verantwortlich ist. Zusätzlich werden in den Zisternen Proteine glycosiliert und gemäß ihrer Bestimmung in Vesikel verpackt und zu den Bestimmungsorten transportiert (Alberts et al., 2003; Reaves & Banting, 1992; Traub & Kornfeld, 1997).



**Abb. 2: Golgi-Apparat. (A) Schematische Übersicht eines Golgi-Apparates (Alberts et al., 2003).**

**(B) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Golgi-Apparates einer exokrinen Ratten-Pankreaskarzinomzelle (AR42J). Abkürzungen: ER, Endoplasmatisches Retikulum; G, Golgi-Apparat; N, Nukleus; V, sekretorisches Vesikel.**

PKD1 ist in bestimmten Zelllinien (Magenantrumzellen, Zervixkarzinomzellen, hepatozelluläre Karzinomzellen und Nierenepithelzellen) im Golgi-Apparat lokalisiert und reguliert dort die Abschnürung der Vesikel vom TGN (Jamora et al., 1999; Liljedahl et al., 2001; Moore et al., 1999; Prestle et al., 1996;). Es stellte sich weiter heraus, dass eine Abschnürung der Vesikel für den Proteintransport zur Plasmamembran nur dann erfolgte,

wenn die PKD1 in aktivierter Form vorliegt (Liljedahl et al., 2001). Der Mechanismus, wie PKD1 die Vesikelbildung am TGN vermittelt, wurde in den letzten Jahren genauer untersucht: Die lokale Produktion von DAG an den TGN-Membranen ist essentiell für die Rekrutierung von PKD1 zur Golgimembran, an der die Proteinkinase dann mit seiner ersten Zinkfinger-Region an DAG bindet (Baron & Malhotra., 2002; Maeda et al., 2001). Die Hypothese von Maeda besagt, dass PKDs über die DAG-Verteilung auf der Membran des Golgiapparates spezifisch an solche Stellen des TGN rekrutiert werden, an denen die Abschnürung von Transportcarriern zur Zelloberfläche stattfinden soll und die durch bestimmte Moleküle markiert sind (Maeda et al., 2001). Die Bindung von PKD an die Membranen des TGN via DAG erlaubt dann wiederum die Rekrutierung von Effektorproteinen, die an ihrer regulatorischen Domäne binden. Diese besteht aus C1a, C1b und der PH-Domäne. Der Komplex aus PKD1 und ihren Effektoren kann lokale Deformierungen an der TGN-Membran hervorrufen und so zur Abspaltung von Vesikeln führen (van Lint et al., 2002).

2004 zeigten Yeaman et al. indes, dass in HeLa-Zellen keine endogene PKD1, sondern nur endogene PKD2 und 3 exprimiert werden und dass vor allem PKD2 für die Abspaltung der exozytotischen Transportvesikel vom TGN verantwortlich ist. Da exogen applizierte PKD1 in epithelialen Zellen funktionell redundant zu der endogen exprimierten Proteinkinase D2 zu sein scheint (Liljedahl et al., 2001), ist zu vermuten, dass der für PKD1 oben beschriebenen Mechanismus auch auf PKD2 übertragbar ist.

## 1.2. Grün Fluoreszierendes Protein (GFP)

Ein Nachweis von GFP in der Elektronenmikroskopie war ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit, da es bislang noch keine für Standarduntersuchungen verlässliche Nachweismethoden gab. Das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) wurde erstmals von Shimomura 1962 aus der Hydromeduse *Aequorea victoria* (Murbach & Sherarer, 1902) isoliert (Shimomura et al., 1962). Der Körper der Tiere enthält ein  $\text{Ca}^{2+}$  aktivierendes Photoprotein (Aequorin), dass Energie (blaues Licht) auf das ebenfalls vorhandene GFP überträgt. Bei diesem Vorgang absorbiert das GFP das Licht und gibt dabei selbst ein grünes Licht ab. Das Gen für das GFP wurde kloniert und anschließend charakterisiert (Prasher et al., 1992; Inouye & Tsuji, 1994). Untersuchungen an GFP exprimierenden Zellen zeigten, dass die Fluoreszenz unabhängig von Substraten, Kofaktoren und zusätzlichen Genen ist. Es stellte sich weiter heraus, dass GFP relativ stabil gegenüber äußeren Einflüssen, wie Oxidation und Reduktion, pH-Änderung,

Temperaturschwankungen ist und eine gewisse Chemikalienstabilität aufweist (Chalfie et al., 1994; Inouye & Tsuji, 1994).

Das Chromophor des Proteins stellt ein zyklisches Tripeptid dar, das nur bei einer kompletten Einbettung fluoresziert (Cody et al., 1993). Strukturell gesehen ist GFP ein „11-Strang- $\beta$ -Rohr“, das von einer  $\alpha$ -Helix umgeben ist (Yang et al., 1996). Diese Struktur schützt das Chromophor vor Lösungsmitteln und Sauerstoff. Die Fluoreszenz wird durch eine posttranslationale Proteinmodifikation ermöglicht.

Bis heute wurden zahlreiche Varianten des GFP kloniert, wie zum Beispiel das enhanced green fluorescent protein (EGFP) von Clontech Inc., das in dieser Studie verwendet wurde. Bei diesem GFP-Typ wurde eine verbesserte Faltung bei 37° C durch den Austausch von Phenylalanin gegen Leucin in Position 64 erreicht. Der Austausch von Serin gegen Threonin in Position 65 bewirkte eine optimierte chromophore Ionisation. Eine unbeabsichtigte, aber neutrale Mutation führte zum Austausch von Histidin in Position 231 gegen Leucin (Cormack et al., 1996). EGFP besitzt bei der Emission bei 507 nm eine 35fach stärkere Fluoreszenz als Wildtyp GFP (Cormack et al., 1996; Yang et al., 1996). Für das für diese Untersuchung zusätzlich verwendete pmaxGFP aus dem Copepoden *Potenllina sp.* der Firma AMAXA liegen keine Literaturangaben vor.

Seit es Prasher gelungen ist, GFP als Marker für Proteine zu nutzen, ist diese Technik zu einer Standardmethode der Zellbiologie geworden (Prasher et al., 1992). Zur Herstellung von GFP-Fusionsproteinen wird die DNA des zu untersuchenden Proteins mit der GFP-DNA verbunden und in eine Form gebracht (Vektor), die von der Zelle aufgenommen werden kann (Transfektion), so dass diese das Fusionsprotein selbstständig herstellt. In vielen Fällen wird das zu untersuchende Protein noch an die korrekte Stelle in der Zelle transportiert. Anschließend kann die Fluoreszenzmikroskopie Aufschluss über die zeitliche und räumliche Lokalisation des Zielproteins geben.

### 1.3. Elektronenmikroskopie

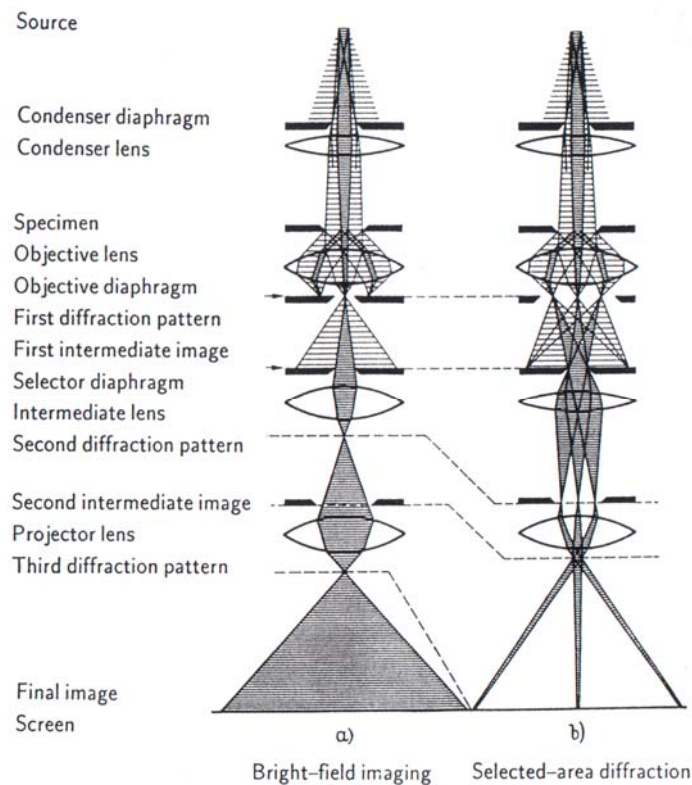
Mit Hilfe eines Elektronenmikroskops können ultrastrukturelle Untersuchungen zellbiologischer Prozesse durchgeführt und Zellstrukturen analysiert werden. Im konventionellen Lichtmikroskop ist die Auflösung durch die Wellenlänge des sichtbaren Lichts auf etwa 200 nm limitiert. Dieser Sachverhalt wird durch die Abbèsche

Beugungsgrenze  $d = \frac{\lambda}{n \sin \alpha}$  ( $d$  = Auflösungsvermögen,  $\lambda$  = Wellenlänge,  $n$  = Brechzahl und  $\alpha$  = Halber Öffnungswinkel des Objektivs) beschrieben. Da der Wert von  $n \sin \alpha$  aus technischen Gründen in der konventionellen Lichtmikroskopie nicht größer als 2 ist, besagt das Gesetz etwas vereinfacht, dass Strukturen, die kleiner sind als die halbe Lichtwellenlänge, nicht aufgelöst werden können. In der Lichtmikroskopie werden jedoch zur Zeit verstärkt Forschungen unternommen um diese Grenze zu durchbrechen. Als Beispiele hierfür ist die SNOM (scanning near field optical microscopy) zu nennen, bei der eine kleine Sonde mit sehr kleinen Abständen (weniger als die Lichtwellenlänge) über die Probe bewegt wird oder mit speziellen fluoreszenzmikroskopischen Methoden, womit auf Testproben schon Auflösungen von ca. 16 – 50 nm gezeigt worden sind (Hell, 2005; Kwade, 2008; Westphal & Hell, 2005).

In der Elektronenmikroskopie werden Elektronen für die Detektion verwendet. Die Elektronen durchlaufen dabei ein elektrisches Feld und werden durch dieses beschleunigt. De Broglie definierte die Wellennatur von Teilchen wie folgt:  $\lambda = \frac{h}{mv}$  ( $\lambda$  = Wellenlänge,  $h$  = Plancksche Konstante,  $m$  = Masse und  $v$  = Geschwindigkeit). Das zeigt, dass die Wellenlänge der Elektronen einzig von ihrer Geschwindigkeit, also ihrer Beschleunigungsspannung abhängt. Daher können im Elektronenmikroskop Wellenlängen bis zu der  $10^{-5}$  fachen Wellenlänge des sichtbaren Lichts erreicht werden. Die Auflösungsgrenze ist folglich nicht mehr durch die sehr kleine Wellenlänge der Elektronen bestimmt, sondern durch Bauteile und präparatbedingte Abbildungsfehler. Mit modernen Geräten kann an idealen Präparaten eine Auflösungen von besser als 1 Å (0,1 nm) erreicht werden (FEI Company, 2005). Die Auflösung auf biologischen Präparaten ist wegen ihrer Empfindlichkeit gegenüber dem Elektronenstrahl je nach angewandter Präparationsmethode in der Regel auf etwa 2 bis 10 nm begrenzt (Colliex, 2008).

### 1.3.1. Transmissionselektronenmikroskop (TEM)

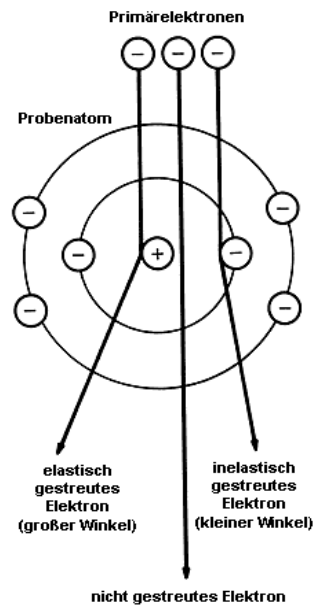
In einem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) wird die Probe mit Elektronen durchstrahlt (Abb. 3). Um Wechselwirkungen der Elektronen mit Gasmolekülen zu vermeiden wird es unter Hochvakuumbedingungen betrieben (Plattner & Zingsheim, 1987). Die Detektion der durch die Probe transmittierenden Elektronen erfolgt durch Abbildung auf einem Fluoreszenzbildschirm.



**Abb. 3: Aufbau eines Transmissionselektronenmikroskops (Reimer, 1995).**

Beim Durchtritt der Elektronen durch das Präparat können diese inelastisch oder elastisch gestreut werden. Die inelastische Streuung entsteht durch Wechselwirkung der Elektronen mit der negativ geladenen Atomhülle, während die elastische Streuung durch Interaktion der Elektronen mit dem positiv geladenen Atomkern entsteht (Abb. 4). Die elastisch gestreuten Elektronen dienen der Bildgebung. Die inelastisch gestreuten Elektronen unterliegen definitionsgemäß einem Energieverlust wodurch sich ihre Wellenlänge ändert, was bei der Streuung an den abbildenden Linsen zu einem chromatischen Abbildungsfehler führt. Um möglichst wenig störende inelastische Streuung zu erhalten, müssen die Präparate sehr dünn sein. Das Maß der elastischen Streuung der Elektronen ist direkt proportional zur Ordnungszahl des streuenden Atoms. Aus diesem Grund erfahren Elektronen, die mit Elementen hoher Ordnungszahl interagieren, eine intensivere Ablenkung, so dass viele vom Rand der Objektivblende aufgehalten werden, wodurch die entsprechende Probenstelle auf dem Fluoreszenzbildschirm dunkel erscheint. Da biologische Proben hauptsächlich aus Elementen niedriger Ordnungszahlen zusammengesetzt sind, werden diese in der Regel zur Kontrastverstärkung mit schwermetallhaltigen Substanzen behandelt. Schwermetallionen lagern sich wegen ihrer positiven Ladung bevorzugt an negativ geladenen zellulären

Feinstrukturen an und streuen zusätzlich Elektronen. Ein heller Bereich entspricht einer geringen Schwermetалldichte im Präparat, während dunkle Areale durch eine hohe Schwermetалldichte hervorgerufen werden (Lange & Blödmann, 1981). Bei schwermetallkontrastierten Proben und den in dieser Arbeit angewendeten Vergrößerungen entsteht das Bild weitgehend durch den oben beschriebenen Streukontrast; die Phasenkontrast-Effekte konnten somit vernachlässigt werden.

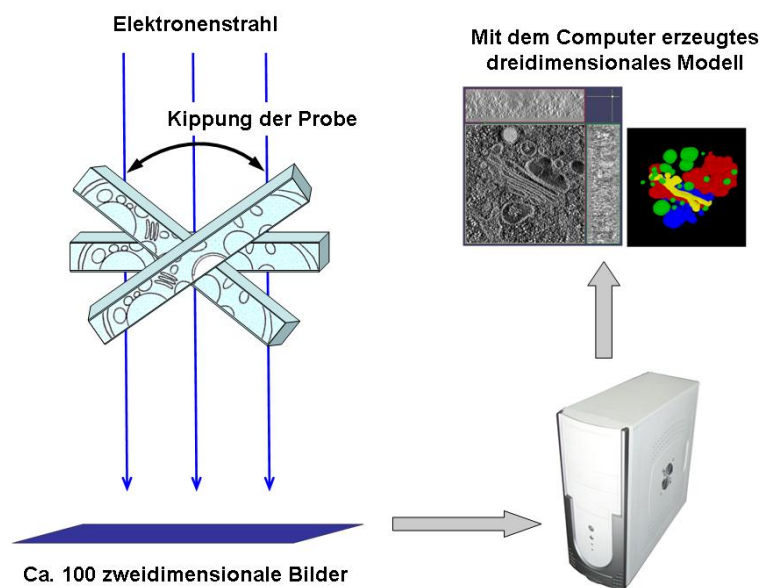


*Abb. 4: Streuungsschema der Elektronen beim Transmissionselektronenmikroskop (nach Flegler et al, 1995)*

### 1.3.2. Raster-Transmissionselektronenmikroskop (STEM)

Das Raster-Transmissionselektronenmikroskop (STEM) unterscheidet sich von einem konventionellen Transmissionselektronenmikroskop indem das Bild nicht als Ganzes, sondern mit einem auf einen Punkt fokussierten Elektronenstrahl zeilenweise aufgenommen wird. Die Bildentstehung unterscheidet sich somit grundsätzlich vom TEM. Ein Teil der in der Probe gestreuten Elektronen gelangt auf den HAADF-Detektor (high angle annular dark field), einem Ring, der symmetrisch unterhalb der Probe angebracht ist. Nicht gestreute Elektronen passieren das Loch in der Ringmitte und erzeugen kein Signal. Im Gegensatz zum TEM sind im STEM inelastisch gestreute Elektronen nicht störend, da sie keine abbildenden Linsen durchlaufen müssen und somit kein streuungsbedingter chromatischer Fehler auftreten kann. Im STEM können daher bei gleicher Auflösung und gleicher Beschleunigungsspannung dickere Proben als im TEM untersucht werden. Dies ist von besonderem Nutzen für die Elektronen-Tomographie. Dabei wird die Probe gekippt (zwischen  $-70^\circ$  und  $+70^\circ$ ) und Bilder

bei den verschiedenen Kippwinkeln aufgenommen. Aus diesen Bildern wird anschließend mathematisch durch Rückprojektion ein Tomogramm, also eine dreidimensionale Rekonstruktion der Probe generiert (Abb. 5). Bei diesem Verfahren ist es vorteilhaft, wenn möglichst dicke Proben untersucht werden können, damit auch hinreichend Information in Z-Richtung vorhanden ist. Erschwerend kommt jedoch hinzu, dass bei 70° Kippung der Elektronenstrahl die Probe auf einer etwa dreimal längeren Strecke durchstrahlen muss als die Probendicke.



**Abb. 5: Prinzip der Elektronen-Tomographie: Es werden mehrere Bilder bei verschiedenen Kippwinkeln aufgenommen und diese mit einer speziellen Software zu einem Tomogramm verarbeitet.**

### 1.3.3. Präparationsmethoden in der Elektronenmikroskopie

Lebende Organismen bestehen größtenteils aus Wasser. Unter den Hochvakuumbedingungen des Elektronenmikroskops würde das Wasser bei Raumtemperatur verdampfen, was zu einer massiven Schädigung der Ultrastruktur führen würde. Das Untersuchungsmaterial muss entweder im gefrorenem Zustand bei sehr niedrigen Temperaturen mikroskopiert werden, was jedoch technisch schwierig ist, oder aber vor der Untersuchung dehydriert werden. Da es sich jedoch nicht ohne strukturelle Veränderung dehydrieren lässt, muss es zunächst fixiert werden (Roos & Morgan, 1990).

Biologisches Probenmaterial besteht überwiegend aus leichten Elementen an denen Elektronen wenig gestreut werden. Deshalb wird meistens eine Kontrastverstärkung mit Schwermetallen wie Uran oder Osmium durchgeführt. Um die inelastische Streuung bei der

transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchung möglichst gering zu halten, müssen die Proben sehr dünn geschnitten werden (s.o.). Zu diesem Zweck werden von den biologischen Präparaten nach vorangegangener Polymereinbettung Ultradünnschnitte (70 nm) hergestellt und auf geeignete Trägermaterialien, wie z.B. Kupfernetze aufgebracht.

#### *1.3.3.1. Chemische Fixation*

Die chemische Fixation ist ein Standardpräparationsverfahren von biologischem Material für die Elektronenmikroskopie. Dieses Verfahren wird häufig angewendet, da biologische Proben bei einem vergleichsweise geringen präparationstechnischen Aufwand eine gute Strukturhaltung aufweisen. Dabei wird das Probenmaterial zuerst mit Glutaraldehyd fixiert, was zu einer Proteinvernetzung führt. In einem weiteren Schritt erfolgt eine Behandlung mit Osmiumtetroxid, welches der Fixation sowie auch der Kontrastgebung dient. Osmiumtetroxid greift hierbei die Doppelbindungen an und verbindet so z.B. die Phospholipide der Membranen. Um die Proben in das hydrophobe Polymer einbetten zu können, müssen sie vorher dehydriert werden. Dies wird durch eine aufsteigende Alkoholreihe erreicht.

Die chemische Fixation ist ein langsamer Prozess, bei dem die Fixative durch Puffer in das Probenmaterial transportiert werden. Je dicker dieses ist, desto langsamer erfolgt die Fixation. Als Ursache hierfür gelten sowohl Konzentrationsunterschiede, die beim Eindringen des Fixativs entstehen, als auch eine Verminderung der Diffusionsgeschwindigkeit durch bereits erfolgte Quervernetzungen. Hieraus wird deutlich, dass die chemische Fixation von biologischen Material ein hohes Artefaktpotential aufweist (Müller, 2000).

#### *1.3.3.2. Hochdruckkryofixation*

Die Hochdruckkryofixation ist eine Alternative zur konventionellen chemischen Fixation. Dabei wird die Probe möglichst schnell eingefroren. Dieser Vorgang dauert in der Praxis einige Millisekunden. Es wurde nachgewiesen, dass kryofixierte Proben in-vivo Zustände von Zellen- und Gewebeproben besser beschreiben als andere Präparationsverfahren, da hierbei das Problem der langsamen Fixationsgeschwindigkeit umgangen wird (Shimoni & Müller, 1998; Szczesny et al., 1996; Kaneko & Walther, 1995). Ein Problem der Kryofixation stellt jedoch die Tendenz von Wasser dar, beim Einfrieren Eiskristalle zu bilden, was sich negativ auf die Strukturhaltung auswirkt (Studer et al., 1995). Je langsamer eine Probe abgekühlt wird, desto mehr Zeit haben die Eiskristalle zum Wachsen und desto Größer werden sie.

Diesem Problem lässt sich durch extrem hohe Kühlraten von mehr als 10000 K/s entgegenwirken. An der Probenoberfläche können solche Kühlraten gut erreicht werden, da die Fläche einen direkten Kontakt zum Kryogen aufweist. Wasser und wasserhaltiges biologisches Material besitzt jedoch eine schlechte thermische Leitfähigkeit und eine hohe Wärmekapazität, was der Abkühlungsgeschwindigkeit im Inneren der Probe entgegenwirkt und somit die Eiskristallbildung begünstigt. Um dieses Problem zu umgehen wird bei der Hochdruckkryofixation die Probe bei einem Druck von 2100 bar eingefroren (Moor & Riehle, 1968). Dieser hohe Druck wirkt der Volumenausdehnung, die zur Bildung von hexagonalen Eis erforderlich ist, entgegen, was die Eiskristallbildung um etwa den Faktor 10 reduziert (Dubochet & Sartori Blanc, 2001; Roos & Morgan, 1990).

Das Prinzip eines Hochdruckkryofixationsapparates ist in Abbildung 6 dargestellt. Zunächst wird mittels einer Ölhydraulikpumpe ein Vordruck (360 bar) aufgebaut. Über eine Druckleitung wird dieser Vordruck auf einen Druckzylinder übertragen, der ihn über einen Kolben auf einen mit flüssigem Stickstoff gekühlten Hochdruckzylinder transferiert. Durch die Oberflächenverkleinerung des Hochdruckkolbens wird der Druck um etwa den Faktor 8 verstärkt. Dadurch wird der flüssige Stickstoff in der Einfrierkammer mit 2100 bar auf die Probe gepresst. Mit der Hochdruckkryofixation können Proben bis zu 0,2 mm Dicke und 2 mm Durchmesser ohne Vorbehandlung und ohne Gefrierartefakte eingefroren werden, was die Fixierung von Proben in einem definierten physiologischen Zustand ermöglicht (Studer et al., 1989).

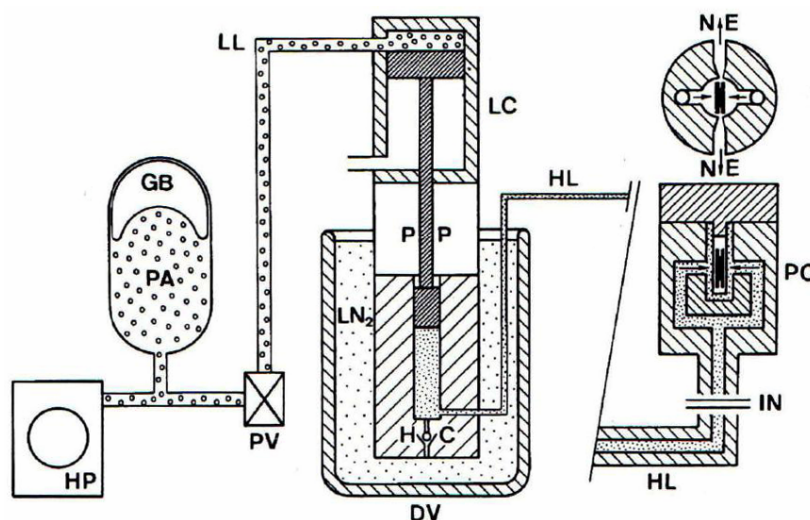


Abb. 6: Hochdruckkryofixationsapparat (nach Moor et. al, 1980)

#### *1.3.3.3. Gefriersubstitution*

Um die eingefrorene Probe in das hydrophobe Polymer einbetten zu können, muss das gefrorene Wasser entfernt und durch organisches Lösungsmittel ersetzt werden. Dies wird durch die Gefriersubstitution erreicht, bei der die Präparate in einem organischen Lösungsmittel über einem exponentiell ansteigenden Temperaturgradienten von  $-90^{\circ}\text{C}$  auf  $0^{\circ}\text{C}$  oder  $-20^{\circ}\text{C}$  während einem Zeitraum von 18 Stunden erwärmt werden. Dabei wird das Eis durch das organische Lösungsmittel ersetzt. Die niedrige Anfangstemperatur von  $-90^{\circ}\text{C}$  verhindert die sekundäre Eiskristallbildung und beugt zudem Extraktionen der biologischen Feinstruktur vor. Als gutes Lösungsmittel hat sich Aceton erwiesen, da es eine günstige Polarität aufweist. Als Kontrastmittel und Fixativ dienen standardmäßig Osmiumtetroxyd und Uranylacetat, die zuvor dem Lösungsmittel beigemischt worden sind (Steinbrecht & Müller, 1987). Osmiumtetroxyd bindet dabei nukleophil oder elektrophil an Doppelbindungen ungesättigter Kohlenstoffatome z.B. in Membranlipiden (Plattner & Zingsheim, 1987). Das Uranylacetat interagiert mit negativ geladenen Gruppen, wie Phosphatreste oder Carboxylgruppen, was zu einer Kontrastierung und zu einer leichten Fixierung der Feinstrukturen wie Proteine oder Fibrillen beiträgt. Beide Verbindungen tragen zur Kontrasterhöhung bei (Plattner & Zingsheim, 1987). In der Substitutionslösung befindet sich auch ein geringer Anteil von Wasser (5 %), da es zu einer besseren Erhaltung feiner morphologischer Strukturen beiträgt (Walther & Ziegler, 2002). Eine Erklärung dafür ist möglicherweise, dass das Wasser die Zellmembran stabilisiert bevor die Fixation durch Osmiumtetroxid und Uranylacetat stattfindet (Walther & Ziegler, 2002). Nach der Gefriersubstitution wird das in der Probe befindliche Lösungsmittel durch ein Polymer ersetzt.

#### 1.4. Ziel der Arbeit:

Ziel dieser Arbeit war es, Methoden zu entwickeln um PKD2 in kultivierten Karzinoidzellen ultrastrukturell nachzuweisen und morphologische Veränderungen bei Überexprimierung dieser Proteinkinase zu erfassen. Dazu mussten die bestehenden fluoreszenz- und elektronenmikroskopischen Methoden ergänzt, verbessert und miteinander kombiniert werden.

## 2. Materialien

### 2.1. Chemikalien

|                                     |                                      |
|-------------------------------------|--------------------------------------|
| 1-Hexadecen zur Synthese            | Merck KG,aA Darmstadt                |
| Aceton, p. a.                       | Merck KGaA, Darmstadt                |
| Ammoniumchlorid                     | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Aqua demin. / Aqua bidest.          | Universität Ulm, Ulm                 |
| Ethanol, p.a.                       | Merck KGaA, Darmstadt                |
| Ethanol vergällt, 96 %              | Merck Eurolab GmbH, Ulm              |
| Formalin (Formaldehydlösung 4 %)    | Merck KGaA, Darmstadt                |
| Isopropanol                         | Merck KGaA, Darmstadt                |
| Schwefelsäure, reinst 98 %          | Merck KGaA, Darmstadt                |
| Spül- und Reinigungsmittel Ulma Fix | L. Scheck & Co. KG, Ulm              |
| Stickstoff, flüssig                 | VWR International GmbH, Darmstadt    |
| Triton X-100                        | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |

### 2.2. Lösungen, Medien und Puffer

#### 2 % Fixierlösung (12,5 ml)

|                                 |                     |
|---------------------------------|---------------------|
| 1 ml Glutaraldehydlösung 25 %   | Plano GmbH, Wetzlar |
| 5,2 ml Aqua bidest.             |                     |
| 6,3 ml D-PBS-Pufferlösung 0,2 M |                     |
| 125 mg Saccharose               | Merck KG, Darmstadt |

#### Blockierlösung für Immunmarkierungen an LR-Gold eingebettete Proben

|                |                                      |
|----------------|--------------------------------------|
| PBG            |                                      |
| 0,1 g Gelatine | Serva GmbH, Heidelberg               |
| 50 ml PBS      |                                      |
| 0,25 BSA       | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |

#### Blockierlösung für Immunmarkierungen an Formalin eingebettete Proben

|                                         |                                      |
|-----------------------------------------|--------------------------------------|
| 0,2 % Gelatin from cold water fish skin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| in PBS                                  |                                      |

### DAPI-DNA-Fluoreszenzfärbelösung

|                   |                       |
|-------------------|-----------------------|
| 1 µg DAPI         | Merck KGaA, Darmstadt |
| 1 ml Aqua bidest. |                       |

### Einbettmedien Elektronenmikroskopie

|                                                      |                                      |
|------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| Epoxydharz Epon                                      | Bestandteile: Fluka, Buchs, Schweiz  |
| 60 ml Stammlösung I                                  | 155 g Epon 812                       |
|                                                      | 250 g Dodecenybernsteinsäureanhydrid |
| 40 ml Stammlösung II                                 | 200 g Epon 812                       |
|                                                      | 178 g Methylnadicanhydrid            |
| 1,5 ml Beschleuniger Tris(dimethylaminomethyl)phenol |                                      |
| Die Eponmischung war gekühlt mehrere Monate haltbar. |                                      |

|                                                             |                                        |
|-------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| Methacrylat LR-Gold                                         | Polysciences Inc., Warrington, England |
| 1 mg/ml Benzil (Diphenylethanedione)                        | Sigma Chemical Co., St. Louis, USA     |
| 1 mg/ml Benzoyl Peroxid                                     | Sigma Chemical Co., St. Louis, USA     |
| Die LR-Gold-Mischung wurde für jeden Versuch neu angesetzt. |                                        |

### Einbettmedien Lichtmikroskopie

|                     |                                   |
|---------------------|-----------------------------------|
| DePex Einbettmedium | Serva GmbH & Co., Heidelberg      |
| Mounting Medium     | Immunotech, Marseille, Frankreich |

### Formvar Lösung

|                 |                                      |
|-----------------|--------------------------------------|
| 1 % Formvar     | Plano GmbH, Wetzlar                  |
| in Dichlorethan | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |

### Gold-Solution 15 nm-Lot: 611 29/8

Aurion, Wageningen, Niederland

### Kontrastierlösungen

|                     |                     |
|---------------------|---------------------|
| Kontrastierlösung A |                     |
| 2 g Uranylacetat    | Merck KG, Darmstadt |
| 100 ml Aqua demin.  |                     |

Kontrastierlösung B

## Gesättigte Uranylacetat-Ethanol-Lösung

### Kontrastierlösung C

6 ml Aceton

0,1 g Osmiumtetroxyd

ChemPur, Karlsruhe

0,3 ml Kontrastierlösung A

### Kontrastierlösung D

4,75 ml Aceton

0,25 ml Kontrastierlösung A

### Poly-L-Lysin Lösung

10 % Poly-L-Lysin

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

in Aqua demin.

### Puffer

D-PBS ohne  $\text{CaCl}_2$  und  $\text{MgCl}_2$

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

PBS nach Sørensen 0,01 M

Bestandteile Merck KGaA, Darmstadt

40 ml Lösung A: ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in Aqua bidest. 0,2 M)

10 ml Lösung B: ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  in Aqua bidest. 0,2 M)

9 g NaCl

0,3 g Thimerosal

950 ml Aqua bidest.

Die Gesamtlösung wurde auf pH 7,3 eingestellt

### Richardson Färbelösung

Bestandteile Merck KGaA, Darmstadt

Lösung A: 1 % Azur II in Aqua bidest.

Lösung B: 1 % Methylenblau mit 1 % 2-Natriumtetraborat in Aqua bidest.

Gebrauchslösung: Lösung A und Lösung B im Verhältnis 1:1

### Trypanblau-Lösung

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

### Zellkulturmedium

|                                         |                            |
|-----------------------------------------|----------------------------|
| DMEM mit 4,5 g/l Glucose und L-Glutamin | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| 10 % Fötale Bovines Serum (FBS)         | Biochrom AG, Berlin        |
| 1 % Penicillin-Streptomycin             | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |

### 2.3. Enzyme, Marker und Kits

#### Celline-Nucleofector-Kit-V

Amara GmbH, Köln

#### Nanofectin-Kit

PAA Laboratories Inc., Ontario, USA

#### 1 % Trypsin-EDTA-Lösung

10 % Trypsin-EDTA Stammlösung  
in D-PBS

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

#### Vektor-DNA:

pEGFP (5400 bp)

Clontech, Saint-Germain, Frankreich

pmaxGFP (3486 bp)

Amara GmbH, Köln

ProteinkinaseD2wt

Innere Medizin I, Universität Ulm, Ulm

ProteinkinaseD2se

Innere Medizin I, Universität Ulm, Ulm

ProteinkinaseD2da

Innere Medizin I, Universität Ulm, Ulm

ProteinkinaseD2wt mit pEGFP getaggt

Innere Medizin I, Universität Ulm, Ulm

ProteinkinaseD2se mit pEGFP getaggt

Innere Medizin I, Universität Ulm, Ulm

ProteinkinaseD2da mit pEGFP getaggt

Innere Medizin I, Universität Ulm, Ulm

### 2.4. Zelllinien

AR42J exokrine Ratten-Pankreaskarzinomzellen

BON humane Karzinoidzellen

### 2.5. Pankreasgewebe

Pankreasgewebe der Hausmaus (*Mus musculus*)

### 2.6. Geräte und Verbrauchsmaterialien

|                                     |                           |                                                                      |
|-------------------------------------|---------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| Aluminiumplättchen                  | Plan<br>0,2 mm Vertiefung | Wohlwend GmbH, Sennwald, Schweiz                                     |
| Bedampfungsanlage                   |                           | BOC Edwards GmbH, Kirchheim                                          |
| Benetzungsgerät                     | Eigenbau                  | Universität Ulm, Ulm                                                 |
| Cellulosekapillare                  | (Innendurchmesser 200 µm) |                                                                      |
| CO <sub>2</sub> -Inkubator (37 ° C) | Heraeus Inkubator         | Heraeus Instruments GmbH, Hanau                                      |
| Deckgläser                          |                           | VWR International GmbH, Darmstadt                                    |
| Dewar                               | 3 l und 10 l              | VWR International GmbH, Darmstadt                                    |
| Diamantmesser                       |                           | Diatome AG, Biel, Schweiz                                            |
| Transmissionselektronenmikroskope   |                           |                                                                      |
|                                     | EM-400                    | Philips FEI, Eindhoven, Niederland                                   |
|                                     | EM-10                     | Zeiss, Jena                                                          |
| Fluoreszenzmikroskop                | Axiophot                  | Zeiss, Jena                                                          |
| Gefrierätzanlage                    | BAF 300                   | Balzers, Fürstentum Liechtenstein                                    |
| Heizelement                         | Eigenbau                  | Universität Ulm, Ulm                                                 |
| Hochdruckgefrierer                  | Compact 01                | Wohlwend GmbH, Sennwald, Schweiz                                     |
| Inkubator (180 ° C)                 |                           | Memmert GmbH & Co. KG, Büchenbach                                    |
| Inverse-Fluoreszenzmikroskope       |                           |                                                                      |
|                                     | Axiovert 25               | Zeiss, Jena                                                          |
|                                     | Axiovert 135              | Zeiss, Jena                                                          |
| Inverses-Lichtmikroskop             | IX 71                     | Olympus, Hamburg                                                     |
| Kupfer-Netzchen                     |                           | Plano GmbH, Wetzlar                                                  |
| Standard-Netzchen                   | 300 mesh<br>400 mesh      |                                                                      |
| Lochblenden                         | 1000 µm                   |                                                                      |
| Finder-Netzchen                     | Typ H6                    |                                                                      |
| Lichtmikroskop                      | Standard 14               | Zeiss, Jena                                                          |
| Multiwellplatten                    | 6-well<br>24-well         | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen<br>Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden |
| Neubauer-Zählkammer                 | 0,100 mm Tiefe            | Optik Labor                                                          |
| Nucleofector                        |                           | Amara GmbH, Köln                                                     |
| Objektträger                        |                           | Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig                                   |
| Parafilm                            | M                         | Pechiney, Chicago, USA                                               |
| Petrischalen (Ø 10 cm)              | Cellstar                  | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen                                  |

## Raster-Transmissionselektronenmikroskop

|                          |                     |                                    |
|--------------------------|---------------------|------------------------------------|
|                          | Titan               | FEI, Eindhoven, Niederland         |
| Reaktionsgefäße          | 0,5 ml, 1 ml        | Eppendorf AG, Hamburg              |
|                          | 15 ml, 50 ml        | BD Biosciences, Heidelberg         |
| Saphirdisks              | Ø 3 mm              | Wohlwend GmbH, Sennwald, Schweiz   |
| Sicherheitsbunsenbrenner | Firboy plus         | Integra Biosciences GmbH, Fernwald |
| Stereomikroskop          | Stemi SV 6          | Zeiss, Jena                        |
| Sterilbank               | Hera safe           | Heraeus Instruments GmbH, Hanau    |
| Kryosubstitutionsgerät   | Eigenbau            | Universität Ulm, Ulm               |
| Mikrotom                 | Leica Ultra Cut UCT | Leica Mikrosysteme GmbH, Bensheim  |
| Ultraschallgerät         | Sonorex RK510       | Schalltec GmbH, Möhrfelden         |
| Vortex-Mixer             | Cyclo-Mixer         | Clay Adams, N.J., USA              |

## 2.7. Antikörper

Die verwendeten Antikörper werden in Tabelle 1 aufgeführt.

**Tab. 1: Verwendete Antikörper**

| <i>Spezifität</i>              | <i>Eigenschaften</i>                   | <i>Referenz</i>                                   |
|--------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------------------|
| <b><i>Primärantikörper</i></b> |                                        |                                                   |
| $\alpha$ -Amylase              | Lot 077H9044, polyklonal,<br>Kaninchen | Sigma, Saint Louis, USA                           |
| GFP                            | AB 6556-25, polyklonal,<br>Kaninchen   | Abcam plc, Cambridge,<br>England                  |
| GFP                            | Lot 632377, polyklonal,<br>Kaninchen   | BD Biosciences, Mountain<br>View, USA             |
| GFP                            | A 6455, polyklonal,<br>Kaninchen       | Molecular Probes Europe<br>BV, Leiden, Niederland |
| GFP                            | Anti-GFP, monoklonal,<br>Maus          | Roche Diagnostik,<br>Mannheim                     |
| GFP                            | Lot 17549, polyklonal, Ziege           | Rockland, Gilbertsville, USA                      |
| GFP                            | TP-401, polyclonal,<br>Kaninchen       | Torrey pines biolabs,<br>Houston, USA             |
| Golgin                         | A-21270, monoklonal, Maus              | Molecular Probes Europe                           |

|                                      |                                          |                                          |
|--------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|
|                                      |                                          | BV, Leiden, Niederland                   |
| Insulin                              | AM029-5M / MU029-UC,<br>monoklonal, Maus | BioGenex, San Ramon, USA                 |
| PKD2                                 | Lot 24561, polyklonal,<br>Kaninchen      | Upstate Millipore GmbH,<br>Schwalbach    |
| PKD2                                 | PAB -10222, polyklonal,<br>Kaninchen     | Orbigen Inc., San Diego,<br>USA          |
| <b><i>Sekundärantikörper</i></b>     |                                          |                                          |
| Alexa Fluor 488<br>(Goat anti Mouse) |                                          | Invitrogen GmbH, Karlsruhe               |
| Cy3 (Rabbit anti Goat)               |                                          | Dianova GmbH, Hamburg                    |
| GAR (Goat anti Rabbit)               | 10 nm                                    | Aurion, Wageningen,<br>Niederland        |
| GAM (Goat anti Mouse)                | 10 nm                                    | Aurion, Wageningen,<br>Niederland        |
| Protein A Gold                       | 10 nm                                    | Polysciences Inc,<br>Warrington, England |
| RAG (Rabbit anti Goat)               | 10 nm                                    | Aurion, Wageningen,<br>Niederland        |

## 2.8. Software

Für die Auswertungen wurde folgende Software verwendet:

|                                         |                                                                                     |
|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| 3D Rekonstruktion                       | 3D Mod (David Mastronarde; Boulder Labs)<br>ETOMO (David Mastronarde; Boulder Labs) |
| Bildbearbeitung:                        | Adobe Photoshop CS 2<br>Corel draw 8<br>Microsoft Paint 5.1.                        |
| Gefriersubstitution                     | Gef Sub 2.3. (Universität Ulm)                                                      |
| Mikroskopsoftware                       | Spot Basic 4.0.9.<br>EMMenu 4.0.5.16.                                               |
| Statistik:                              | WinSTAT 3.1.                                                                        |
| Textverarbeitung / Tabellenkalkulation: | Microsoft Office 2003                                                               |

### 3. Methoden

#### 3.1. Molekular- und Zellbiologie

Die BON- und AR42J-Zellen wurden in einem Inkubator bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> in Petrischalen kultiviert. Alle beschriebenen Arbeitsschritte fanden in einer Sterilbank statt.

Die Splittung der adhärent wachsenden Zellen erfolgte kurz vor ihrer Konfluenz (jeden 3. bzw. 4. Tag). Hierbei wurde zunächst das Nährmedium abgesaugt, die Zellen mit D-PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung 10 min bei 37° C inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen wurde die Suspension in 8 ml Nährmedium überführt. Anschließend wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Dazu wurden 50 µl Zellsuspension und 50 µl Trypanblau-Lösung in einem Eppendorfgefäß vermischt, ein Tropfen der Lösung in die Zählkammer gegeben und die Zellen im Phasenkontrastmikroskop gezählt. Bei der Auszählung wurden nur ungefärbte, das heißt intakte Zellen berücksichtigt. Anschließend wurden Aliquote von je 500.000 Zellen in 10 ml Nährmedium resuspendiert und auf neuen Petrischalen ausgesäht.

##### 3.1.1. Transfektionsmethoden

###### *3.1.1.1. Nucleofector-Transfektion*

Die Nucleofector-Transfektion erfolgte mit einem Amaxa-Nukleofektor und dem dazugehörigen Amaxa-Kit. Die Nucleofector-Technologie basiert auf der physikalischen Methode der Elektroporation und kombiniert verschiedene Elektroporationsparameter mit entsprechenden Puffern. Die Transfektion wurde gemäß dem „amaxa optimized protocol DCO 1001 Vs. 12-2004“ ([www.amaxa.com](http://www.amaxa.com)) durchgeführt. Die beste Transfektionseffizienz wurde hierbei mit 8 µg Vektor-DNA, 3 Millionen Zellen, dem Nucleofector-Programm O 17 und dem Transfektionspuffer V erzielt. Vor den weiteren Untersuchungen wurden die transfizierten Zellen auf 6-well Platten resuspendiert und erneut für 24-48 h inkubiert.

#### *3.1.1.2. Transfektion mit Nanofektin*

Für die Transfektion mit Nanofektin mussten die Zellen auf einer 6-well Platte (2 mio Zellen pro Well) ausgesäht werden. Nach einer 24 stündigen Inkubationsdauer wurden 2 Polystyrol-Reaktionsgefäße mit je 100 µl Dilution (NaCl-Lösung 150 mM) vorbereitet. In das erste Reaktionsgefäß wurde zusätzlich 3 µg Vektor-DNA, in das zweite 9,6 µl Nanofektin gegeben. Beide Lösungen wurden anschließend gemischt, 10 sec mit einem Vortex geschüttelt und 20 min inkubiert. Der so vorbereitete Nanofektin-Ansatz konnte nun auf die adhärenen Zellen gegeben werden. Die beiden Reagenzien des Nanofektin-Kits bildeten einen porösen DNA-Nanopartikelkomplex, der exozytotisch aufgenommen wurde. Anschließend wurden die Zellen 24 h inkubiert und weiterverwendet.

#### *3.1.2. Kontrolle der Transfektionsrate*

Die Transfektionseffizienz konnte 24 h nach erfolgter Transfektion bestimmt werden. An einem inversen Fluoreszenzmikroskop wurden dazu die fluoreszierenden transfizierten Zellen ausgezählt und diese mit der Anzahl der nicht fluoreszierenden, also den nicht transfizierten Zellen verglichen. Aus diesem Verhältnis konnte die Transfektionsrate errechnet werden.

Für weitere fluoreszenz- und lichtmikroskopische Untersuchungen wurde ein Teil der Zellen dauerhaft fixiert. Hierzu wurden transfizierte Zellen auf Deckgläser in 6-well Platten ausgesäht. Nach 24 h wurden die bewachsenen Deckgläser entnommen und 2 mal mit D-PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine Fixierung mit 4 % Formalin (20 min). Nach zwei weiteren Waschschritten mit D-PBS wurde das restliche Formalin mit einer 50 mM Ammoniumchlorid-D-PBS-Lösung immobilisiert (10 min). Eine Einbettung auf Objektträger mit Mounting Medium erfolgte nach zwei weiteren Waschschritten (2 x D-PBS).

## 3.2. Elektronenmikroskopie

### 3.2.1. Vorbereitung der Saphirdisks

Für die Hochdruckkryofixation wurden mit Kohle beschichtete und mit Zellen konfluent bewachsene Saphirdisks verwendet. Der Kohlefilm fundierte dabei als Sollbruchstelle beim späteren Ablösen der Saphirdisks vom Polymer. Um eine stabile Kohlebeschichtung zu erhalten, mussten die Saphirdisks zuvor von Verschmutzungen befreit werden. Daher wurden sie zuerst mit 60 % Schwefelsäure 15 min im Ultraschallbad gereinigt und anschließend zweimal mit Aqua demin. gewaschen. Es folgte ein weiterer 15 minütiger Reinigungsschritt mit einer Spülmittellösung im Ultraschallbad. Nachdem die Reste des Spülmittels mit lauwarmem Leitungswasser entfernt worden waren, erfolgten drei Waschschrte mit vergälltem Ethanol und eine erneute 15 minütige Ultraschallbehandlung. Anschließend wurden die Saphirdisks getrocknet und in der Gefrierätzanlage mittels Elektronenstrahlverdampfung mit ca. 17 nm Kohle beschichtet (Vakuum ca.  $10^{-5}$  mbar, Spannung: 2400 V). In diesen Kohlefilm wurde mit einer Pinzette die Zahl „2“ geritzt, um später die beschichtete und somit die mit Zellen bewachsene Seite leichter erkennen zu können. Danach folgte eine erneute Kohlebedampfung (ca. 5 nm). Diese zweite Kohleschicht war notwendig, um ein sauberes Absprengen des Polymers im Bereich der eingeritzten „2“ zu gewährleisten. Dieser Arbeitsschritt war besonders bei LR-Gold eingebetteten Proben wichtig, da hierbei häufig eine Anhaftung des Polymers im Bereich der eingeritzten „2“ zu beobachten war. Anschließend wurde der Kohlefilm bei 160° C 12 h ausgehärtet. Um die Zelladhäsion zu erhöhen, wurde ein Tropfen einer Poly-L-Lysin Lösung auf die Saphirdisks gegeben und bei 38° C verdampft. Sterilisiert wurden die nicht Poly-L-Lysin behandelten Saphirdisks, indem sie durch die Flamme des Sicherheitsbunsenbrenners gezogen wurden. Die Sterilisation von Poly-L-Lysin behandelten Disks erfolgte hingegen unter einer UV-Lampe (60 min). Die so vorbereiteten Saphirdisks konnten nun mit der Kohleschicht nach oben in die Zellsuspension gegeben werden. Nach 24 h respektive 48 h konnten dann die bewachsenen Saphirdisks weiterverwendet werden.

### 3.2.2. Formvarbefilmung der Kupfernetzchen und Lochblenden

Um die Stabilität der LR-Gold-Ultradünnschnitte im Elektronenstrahl zu erhöhen, um Aufladungen zu verringern und um Reaktionen des Antikörpers mit dem Kupfer zu

verhindern, wurden die verwendeten Kupfernetzchen bzw. Lochblenden befilmt. Hierzu wurde ein mit einem Laborpapiertuch gereinigter Objektträger in ein Benetzungsgerät eingespannt und in eine Formvar-Lösung getaucht. Das Benetzungsgerät diente dem Herausziehen des Objektträgers mit konstanter Geschwindigkeit. Bei dem gleichmäßig mit Formvar beschichteten Objektträger wurde mit einem stumpfen Skalpell die Kanten gebrochen um ein sauberes Abschwemmen zu erleichtern. Dann wurde der Objektträger schräg in einen Behälter mit Aqua demin. eingetaucht, dabei löste sich der Film vom Objektträger und schwamm auf der Wasseroberfläche. Auf diesen Film konnten nun die verschiedenen Kupfernetzchen bzw. Lochblenden gelegt werden. Anschließend wurden die Netzchen mithilfe von Parafilm vorsichtig von der Wasseroberfläche aufgenommen, getrocknet und zur Verstärkung bzw. zur besseren Leitfähigkeit mit einer ca. 15 nm Kohleschicht versehen.

### 3.2.3. Chemische Fixation und Einbettung in Epon und LR-Gold

Für die chemische Fixation wurden die beschichteten Saphirdisks in 24-well Platten gelegt. Es wurde darauf geachtet, dass die Seite mit dem Kohlefilm nach oben zeigte. Die transfizierten Zellen wurden auf die Platten ausgesät und 24 h respektive 48 h inkubiert. Dann wurden die kovalent bewachsenen Saphirdisks aus den 24-well Platten entnommen und in 0,5 ml Reaktionsgefäße mit Fixierlösung überführt. In diesen Gefäßen fanden später auch die Kontrastierung, die Entwässerungen und die Einbettung in LR-Gold statt (Tab. 2B). Die Ergebnisse dieses Präparationsverfahrens konnten anschließend mit den Ergebnissen der Hochdruckkryofixation verglichen werden. Die verbliebenen 24-well Platten enthielten noch genügend adhärente Zellen um eine weitere chemische Fixation direkt auf den 24-well Platten durchführen zu können. Die Kontrastierung, die Entwässerung und die Einbettung in LR-Gold und Epon fanden direkt auf den Platten statt (Tab. 2A; Tab 3). Alle LR-Gold Einbettungsschritte erfolgten bei  $-15^{\circ}\text{C}$  und in Stickstoffatmosphäre in einem speziell gefertigten Dewar mit computergesteuertem Heizelement. Nach der Polymerisation wurden die Proben geschnitten und im Transmissionselektronenmikroskop analysiert.

**Tab. 2: Schema zur chemischen Fixation und Einbettung in LR-Gold von adhärennten Zellen auf 24-well Platten (A) und Saphirdisks (B).**

| <b>LR-Gold Einbettung</b> | <b>A.) 24-well Platte</b>    |             | <b>B.) Saphirdisks</b><br><i>in 0,5 ml Reaktionsgefäße</i> |             |
|---------------------------|------------------------------|-------------|------------------------------------------------------------|-------------|
| <i>Arbeitsschritt</i>     | <i>Lösung</i>                | <i>Ink.</i> | <i>Lösung</i>                                              | <i>Ink.</i> |
| Fixierung                 | 2 % Fixierlösung             | 4 h         | 2 % Fixierlösung                                           | 1 h         |
| Waschschritte             | 3 x D-PBS                    |             | 3 x D-PBS                                                  |             |
| Kontrastierung            | Kontrastierlösung A          | 1 h         | Kontrastierlösung A                                        | 1 h         |
| Entwässerung              | 30 % Ethanol                 | 10 min      | 30 % Ethanol                                               | 10 min      |
|                           | 50 % Ethanol                 | 10 min      | 50 % Ethanol                                               | 10 min      |
|                           | 70 % Ethanol                 | 10 min      | 70 % Ethanol                                               | 10 min      |
|                           | 90 % Ethanol                 | 10 min      | 90 % Ethanol                                               | 10 min      |
| Kontrastierung            | Kontrastierlösung B          | 30 min      | Kontrastierlösung B                                        | 30 min      |
| Einbettung                | Isopropanol:LR-Gold<br>(2:1) | 30 min      | Aceton:LR-Gold<br>(2:1)                                    | 2 h         |
|                           | Isopropanol:LR-Gold<br>(1:1) | 1 h         | Aceton: LR-Gold<br>(1:1)                                   | 1 h         |
|                           | Isopropanol:LR-Gold<br>(1:2) | 2 h         |                                                            |             |
|                           | LR-Gold (100 %)              | 10 h        | LR-Gold (100 %)                                            | 1 h         |
| Polymerisation            | 48 h unter UV (-15 ° C)      |             |                                                            |             |

**Tab. 3: Schema zur chemischen Fixation und Einbettung in Epon von adhärennten Zellen auf 24-well Platten.**

| <b>Epon-Einbettung</b> | <b>24-well Platte</b> |                   |
|------------------------|-----------------------|-------------------|
| <i>Arbeitsschritt</i>  | <i>Lösung</i>         | <i>Inkubation</i> |
| Fixierung              | 2 % Fixierlösung      | 4 h               |
| Waschschritte          | 3 x D-PBS             |                   |
| Kontrastierung         | Kontrastierlösung A   | 1 h               |
| Entwässerung           | 30 % Ethanol          | 10 min            |
|                        | 50 % Ethanol          | 10 min            |
|                        | 70 % Ethanol          | 10 min            |
|                        | 90 % Ethanol          | 10 min            |
| Kontrastierung         | Kontrastierlösung B   | 30 min            |

|                            |                           |        |
|----------------------------|---------------------------|--------|
| Einbettung                 | Isopropanol:Epon<br>(2:1) | 15 min |
|                            | Isopropanol:Epon<br>(1:1) | 30 min |
|                            | Isopropanol:Epon<br>(1:2) | 60 min |
|                            | Epon (100 %)              | 24 h   |
| Wechsel des Einbettmediums | Epon (100 %)              |        |
| Polymerisation             | 3 d / 60° C               |        |

### 3.2.4. Hochdruckkryofixation

#### 3.2.4.1. Pankreasgewebe

Bei einer narkotisierten Maus (*mus musculus*) wurden kleine Gewebestücke des Pankreas herauspräpariert und in eine Petrischale mit Hexadecen überführt. Das Hexadecen fungierte dabei als Reagenz, die zum einen überschüssiges Wasser verdrängt und somit ein optimaler Drucktransfer während des Einfrierens gewährleistet und zum anderen, um Hohlräume zu verschließen, wodurch der Entstehung von Luftblasen, die den Druckaufbau behindern, entgegengewirkt wird (Studer et al., 1989). Anschließend wurde das Gewebe in ein Aluminiumplättchen (Ø 3 mm) mit einer 0,2 mm Aussparung gelegt und mit einem weiteren Aluminiumplättchen (plan) abgedeckt (Abb. 7A). Dieses „Sandwich“ wurde in den Halter des Hochdruckgefrierers überführt und bei 2100 bar mit flüssigem Stickstoff hochdruckgefroren. Die Proben wurden bis zur Kryosubstitution in flüssigen Stickstoff zwischengelagert (-196° C).

#### 3.2.4.2. Cellulosekapillare

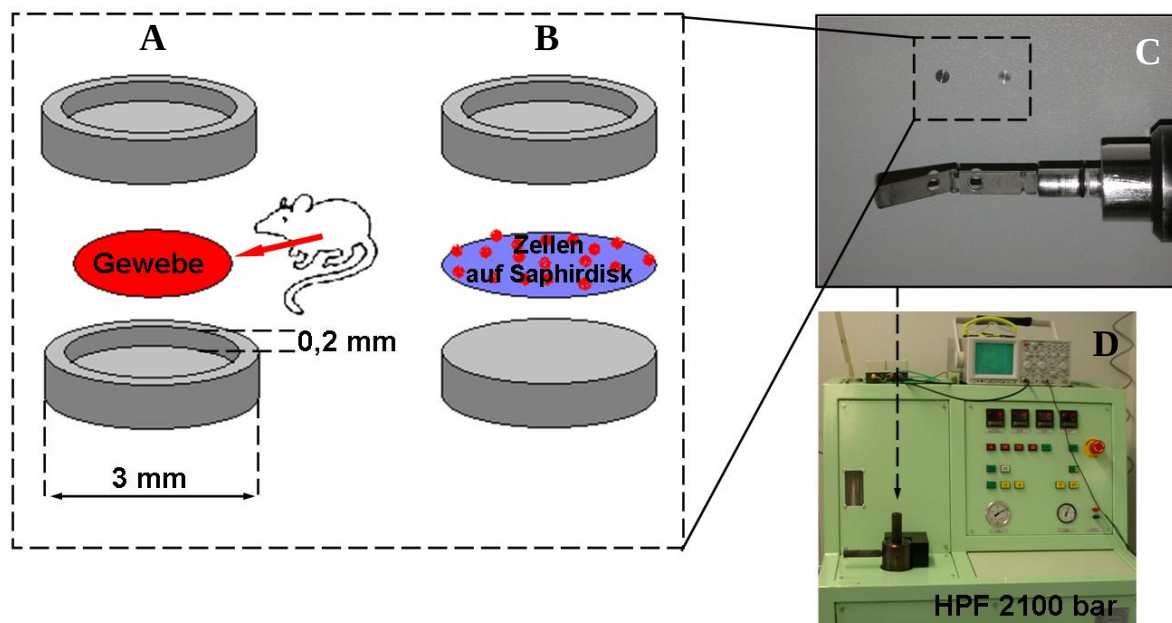
Die in einer Petrischale adhärent gewachsenen BON- und AR42J-Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst und komplett mit dem Medium in Reaktionsgefäße (1,5 ml) überführt. Anschließend wurden die Gefäße bei 8000 rpm 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und ein Teil des verbliebenen Pellets mit einer Cellulosekapillare aufgenommen (Hohenberg, 1994). Die Kapillare mit den darin enthaltenen Zellen wurde in

Hexadecen gegeben und in ca. 1,5 mm lange Stücke geschnitten. Die Hochdruckkryofixation erfolgte analog der Pankreasgewebspräparation (Abb. 7A).

#### 3.2.4.3. Saphirdisks

Die mit BON- und AR42J-Zellen bewachsenen Saphirdisks wurden aus der Multiwellplatte (6-well Platte) entnommen und das überschüssige Zellkulturmedium mit einem Filterpapier entfernt. Unmittelbar danach wurden die Saphirdisks kurz mit Hexadecen beschichtet, auf ein bereits im Halter des Hochdruckgefrierers befindliches Aluminiumplättchen (plan) gelegt und mit einem weiteren Aluminiumplättchen (Vertiefung 0,2 mm) abgedeckt. Dieses Sandwich wurde anschließend hochdruckkryofixiert (Abb. 7B).

Nach der Hochdruckkryofixation musste darauf geachtet werden, dass die gefrorenen Proben möglichst schnell in flüssigem Stickstoff überführt und dass ab diesem Zeitpunkt keine Erwärmung mehr stattfinden konnte, um eine Rekristallisierung des gefrorenen Wassers in den Proben zu verhindern.



**Abb. 7: Hochdruckkryofixation. Das Pankreasgewebestück (A) bzw. das mit adhärenen Zellen bewachsene Saphirdisk (B) wurde zwischen zwei Aluplättchen platziert. Anschließend wurde dieses Sandwich in den Halter (C) des Hochdruckgefrierapparates gegeben und bei 2100 hochdruckkryofixiert (D).**

### 3.2.4.4. Kryosubstitution und Einbettung

Um das Eis aus den hochdruckkryofixierten Proben schonend durch ein Lösungsmittel zu ersetzen, wurde eine Kryosubstitution mit Hilfe eines von der Z.E. Elektronenmikroskopie konstruierten Kryosubstitutionsgerätes durchgeführt. Dieses bestand aus einem Dewar, in dem ein Probenhalter aus Kupfer eingesetzt war. Die Temperatur des Halters konnte mit Hilfe eines Peltierelementes und einer Computersteuerung geregelt werden.

Für die Kryosubstitution wurden Reaktionsgefäße (1,5 ml) mit einer Kontrastierlösung befüllt und bei  $-90^{\circ}\text{C}$  im Probenhalter vorgekühlt. Anschließend wurden die hochdruckkryofixierten Proben in die gekühlte Kontrastierlösung gegeben. Später wurde die Temperatur des Probenhalters exponentiell erhöht (Abb. 8). Bei diesem Schritt wurde das Eis in den Proben langsam durch ein Lösungsmittel ersetzt und es erfolgte dabei Kontrastierung und Fixation. Nach erfolgter Kryosubstitution wurden die Proben in Epon oder LR-Gold eingebettet. Eine Übersicht der verwendeten Methoden ist in Tabelle 4 dargestellt.

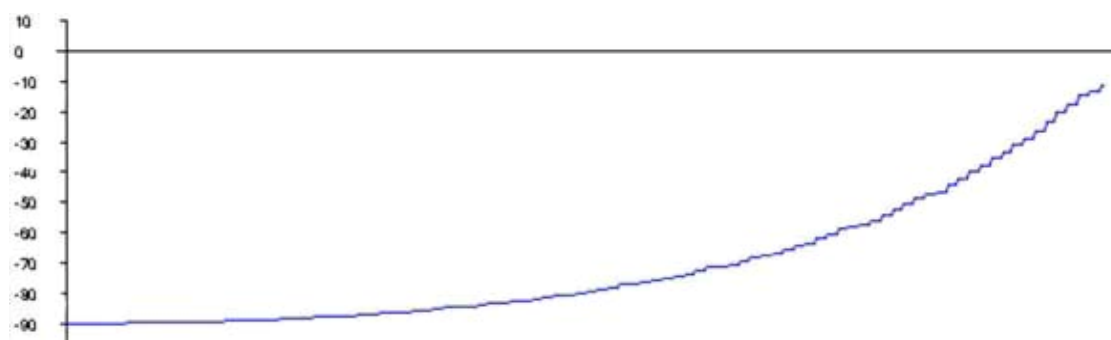


Abb. 8: Temperaturverlauf bei der Kryosubstitution (Epon-Einbettung: von  $-90^{\circ}\text{C}$  bis  $0^{\circ}\text{C}$ , LR-Gold-Einbettung: von  $-90^{\circ}\text{C}$  bis  $-20^{\circ}\text{C}$ )

Tab. 4: Standardmethoden und Modifikationen der Kryosubstitution .

| Arbeitsschritt         | Standard            |        |                    | Modifikationen      |
|------------------------|---------------------|--------|--------------------|---------------------|
|                        | Lösung              | Ink.   | Temperatur         |                     |
| <b>Epon-Einbettung</b> |                     |        |                    |                     |
| <u>Saphirdisks</u>     |                     |        |                    |                     |
| Gefriersubstitution    | Kontrastierlösung C | 20 h   | -90° C<br>auf 0° C | Kontrastierlösung D |
|                        |                     | 15 min | 0° C               |                     |
|                        |                     | 15 min | RT                 |                     |
| Waschschritte          | 3 x Aceton          |        | RT                 | Isopropanol         |

|                                                |                         |        |                      |                                               |
|------------------------------------------------|-------------------------|--------|----------------------|-----------------------------------------------|
| Einbettung                                     | Aceton:Epon<br>(1:1)    | 1 h    | RT                   | Isopropanol:Epon<br>(1:1)                     |
|                                                | Epon (100 %)            | 6 h    | RT                   |                                               |
| Wechsel des<br>Einbettmediums                  | Epon (100 %)            |        |                      |                                               |
| Polymerisation                                 | Epon (100 %)            | 3 d    | 60° C                | 55° C und 50° C                               |
| <b><i>LR-Gold</i></b>                          |                         |        |                      |                                               |
| <u>Saphirdisks</u>                             |                         |        |                      |                                               |
| Gefriersubstitution                            | Kontrastierlösung D     | 18 h   | -90° C auf<br>-20° C |                                               |
|                                                |                         | 60 min | -20° C               |                                               |
| Waschschritte                                  | Aceton                  |        | -20° C               |                                               |
| Einbettung                                     | Aceton:LR-Gold<br>(1:1) | 2 h    | -20° C               |                                               |
|                                                | LR-Gold (100 %)         | 1 h    | -20° C               |                                               |
| Polymerisation                                 | LR-Gold (100 %)         | 48 h   | -20° C / UV          | 48 h bei 0° C<br>Fensterbank<br>24 h unter UV |
| <u>Pankreasgewebe /<br/>Cellulosekapillare</u> |                         |        |                      |                                               |
| Gefriersubstitution                            | Kontrastierlösung D     | 18 h   | -90° C auf<br>-20° C |                                               |
|                                                |                         | 60 min | -20° C               |                                               |
| Waschschritte                                  | Aceton                  |        | -20° C               |                                               |
| Einbettung                                     | Aceton:LR-Gold<br>(1:1) | 2 h    | -20° C               |                                               |
|                                                | LR-Gold (100 %)         | 3 h    | -20° C               |                                               |
| Polymerisation                                 | LR-Gold (100 %)         | 48 h   | -20° C / UV          |                                               |

### 3.2.5. Anfertigung von Semi- und Ultradünnschnitten

Nach Epon-/LR-Gold-Einbettung und Polymerisation der chemisch fixierten Proben wurde zuerst ein Loch (3 mm) durch den Polymerblock und die Multiwellplatte gebohrt. Um die Probe in den Halter einspannen zu können, wurde mit einer Laubsäge eine rechteckige Form

aus dem Polymer herausgesägt. Der anhaftende Kunststoffrest von der Multiwellplatte konnte später im Fall von LR-Gold mit Hilfe eines Skalpells und im Fall von Epon durch flüssigem Stickstoff abgesprengt werden.

Bei hochdruckkryofixierten und kryosubstituierten Proben wurde das polymerisierte Blockchen aus dem Reaktionsgefäß (0,5 ml) herausgelöst und das Saphirdisk analog den chemisch fixierten und eingebetteten Proben abgesprengt. Die Zellen verblieben dabei im Polymerblock. Dieser wurde in einen Mikrotomhalter eingespannt und mit einer Präparierklinge trapezförmig zugetrimmt. Mit einem Ultra-Mikrotom (Schneidgeschwindigkeit 1 mm/s, Messerneigung 6°) wurden Ultradünnschnitte (70 nm) bzw. Semidünnschnitte (500 nm) hergestellt. Die Schnitte schwammen dabei auf der Oberfläche des im Diamantmesser integrierten Wasserbehälters und konnten mit zuvor abgeflammt, unbeschichteten Kupfernetzchen direkt entnommen, oder per Öse auf befilmte Kupfernetze, Finder-Netzchen oder Lochblenden übertragen werden. Nach einer 30 minütigen Trocknung bei 37° C wurden die Schnitte im Licht- bzw. Transmissionselektronenmikroskop analysiert. Um die Zellzahl von schwach kontrastierten Proben überprüfen zu können, wurden die Ultradünnschnitte (70 nm) mit Hilfe eines zugespitzten Rosenholzstabes auf einen Tropfen Aqua demin. überführt. Dieser Tropfen wurde anschließend bei 70° C auf einer Heizplatte verdampft und der Schnitt dadurch auf dem unterliegenden Objektträger fixiert. Diese Proben wurden dann mit Richardson-Lösung gefärbt, in DePex eingebettet und im Lichtmikroskop analysiert.

### 3.2.6. Besonderheiten der Präparation von STEM-Proben

Wurden Zellen für die STEM-Tomographie präpariert, erfolgten einige Modifikationen des Standardverfahrens. Hierzu wurden die kovalent mit Zellen bewachsenen Saphirdisks hochdruckkryofixiert, in der Kontrastierlösung D kryosubstituiert und anschließend in LR-Gold eingebettet. Nach einer 48 stündigen Polymerisationdauer bei Tageslicht und 0° C wurden 500 nm Semidünnschnitte hergestellt (Tab. 4). Um die Schnitte zu glätten, wurde das komplette Diamantmesser mit den darauf schwimmenden Schnitten auf 80° C erhitzt. Anschließend wurden die Schnitte mit einer Öse aufgefangen und auf ein mit Formvar befilmtes und mit einer Kohleschicht versehenes Kupfer-Findernetz gebracht. Nach dem Trocknen wurde ein Tropfen Poly-L-Lysin Lösung auf den Schnitt gegeben. Das Poly-L-Lysin führte dabei zu einer Erhöhung der Adhäsionsfähigkeit der später aufgetragenen Goldpartikel. Nach erneuter Trocknung bei 38° C erfolgte eine 5 minütige Inkubation mit

einer Lösung von kolloidalem Gold (Durchmesser 15 nm). Die Goldpartikel dienten dem Ausrichten der Einzelbilder für die tomographische Rekonstruktion.

### 3.3. Immunmarkierung an LR-Gold Schnitten

In den Voruntersuchungen wurden  $\alpha$ -Amylase-Immunmarkierungen an eingebetteten AR42J-Zellen und Mauspankreasgewebe bzw. Insulin-Immunmarkierungen an Mauspankreasgewebe (Inselzellen), BON Zellen und AR42J-Zellen (Kontrolle) durchgeführt. Die GFP- und PKD2-Immunmarkierungen erfolgten an transfizierten BON-Zellen. Die Markierungen wurde ausschließlich an in LR-Gold eingebetteten und dünn geschnittenen Proben, die auf Formvar befilmte Kupfer-Findernetzen aufgebracht waren, durchgeführt. In Vorversuchen wurden die Inkubationszeiten bzw. Antikörperverdünnungen ermittelt, die zu den höchsten Markierungsdichten führten. Alle Arbeitsschritte (Tab. 5) wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Hierzu wurde ein mit Aqua demin. getränktes Laborpapier in eine zuvor mit Parafilm ausgelegte Plastischale gegeben und mit einer Glasplatte abgedeckt. Alle Lösungen (außer den Antikörpern) wurden vor ihrer Verwendung bei 10000 rpm 2 min abzentrifugiert. Anschließend wurden Tropfen der so vorbereiteten Lösungen auf den Parafilm gegeben und die Netzen mit dem Schnitt nach unten auf die Tropfenoberfläche gelegt und inkubiert. Zuerst erfolgte eine Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen mit PBG (5 min), hierauf folgte die Inkubation mit dem Erstantikörper. Um die nicht gebundenen Primärantikörper zu entfernen, wurden die Schnitte drei mal mit PGB gewaschen (je 4 min). Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Danach wurden die Schnitte erneut drei mal mit PBG behandelt (3 min) und zwei mal mit PBS gewaschen. Drei weitere Waschschrte mit Aqua demin. (je 2 min) folgten. Als Kontrolle dienten Immunmarkierungen an nicht transfizierten BON-Zellen sowie Markierungen ohne Primärantikörper an transfizierten Zellen.

**Tab. 5: Verdünnungen und Inkubationszeiten der verwendeten Antikörper. Abkürzungen: Ink, Inkubationszeit**

| Primärantikörper        | Verdünnung | Ink.   | Sekundärantikörper | Verdünnung | Ink.   |
|-------------------------|------------|--------|--------------------|------------|--------|
| Anti- $\alpha$ -Amylase | 1:50       | 20 min | GAR 10 nm          | 1:50       | 20 min |
| Anti-GFP<br>Abcam       | 1:250      | 20 min | GAR 10 nm          | 1:50       | 20 min |
|                         | 1:250      | 20 min | Protein A 10 nm    | 1:50       | 20 min |
| Anti-GFP                | 1:25       | 60 min | GAR 10 nm          | 1:20       | 15 min |

|                                       |       |        |                 |      |        |
|---------------------------------------|-------|--------|-----------------|------|--------|
| BD biosciences                        |       |        |                 |      |        |
| Anti-GFP                              | 1:100 | 50 min | GAR 10 nm       | 1:50 | 30 min |
| Mol. Probes                           | 1:200 | 30 min | Protein A 10 nm | 1:50 | 30 min |
| Anti-GFP Roche                        | 1:100 | 50 min | GAM 10 nm       | 1:50 | 25 min |
| Anti-GFP<br>Rockland                  | 1:100 | 20 min | RAG 10 nm       | 1:50 | 20 min |
| Anti-GFP<br>Torrey Pines<br>Biolabs   | 1:200 | 20 min | GAR10 nm        | 1:50 | 25 min |
| Anti-Insulin<br>AM029-<br>5M/MU029-UC | 1:80  | 20 min | GAM 10 nm       | 1:50 | 20 min |
| Anti-PKD2<br>Upstate                  | 1:50  | 20 min | GAR 10 nm       | 1:50 | 20 min |
| Anti-PKD2<br>Orbigen                  | 1:50  | 60 min | GAR 10 nm       | 1:50 | 20 min |

### 3.4. DAPI-Kernfärbung

Die DNA-Fluoreszenzfärbung erfolgte an auf Formvar-befilmten Kupfer-Findernetzen aufgetragenen LR-Gold Ultradünnschnitten (70 nm). Alle Arbeitsschritte wurden in einer mit Parafilm ausgelegter feuchten Kammer durchgeführt (s.o.). Auf diesen Parafilm wurden Tropfen der DAPI-Lösung gegeben und die Netzen mit dem Schnitt nach unten auf die Tropfenoberfläche gelegt. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurden die Netze mit PBS gewaschen und im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

### 3.5. Licht- und Elektronenmikroskope

Eine Übersicht der verwendeten Mikroskope wird in Tabelle 6 dargestellt.

**Tab. 6: Die verwendeten Mikroskope.**

| <i>Mikroskop</i>        | <i>Untersuchung</i>          |
|-------------------------|------------------------------|
| <b>Lichtmikroskopie</b> |                              |
| Stemi SV6               | - Abspaltung der Saphirdisks |

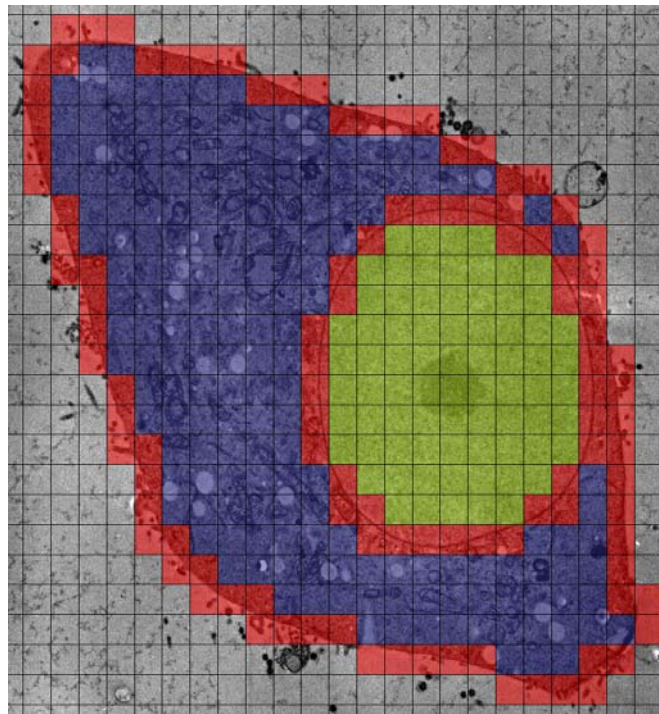
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | - Markierung des Trimmbereiches                                                     |              |          |     |     |     |         |     |     |     |     |     |                                                                                                                                                                                                                      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------|----------|-----|-----|-----|---------|-----|-----|-----|-----|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| IX 71<br>Objektive: 10- und 40-fach                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | - Bestimmung der Zellzahl an lebenden Zellen.                                       |              |          |     |     |     |         |     |     |     |     |     |                                                                                                                                                                                                                      |
| Standard 14<br>Objektiv: 40-fach                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | - Bestimmung der Zellzahl an, mit Richardson-Lösung angefärbten Ultradünnschnitten. |              |          |     |     |     |         |     |     |     |     |     |                                                                                                                                                                                                                      |
| Fluoreszenzmikroskopie                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                     |              |          |     |     |     |         |     |     |     |     |     |                                                                                                                                                                                                                      |
| Axiovert 25 und Axiovert 135<br>Objektive: 10-, 40- und 100-fach.<br>Filter: <table border="1"><thead><tr><th>Anregung</th><th>Strahlleiter</th><th>Emission</th></tr></thead><tbody><tr><td>365</td><td>395</td><td>420</td></tr><tr><td>450-490</td><td>510</td><td>520</td></tr><tr><td>546</td><td>580</td><td>590</td></tr></tbody></table> | Anregung                                                                            | Strahlleiter | Emission | 365 | 395 | 420 | 450-490 | 510 | 520 | 546 | 580 | 590 | - Bestimmung der Transfektionsraten der lebenden Zellen<br>- Auf Objektträgern eingebettete transfizierte Zellen<br>- Auf Obekträgern eingebettete, Golgin markierte Zellen.<br>- Korrelative Untersuchungen LM-TEM. |
| Anregung                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Strahlleiter                                                                        | Emission     |          |     |     |     |         |     |     |     |     |     |                                                                                                                                                                                                                      |
| 365                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 395                                                                                 | 420          |          |     |     |     |         |     |     |     |     |     |                                                                                                                                                                                                                      |
| 450-490                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 510                                                                                 | 520          |          |     |     |     |         |     |     |     |     |     |                                                                                                                                                                                                                      |
| 546                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 580                                                                                 | 590          |          |     |     |     |         |     |     |     |     |     |                                                                                                                                                                                                                      |
| Elektronenmikroskopie                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                     |              |          |     |     |     |         |     |     |     |     |     |                                                                                                                                                                                                                      |
| EM-10 und EM-400<br>Beschleunigungsspannung: 80 kV                                                                                                                                                                                                                                                                                               | - Untersuchungen an in Epon und LR-Gold Ultradünngeschnittenen Proben               |              |          |     |     |     |         |     |     |     |     |     |                                                                                                                                                                                                                      |
| Titan 80-300<br>Beschleunigungsspannung: 300 KV<br>Kippwinkel: -70° bis +70°                                                                                                                                                                                                                                                                     | - STEM-Tomographie                                                                  |              |          |     |     |     |         |     |     |     |     |     |                                                                                                                                                                                                                      |

### 3.6. Statistische Auswertungen

Für die statistische Auswertungen wurde die Software WinSTAT 3.1. Greulich Software 1991-1995 verwendet.

### 3.6.1. Statistische Auswertung der Immunmarkierungen

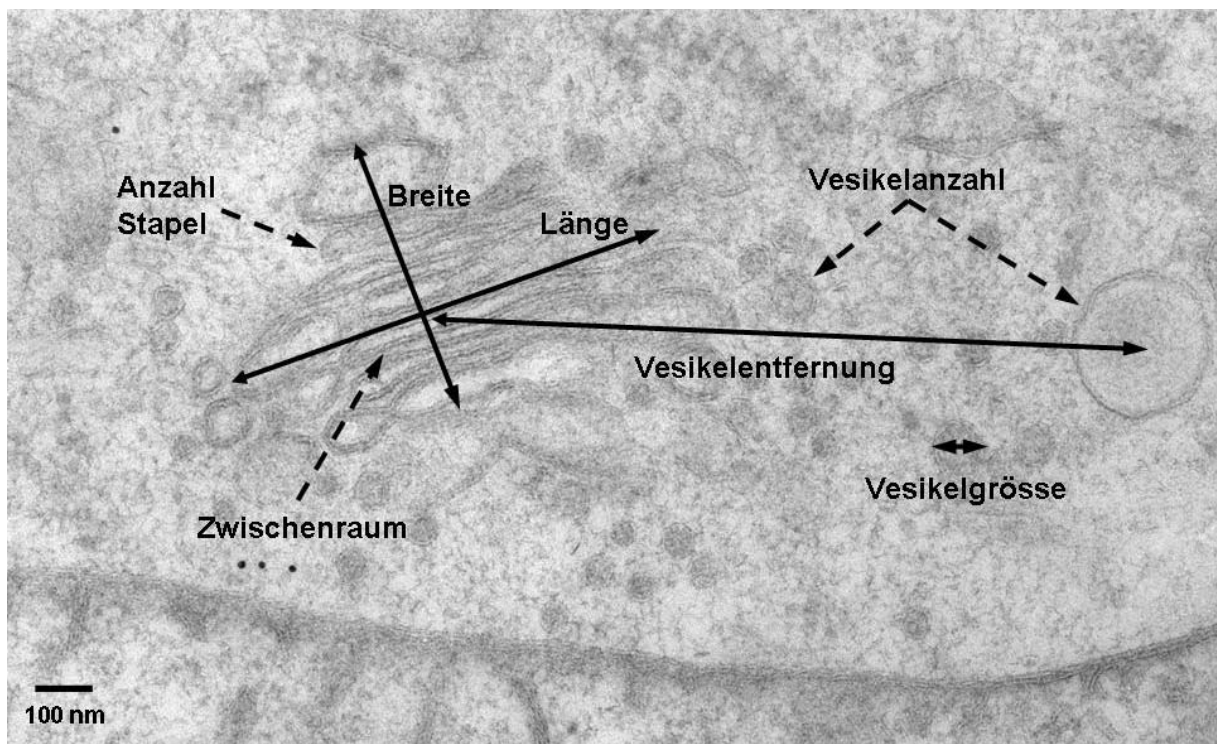
Für die Untersuchung wurde ein Raster über die TEM-Bilder gelegt und die Goldpartikel im Kern und im Zytoplasma ausgezählt. Durch das Raster konnte später das Verhältnis Kernfläche zu Zytoplasmafläche berechnet und gleichgestellt werden (Abb. 9). Die Tests für die Partikeldichte waren eine monofaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) und eine Post-hoc-Test nach Tukey.



*Abb. 9: TEM-Aufnahme mit dem überlagerten Rastersystem. Das Verhältnis der Kernfläche (grün) zur Zytoplasmafläche (blau) konnte damit berechnet werden. Für die Berechnung nicht berücksichtigte Grenzbereiche sind in rot dargestellt.*

### 3.6.2. Statistische Untersuchungen am Golgi-Apparat

Für die statistischen Untersuchungen des Golgi-Apparates wurden Aufnahmen mit einer definierten Fläche ( $1,90\text{ }\mu\text{m} \times 2,63\text{ }\mu\text{m}$ ) ausgewertet. Es wurden verschiedene Golgi-Parameter vermessen und ausgezählt (Abb. 10). Nach einer monofaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) und einem Post-hoc-Test nach Tukey konnten die einzelnen Golgi-Parameter verglichen werden.



*Abb. 10: Die statistisch erfassten Parameter zur Struktur des Golgi-Apparates.*

## 4. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, PKD2 in kultivierten Karzinoidzellen ultrastrukturell nachzuweisen und morphologische Veränderungen durch Überexprimierung dieser Proteinkinase zu erfassen. Dazu mussten die bestehenden fluoreszenz- und elektronenmikroskopischen Methoden ergänzt, verbessert und miteinander kombiniert werden.

### 4.1. Voruntersuchungen

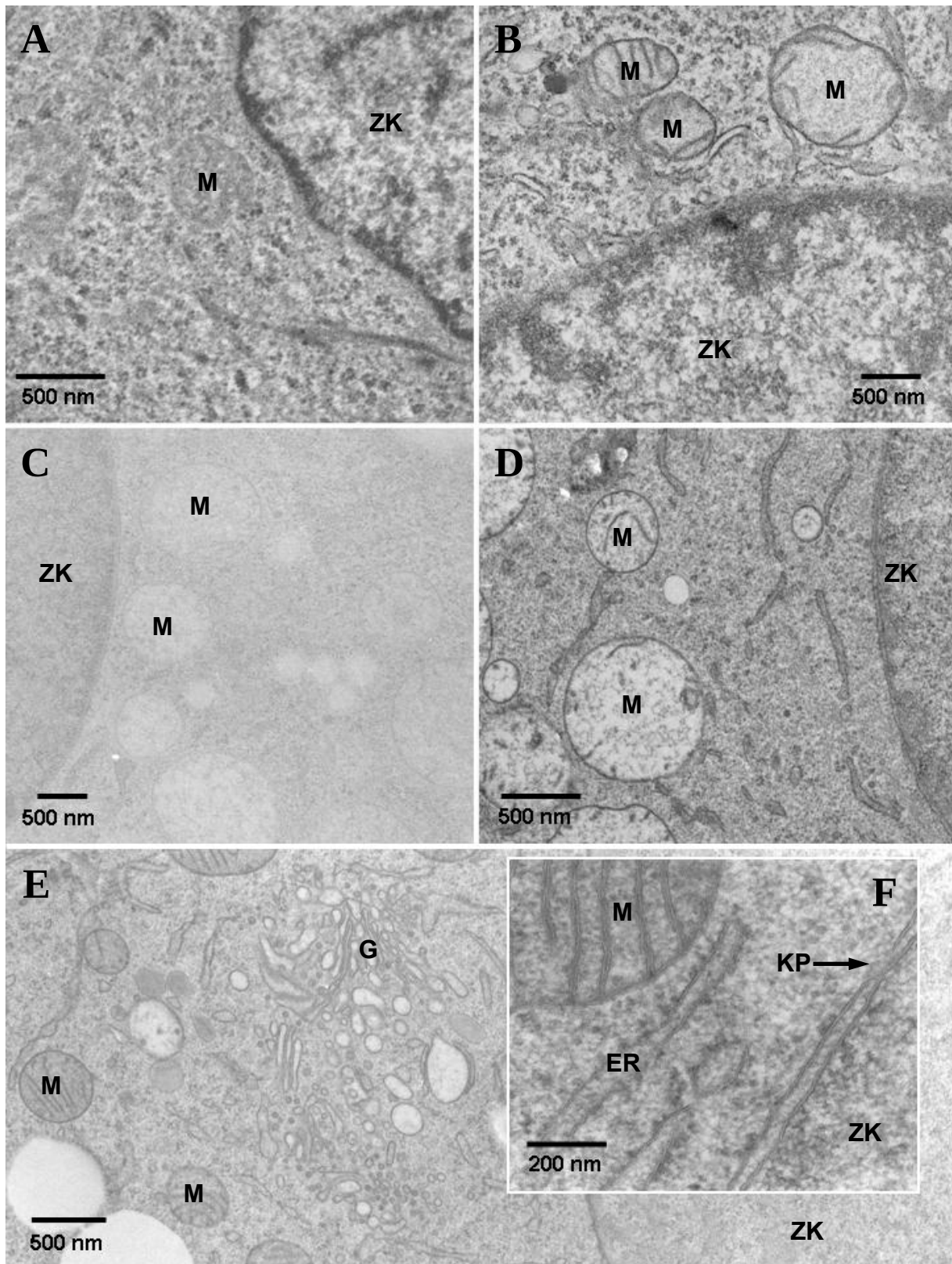
#### 4.1.1. Elektronenmikroskopische Voruntersuchungen

##### *4.1.1.1. Einbettungsverfahren für die Immunmarkierung*

Um an den in Polymer eingebetteten und ultradünngeschnittenen Proben Immunmarkierungen durchführen zu können, wurden die Standardeinbettungsverfahren modifiziert, da bei diesen Verfahren Osmiumtetroxyd als Kontrastmittel verwendet wird, was die Antigene maskiert und strukturell verändert (Schwarz & Humbel, 2007). In Vorversuchen wurden daher BON-Zellen mit unterschiedlichen Fixations- und Einbettungsverfahren ohne Osmium präpariert und miteinander verglichen.

Im ersten Teil der Studie erfolgte eine klassische chemische Fixation der BON-Zellen. Als Kontrastmittel wurde hierbei nur Uranylacetat verwendet. Die Zellen, die adhärent auf 24-well Platten wuchsen, wurden chemisch fixiert und in Epon eingebettet. Die Kernmembranen konnten hierbei nicht nachgewiesen werden. Die Zellkerne zeigten eine wellenförmige Abgrenzung zum Zytoplasma. Die Cristae der Mitochondrien konnten nicht genau lokalisiert werden (Abb. 11A). Diese Präparationsmethode wurde erneut durchgeführt, wobei LR-Gold statt Epon als Einbettmedium verwendet wurde. Weil das LR-Gold am Boden der 24-Platte nicht vollständig auspolymerisieren konnte, wurden die adhärenen BON-Zellen auf Saphirdisks in LR-Gold eingebettet. Obwohl das LR-Gold jetzt gut auspolymerisierte, zeigten diese Zellen eine ähnlich schlechte Ultrastruktur. Die Membransysteme wiesen erneut wellenförmige Strukturen auf. Die ultrastrukturelle Qualität der Mitochondrien, insbesondere der Cristae war jedoch deutlicher besser als bei den in Epon eingebetteten Proben (Abb. 11B).

Bei den folgenden Voruntersuchungen wurden daher nur hochdruckkryofixierte Proben verwendet. Zuerst wurde eine Mischung von Isopropanol und Uranylacetat als Kryosubstitutionslösung verwendet und die Proben anschließend in Epon eingebettet. Die BON-Zellen wiesen hierbei kaum Kontrast im TEM auf (Abb. 11C). Wurde jedoch stattdessen eine Lösung aus Aceton und Uranylacetat verwendet, so zeigten die Proben einen deutlich besseren Kontrast. Die Membransysteme waren klar zu erkennen und der Zellkern und die Mitochondrien wiesen keine wellenartigen Einbuchtungen auf (Abb. 11D). Da sich an in Epon eingebetteten Proben in der Regel keine direkte Immunmarkierung, d. h. ohne eine chemische Behandlung der Polymeroberfläche, durchführen lässt (Kandala et al., 2005; Röcken & Roessner, 1999 ), wurden mit Aceton und Uranylacetat substituierte Zellen in LR-Gold eingebettet (Gilkerson et al., 2003; Mullin et al., 2001). Um das GFP-Fluoreszenzsignal von GFP-exprimierenden Zellen zu erhalten, erfolgte die Polymerisation nicht unter künstlicher UV-Exposition (48 h) sondern auf der Fensterbank (48 h). Zellen, die mit dieser Methode präpariert wurden, zeigten im TEM eine optimale Strukturhaltung (Abb. 11E). Die Membransysteme waren deutlich erkennbar (Abb. 11F).



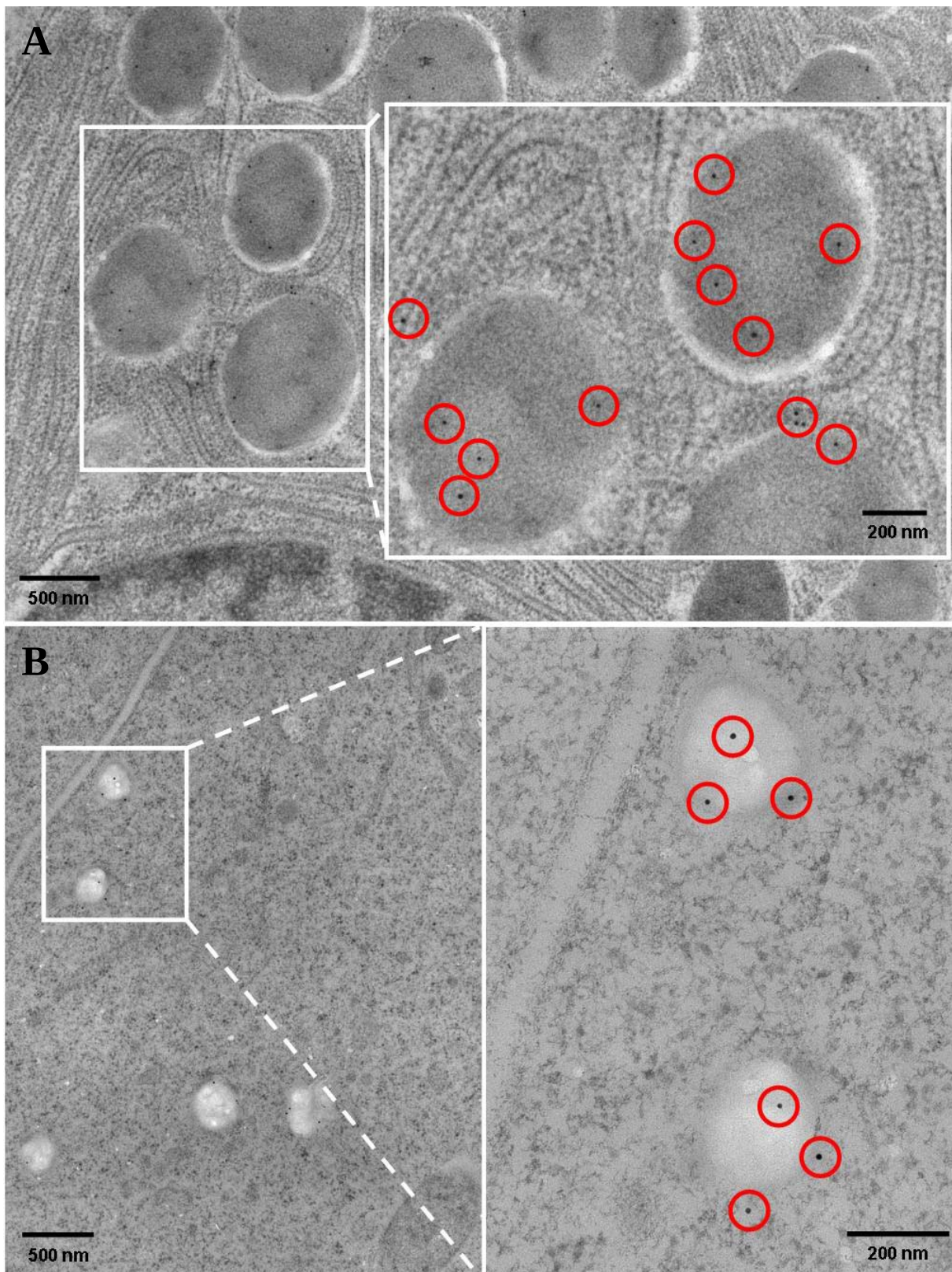
**Abb. 11:** Einbettungsverfahren ohne Osmiumtetroxyd. Die Abbildungen A und B zeigen Proben, die chemisch fixiert und in Epon und LR-Gold eingebettet wurden. Hochdruckkryofixierte und in Epon und LR-Gold eingebettete Proben werden auf den Abbildungen C, D, E und F aufgeführt. (A) Bei der chemischen Fixation und der Einbettung in Epon wiesen die BON-Zellen eine schlechte Ultrastruktur auf. Die Kernmembran war wellenförmig verändert und das Cristea-Membransystem der Mitochondrien nur

undeutlich erkennbar. (B) Eine in LR-Gold eingebettete BON-Zelle. Die Mitochondrien wiesen hierbei einen wellenförmigen Habitus auf, während die Kerndoppelmembran nicht ersichtlich war. (C) Wurden BON-Zellen hochdruckkryofixiert und für die Kryosubstitution Isopropanol als Lösungsmittel verwendet, zeigten die in Epon eingebetteten Proben im TEM fast kein Kontrast. (D) Hochdruckkryofixierte und mit Aceton kryosubstituierte und in Epon eingebettete BON-Zellen wiesen im Vergleich hierzu ein besserer Kontrast im TEM auf. (E; F) Hochdruckkryofixierte, in LR-Gold eingebettete und 48 h auf der Fensterbank auspolymerisierte Probe. Diese Präparationsmethode zeigte die beste Strukturhaltung (E). Doppelmembransysteme der Mitochondrien und des Zellkernes waren deutlich sichtbar (F). Abkürzungen: ER, Endoplasmatisches Retikulum; G, Golgi-Apparat; KP, Kernpore; M, Mitochondrium; ZK, Zellkern;

#### 4.1.1.2. $\alpha$ -Amylase- und Insulin-Immunogoldmarkierung

Um eine geeignete Methode und die Effizienz der Immunogoldmarkierung an Pankreaskarzinomzellen ermitteln zu können, wurden  $\alpha$ -Amylase-Markierungen an hochdruckgefrorenem, gefriersubstituiertem, in LR-Gold eingebettetem und ultradünngeschnittenem Pankreasgewebe der Maus (*Mus musculus*) durchgeführt. Dieses System bot den Vorteil, dass die Lokalisation der  $\alpha$ -Amylase bereits bekannt war. Unsere Markierungen entsprachen den Daten aus der Literatur: Markiert mit Goldpartikeln waren die Zymogen-Granula und das ER (Posthuma et al., 1988; Abb. 12A). Weiterführende Untersuchungen an Pankreasgewebe sind durch Andrea Scheffler im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt worden (Scheffler, 2007). Die  $\alpha$ -Amylase-Immunogoldmarkierung an kultivierten exokrinen Pankreaskarzinomzellen Typ AR42J ergab ein Signal in bestimmten Vesikeln, jedoch mit einer deutlich geringeren Partikeldichte als im zuvor untersuchten Pankreasgewebe (Abb. 12B).

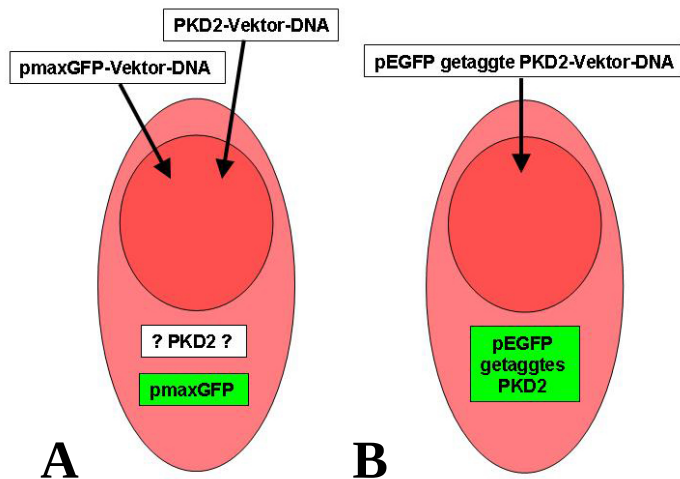
Eine Insulin-Immunogoldmarkierung wurde sowohl an Mauspankreasgewebe (Inselzellen) als auch an den kultivierten Karzinoidzellen Typ BON und den zuvor verwendeten exokrinen AR42J-Zellen durchgeführt. Die AR42J-Zellen dienten hierbei als Kontrolle. Bei allen Untersuchungen war mit dem verwendeten Antikörper AM029 der Firma BioGenex kein spezifisches Signal nachweisbar.



**Abb. 12:**  $\alpha$ -Amylase-Immunogoldmarkierungen an in LR-Gold eingebettetem und ultradünngeschnittenem Mauspankreasgewebe (*Mus musculus*) und in exokrinen AR42J-Zellen. (A) Das Pankreasgewebe zeigte Goldpartikel im Granula und ER. (B) Die AR42J-Zellen wiesen Markierungen im Granula auf, jedoch mit einer deutlich geringen Partikeldichte.

#### 4.1.2. Lichtmikroskopische Voruntersuchungen an lebenden humanen Karzinoidzellen (BON)

Damit die verwendeten Zelllinien PKD2 und GFP exprimierten, mussten sie 24 h vor der weiteren Verwendung mit der entsprechenden Vektor-DNA transfiziert werden. Im ersten Teil der Untersuchung wurden Zellen mit PKD2-Vektor-DNA transfiziert und mit pmax-Vektor-DNA cotransfiziert (Abb. 13A). Eine genaue Lokalisation von PKD2 war mit dieser Methode nicht möglich, da das Fluoreszenzsignal nur vom exprimierten GFP stammte und nicht von PKD2. Im zweiten Teil der Untersuchung wurden deshalb Zellen verwendet, die mit pEGFP getaggter PKD2-Vektor-DNA transfiziert wurden (Abb. 13B). Für beide Untersuchungen wurden drei verschiedene PKD2-Vektor-DNA-Konstrukttypen verwendet; PKD2wt, PKD2da und PKD2se.

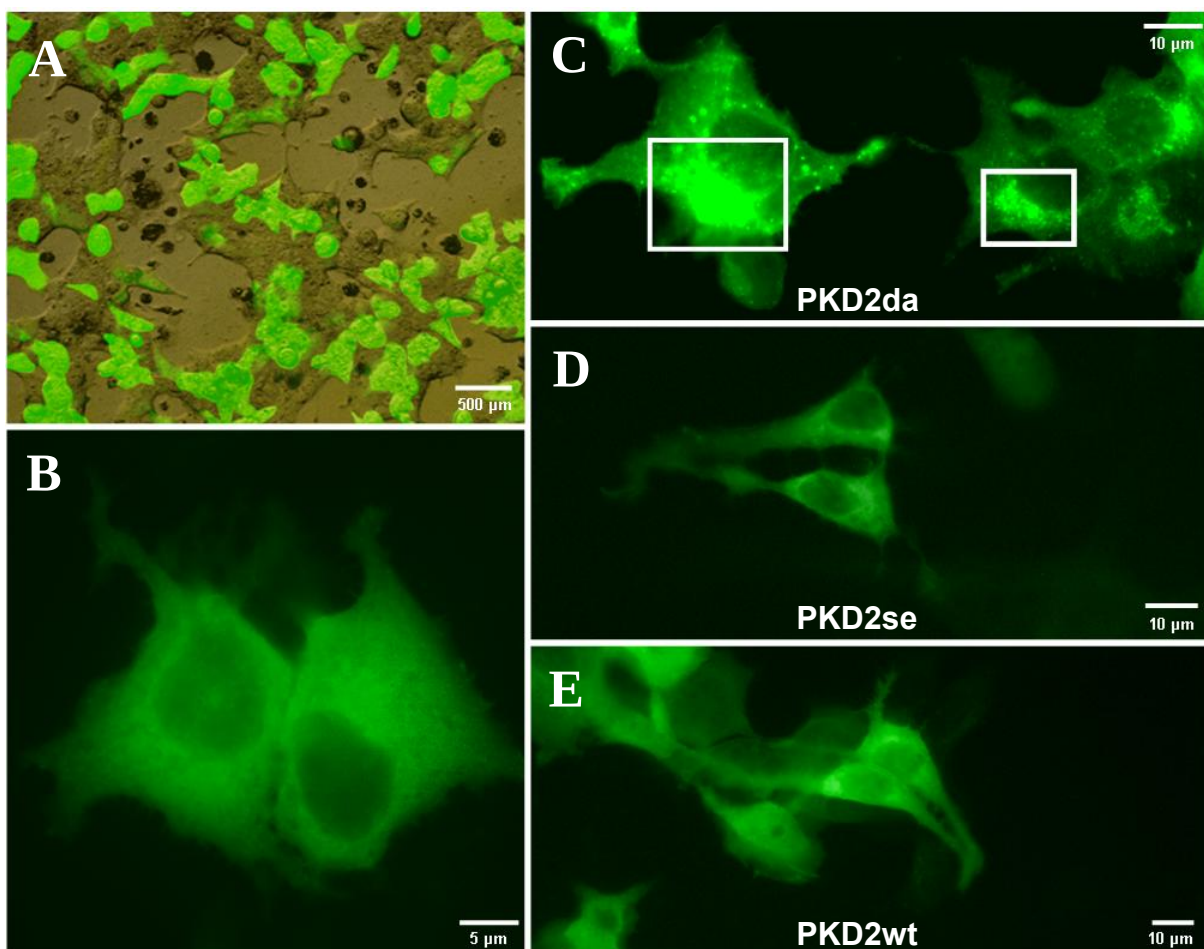


**Abb. 13:** Die für die Transfektion verwendeten Vektor-DNA Typen. (A) Zellen, die mit PKD2-DNA transfiziert und mit pmaxGFP-DNA cotransfiziert wurden. Die genaue Lokalisation von PKD2 war mit dieser Methode nicht möglich. (B) Zellen die mit pEGFP getaggtter PKD2-Konstrukt-DNA transfiziert wurden.

Nach Transfektion und anschließender 24-stündiger Inkubation wurde die Transfektionsrate der lebenden BON-Zellen ermittelt. Die Transfektionseffizienz beider Transfektionsmethoden (Nucleofector und Nanofectin) ergaben Werte zwischen 60 % und 80 % (Abb. 14A).

Die mit verschiedener PKD2-Konstrukt-DNA (wt, se und da) transfizierten und mit GFP-DNA cotransfizierten und auf Objektträgern fixierten BON-Zellen wurden fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Alle transfizierten Zellen zeigten ein deutliches Fluoreszenzsignal im Zytoplasma ohne genaue Lokalisation. Der Zellkern wies ein deutlich schwächeres Signal als das Zytoplasma auf. Erwartungsgemäß konnten keine Unterschiede zwischen den verschiedenen PKD2-Konstrukten festgestellt werden (Abb. 14B).

BON-Zellen, die mit verschiedener GFP getaggtter PKD2-Konstrukt-DNA transfiziert wurden, zeigten hingegen deutliche Unterschiede. Zellen, die PKD2da überexprimierten, wiesen kugelförmige fluoreszierende Strukturen im Zytoplasma auf. Eine clusterförmige Anhäufung dieser Strukturen wurde in Zellkernnähe beobachtet (Abb. 14C). PKD2wt und PKD2se exprimierende Zellen zeigten eine ähnliche Verteilung des Fluoreszenzsignals im Zytoplasma mit zum Teil helleren Bereichen (Abb. 14D; Abb. 14E). PKD2se exprimierende Zellen wiesen jedoch im Vergleich zu den PKD2wt exprimierenden Zellen ein schwächeres Signal auf (Abb. 14D).



**Abb. 14:** Lichtmikroskopische Untersuchungen an lebenden humanen neuroendokrinen Pankreaskarzinoidzellen (BON). (A) 60 % - 80 % Transfektionsrate der mit PKD2wt-DNA transfizierten und mit GFP-DNA cotransfizierten lebenden Zellen. Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme wurde mit einer Phasenkontrastaufnahme überlagert. (B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von PKD2wt-DNA transfizierten und mit GFP-DNA cotransfizierten Zellen. (C) GFP getaggttes PKD2da-Konstrukt exprimierende Zellen. Die rechteckigen Markierungen zeigen clusterförmige fluoreszierende Strukturen. (D) GFP getaggttes PKD2se-Konstrukt exprimierende Zellen. (E) GFP getaggttes PKD2wt-Konstrukt exprimierende Zellen. Das Fluoreszenzsignal ist ausgeprägter als bei der PKD2se-Konstrukt Expression.

4.2. Korrelative Mikroskopie an humanen Karzinoidzellen (BON) und exokrinen Ratten-Pankreaskarzinomzellen (AR42J), die mit PKD2-Konstrukt-DNA transfiziert und mit pmaxGFP-DNA cotransfiziert wurden (Abb. 13A).

#### 4.2.1. Humane Karzinoidzelllinie (BON)

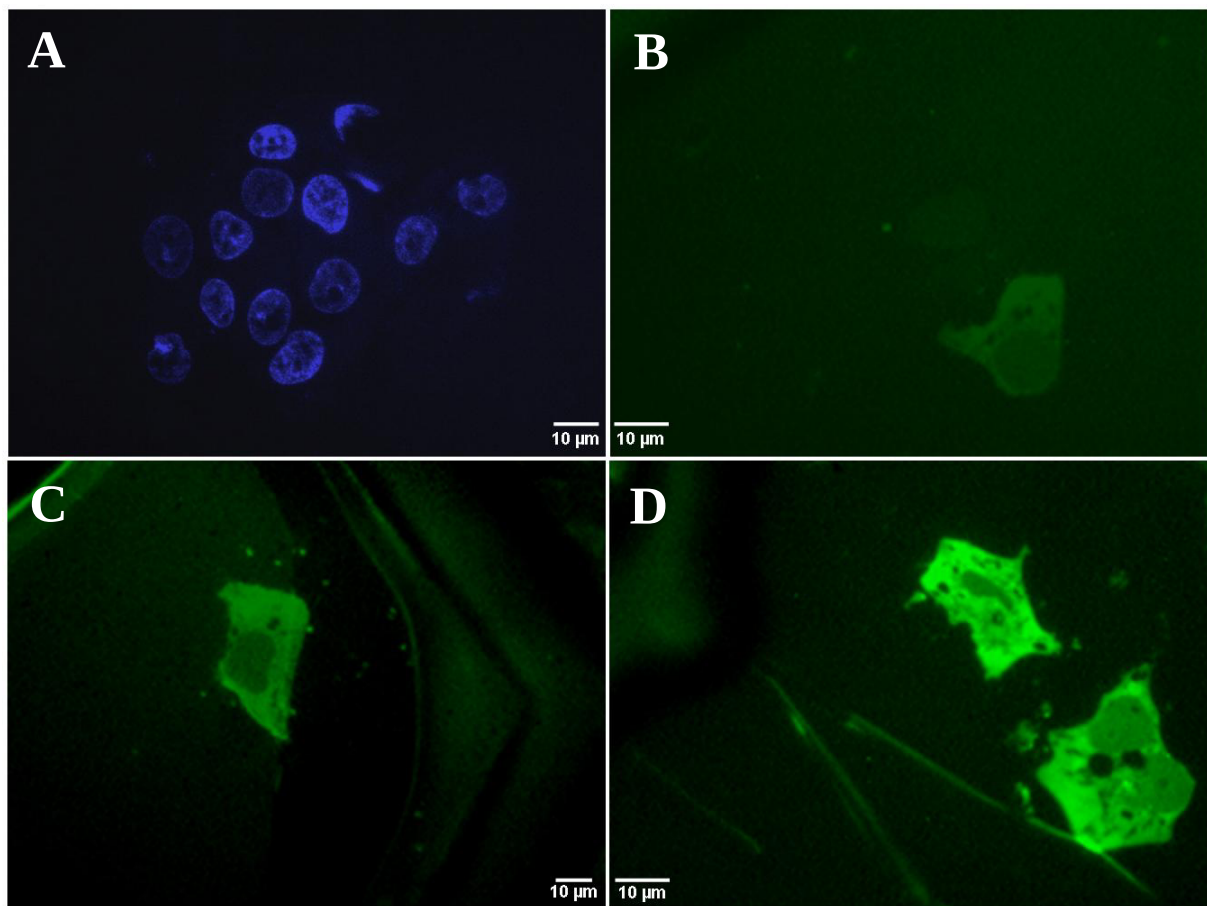
##### *4.2.1.1. Kombination von Fluoreszenz- und Transmissionselektronenmikroskopie an Ultradünnschnitten*

Ultradünnschnitte der transfizierten, hochdruckgefrorenen und in Polymer (LR-Gold oder Epon) eingebetteten BON-Zellen wurden auf befilmte Kupfer-Findernetzchen überführt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Um alle Zellen erkennen zu können, wurde eine DAPI-Kernfärbung durchgeführt. Bei den in LR-Gold eingebetteten Proben war diese deutlich nachweisbar (Abb. 15A). Im Vergleich hierzu war bei den in Epon eingebetteten Proben kein DAPI-Signal erkennbar.

Die fluoreszenzmikroskopische Identifikation der pmax-GFP-DNA transfizierten BON-Zellen war sowohl bei Epon- als auch bei LR-Gold-Ultradünnschnitten möglich.

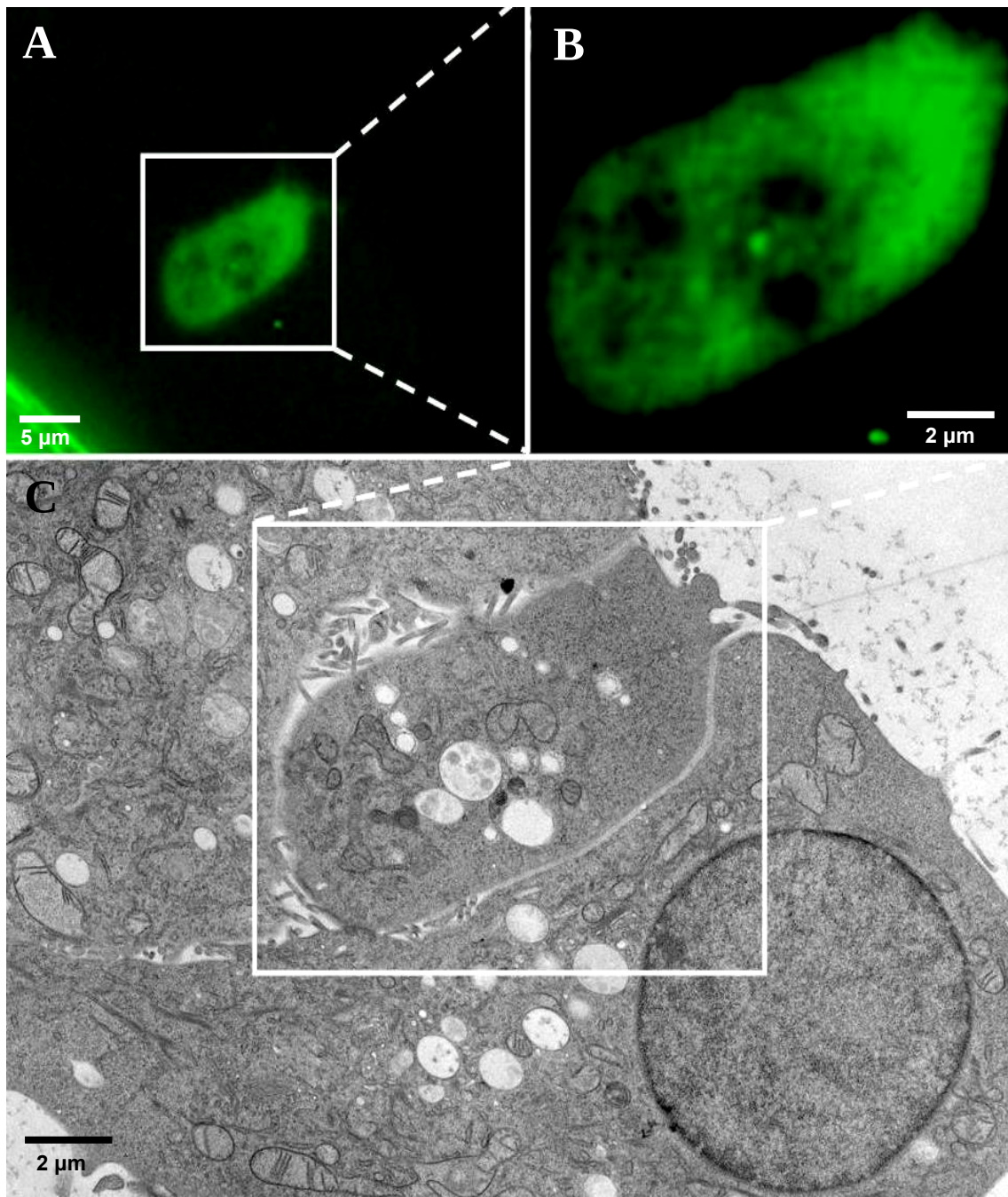
Hochdruckkrofixierte Proben, die mit dem Standardverfahren in Epon (Kontrastierlösung C / 60° C Polymerisation) eingebettet wurden, zeigten kein Fluoreszenzsignal. Wurden jedoch bei diesem Einbettungsverfahren Modifikationen vorgenommen (Kontrastierlösung D bei 50° C Polymerisation), war das GFP-Signal in den transfizierten Zellen deutlich in den Ultradünnschnitten nachweisbar (Abb. 15B). Bei der anschließenden elektronenmikroskopische Analyse zeigten die Proben eine deutliche Verschlechterung der Ultrastruktur im Vergleich zu dem Standardeinbettungsverfahren.

Bei den in LR-Gold eingebetteten und ultradünngeschnittenen Proben ergab das Standardeinbettungsverfahren (48 h UV-Polymerisation) ein schwaches Fluoreszenzsignal in den transfizierten Zellen (Abb. 15C). Wurden jedoch auch hier Modifikationen des Standardeinbettungsverfahrens durchgeführt (24 h UV-Polymerisation bzw. 48 h Polymerisation bei 0° C auf der Fensterbank) erhielt man ein deutlich stärkeres GFP-Fluoreszenzsignal. (Abb. 15D). Bei der anschließenden TEM-Untersuchung ließen sich keine ultrastrukturellen Zellveränderungen gegenüber dem Standarteinbettungsverfahren feststellen.



**Abb. 15:** *Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an in Polymer (LR-Gold oder Epon) eingebetteten und ultradünngeschnittenen BON-Zellen, die zuvor mit PKD2-Konstrukt-DNA transfiziert und mit pmaxGFP-DNA cotransfiziert wurden. (A) DAPI-gefärbter LR-Gold-Ultradünnschnitt. Die Zellkerne sind deutlich erkennbar. (B) Epon Ultradünnschnitt. Ein schwaches GFP Signal ist nach der Einbettung erkennbar. (C) LR-Gold eingebettete BON Zelle nach 48 h UV-Polymerisation. Wiederum ist ein schwaches GFP-Signal in dem Ultradünnschnitt erkennbar. (D) LR-Gold eingebettete Zellen nach 48 h Polymerisation auf der Fensterbank. Ein ausgeprägtes GFP-Signal ist in dem Ultradünnschnitt nachweisbar.*

Die Methode erlaubte es, die selben Ultradünnschnitte fluoreszenz- und elektronenmikroskopisch zu untersuchen. Da die Schnitte auf Kupfer-Findernetzen aufgebracht wurden, war ein späteres Wiederfinden der transfizierten Zellen im TEM möglich. Im Fluoreszenzmikroskop konnten Bereiche mit starker oder keiner GFP-Expression nachgewiesen werden (Abb. 16A; Abb. 16B). Bei der anschließenden elektronenmikroskopischen Analyse konnten die Bereiche ultrastrukturell benannt werden (Abb. 16C). Das GFP-Fluoreszenzsignal wurde hauptsächlich im Zytoplasma festgestellt, während im Kern wenig und in den Zellorganellen keine Fluoreszenz erkennbar war.



**Abb. 16: Kombination von Fluoreszenz- und Transmissionselektronenmikroskopie an Ultradünnschnitten.**  
 (A) Bei der fluoreszenzmikroskopischen Analyse der Ultradünnschnitte sind die mit PKD2da-DNA und mit GFP-DNA cotransfizierten BON-Zellen deutlich erkennbar. Abb. 18 B zeigt eine vergrößerte Ansicht der selben transfizierten Zelle. Es sind Bereiche mit starker oder keiner GFP-Expression erkennbar. Bei der anschließenden TEM-Analyse des selben Schnittes konnten diese Bereiche ultrastrukturell benannt werden. Erst bei der TEM-Abbildung wurden zwei nicht transfizierte Zellen erkennbar, die die transfizierte Zelle umgaben (C).

#### 4.2.1.2. GFP-Immunmarkierung

Die Kombination von Fluoreszenz- und Transmissionselektronenmikroskopie am selben Ultradünnschnitt erlaubte es eine Spezifitätskontrolle von GFP-Antikörpern durchzuführen. Um das pmaxGFP immunologisch lokalisieren zu können, wurden an den in LR-Gold eingebetteten BON-Zellen Immunogoldmarkierungen mit verschiedenen Primärantikörpern und Sekundärantikörpern durchgeführt. Nur drei der verwendeten Primärantikörper zeigten bei GFP exprimierenden Zellen die zu erwartenden Goldpartikel im Zytoplasma (Tab. 7). Eine Kontrolluntersuchung dieser drei positiv getesteten Primärantikörpern mit Protein A Gold als Sekundärantikörper ergab das gleiche Ergebnis wie bei den zuerst verwendeten Sekundärantikörpern. Der Antikörper von Roche wies eine deutlich stärkere Markierung im Kern als im Zytoplasma auf, die als unspezifisch klassifiziert wurden. Er wurde deshalb für weiterführende Untersuchungen nicht mehr verwendet.

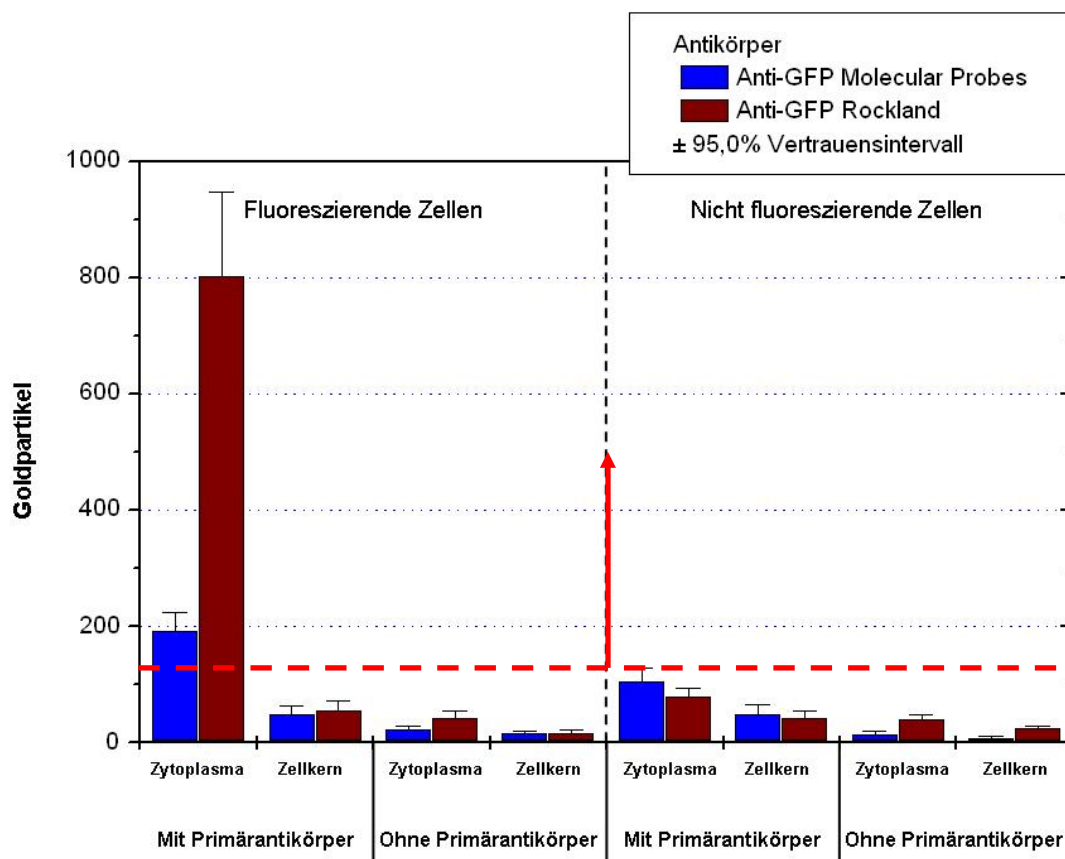
**Tab. 7: Übersicht der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper und deren Markierungsdichte bei GFP exprimierenden Zellen. (-) weniger als 10 Goldpartikel, (+) 10 bis 100 Goldpartikel, (++) 100 bis 400 Goldpartikel und (+++) mehr als 400 Goldpartikel.**

| Primärantikörper                                  | Sekundärantikörper | Markierungsdichte |            |
|---------------------------------------------------|--------------------|-------------------|------------|
|                                                   |                    | Zellkern          | Zytoplasma |
| Anti-GFP<br>Abcam AB 6556-25                      | GAR                | +                 | -          |
| Anti-GFP<br>BD Biosciences<br>clontech Lot 632377 | GAR                | ++                | -          |
| Anti-GFP Molecular<br>Probes A 6455               | GAR                | +                 | ++         |
| Anti-GFP<br>Roche                                 | GAM                | ++                | +          |
| Anti-GFP<br>Rockland Lot 17549                    | RAG                | -                 | +++        |
| Anti-GFP<br>Torrey pines<br>biolabsTP-401         | GAR                | ++                | -          |

Die stärksten Markierungen im Zytoplasma und die schwächsten Markierung im Zellkern zeigten die Antikörper von Molecular Probes und Rockland (Tab. 7). Um eine genauere Spezifitätsausage dieser beiden „positiv“ ermittelten Antikörper treffen zu können, wurde in einem neuen Experiment eine statistische Auswertung durchgeführt (Abb. 17). Die Goldpartikelzahl wurde dabei in Zellkern und Zytoplasma der GFP-exprimierenden Zellen (fluoreszierend) und der nicht-GFP-exprimierenden Zellen (nicht fluoreszierend) verglichen.

Der Antikörper Anti-GFP von Molecular Probes zeigte eine signifikante spezifische Bindung im Bereich des Zytoplasmas der GFP-exprimierenden Zellen. Er wies jedoch auch unspezifische Markierungen im Zytoplasma von nicht-GFP-fluoreszierenden Zellen und in Zellkernen auf (Abb. 17; Abb. 18A; Tab. 8). Um eine unspezifische Bindung der Sekundärantikörper (GAR) ausschließen zu können, wurden zusätzlich Immunogoldmarkierungen ohne Primärantikörper durchgeführt. Diese zeigten keine unspezifischen Markierungen (Abb. 17; Tab. 8).

Der Antikörper Anti-GFP von Rockland wies spezifische Markierungen im Bereich des Zytoplasmas der GFP-exprimierenden Zellen auf (Abb. 17; Abb. 18A; Tab. 8). Unspezifische Bindungen konnten statistisch nicht nachgewiesen werden (Abb. 17; Tab. 8). Der verwendete Sekundärantikörper (RAG) zeigte auch hier keine unspezifischen Markierungen (Abb. 17; Tab. 8). Für weitere Untersuchungen wurde deshalb der Antikörper Anti-GFP der Firma Rockland verwendet.

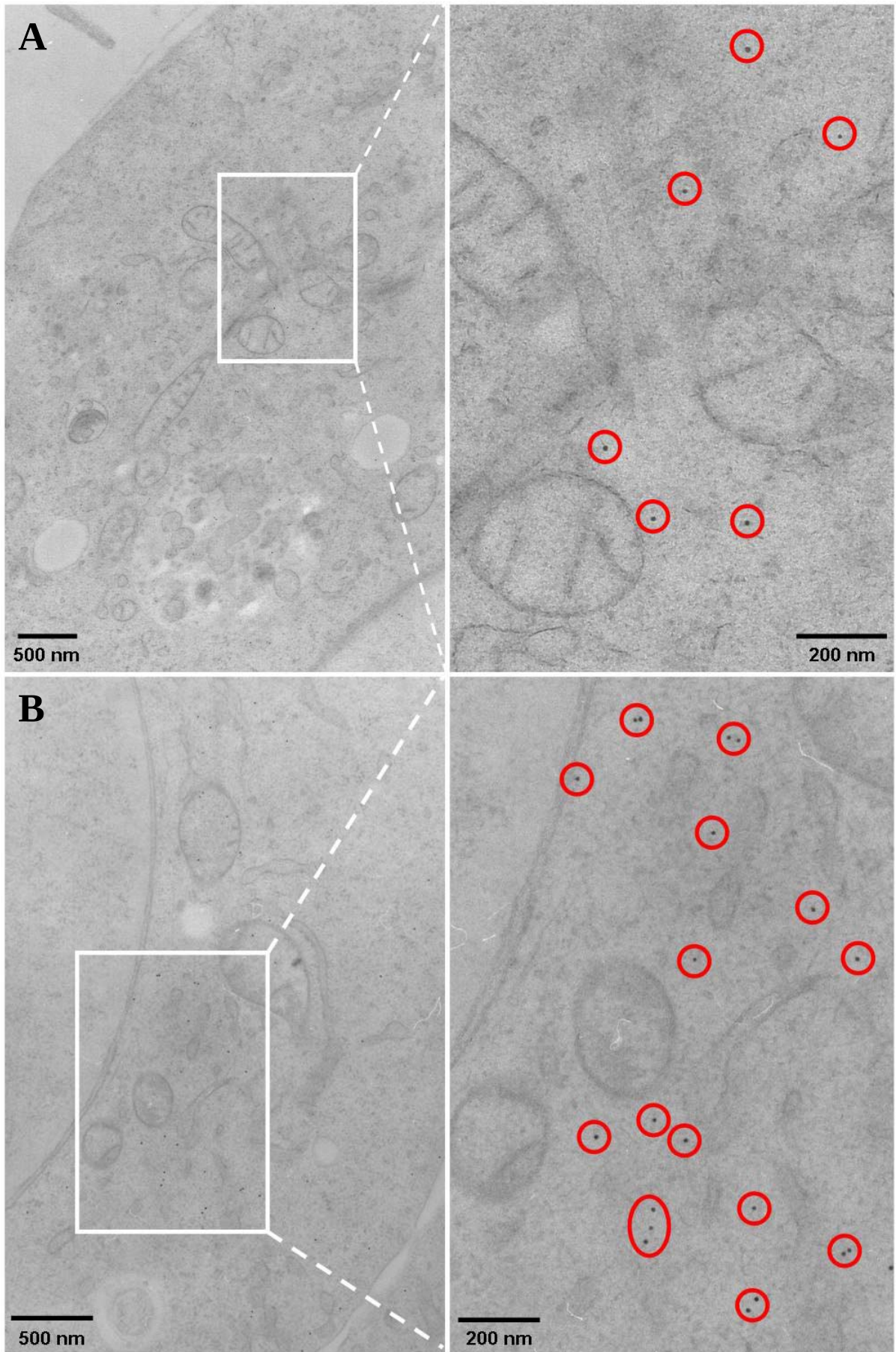


**Abb. 17:** Statistische Auswertung von Immunogoldmarkierungen der beiden Antikörpern Anti-GFP von Molecular Probes und Anti-GFP von Rockland. Die Abbildung zeigt die Goldpartikelanzahl im Zytoplasma und Zellkern mit und ohne Primärantikörper bei GFP-exprimierenden Zellen (fluoreszierende Zellen) und

*nicht GFP-exprimierenden Zellen (nicht-fluoreszierende Zellen). Der Bereich oberhalb der roten Linie zeigt die spezifische Markierungsdichte.*

*Tab. 8: Ergebnisse der Varianzanalyse (ANOVA), sowie des post-hoc Tests nach Tukey bezüglich der Goldpartikelanzahl im Zytoplasma/Zellkern mit und ohne Primärantikörper. Abkürzungen: Fluoreszierende Zellen (FZ), nicht-fluoreszierende Zellen (NFZ), mit Primärantikörper (mPA), Zellerkern (ZK) und Zytoplasma (ZP)*

|                              | ANOVA       |          | Tukey                                            |
|------------------------------|-------------|----------|--------------------------------------------------|
|                              | F (df)      | P        |                                                  |
| Anti-GFP<br>Molekular Probes | 86,7 (7/79) | < 0,0001 | FZ mPA ZP vs NFZ mPA<br>ZP vs NFZ mPA ZK vs Rest |
| Anti-GFP<br>Rockland         | 136 (7/79)  | < 0,0001 | FZ mPA ZP vs Rest                                |



*Abb. 18: GFP Immunogoldmarkierungen an GFP exprimierenden BON-Zellen. (A) Immunmarkierung mit dem Antikörper Anti-GFP von Molekular Probes. Goldpartikel sind im Zytoplasma nachweisbar. (B) Immunmarkierung mit dem Antikörper Anti-GFP von Rockland. Goldpartikel sind wiederum im Zytoplasma nachweisbar jedoch mit deutlich höherer Dichte als bei dem zuvor untersuchten Antikörper von Molekular Probes.*

#### 4.2.2. Exokrine Ratten-Pankreaskarzinomzelllinie (AR42J)

Die Elektronenmikroskopische Untersuchungen an AR42J-Zellen wurden eingestellt, da sich die Kultur und die Transfektion als zu unzuverlässig erwies.

### 4.3. Untersuchungen an humanen Karzinoidzellen (BON) transfiziert mit pEGFP getaggtter PKD2-Konstrukt-DNA (Abb. 13B)

#### 4.3.1. Kombination von Fluoreszenz- und Transmissionselektronenmikroskopie an Ultradünnschnitten

Bei den mit pEGFP getaggtter PKD2-Konstrukt-DNA transfizierten BON-Zellen war eine Kombination von Fluoreszenz- und Transmissionselektronenmikroskopie an den Ultradünnschnitten nicht mehr möglich, da ein GFP-Fluoreszenzsignal nach dem hochdruckkryofixieren, der Gefriersubstitution und dem Einbetten in Epon und LR-Gold nicht mehr nachzuweisen war. Modifikationen der TEM-Standardpräparationsmethode zeigten auch kein positives Ergebnis (Tab. 9).

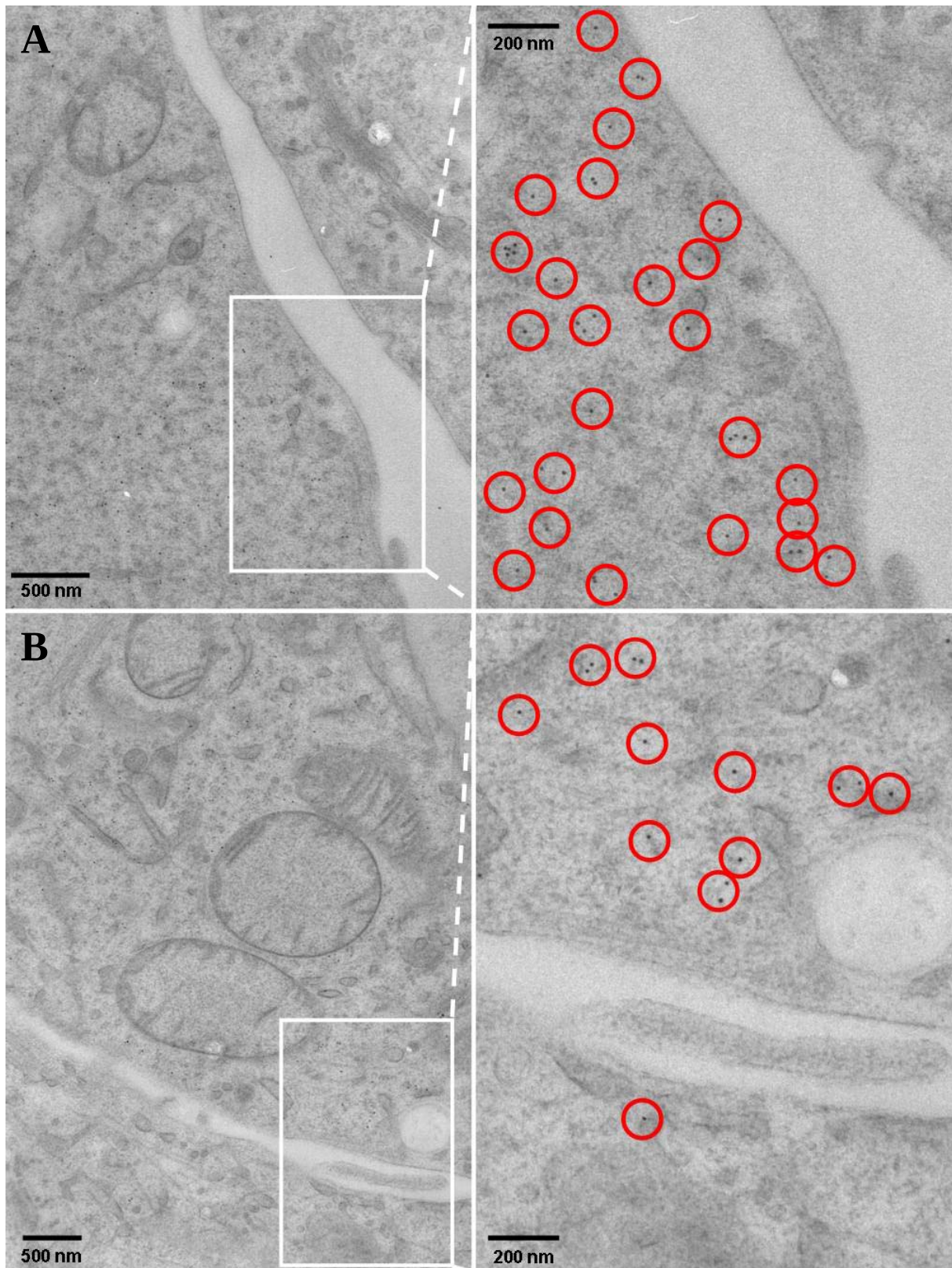
**Tab. 9: Modifikationen der TEM-Standardpräparationsmethode mit dem Ziel GFP-Fluoreszenzsignale an Dünnschnitten zu erhalten.**

| Modifikationen der Präparationsmethode                                                                            | Fluoreszenzsignal                  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| <i>Polymerisation:</i><br>LR-Gold:<br>12 h und 24 h UV Aushärtung<br>12 h und 24 h Aushärtung auf der Fensterbank | Kein Fluoreszenzsignal nachweisbar |
| Änderung der Schnittdicke von 70 nm auf 100 nm, 500 nm und 1 µm bei LR-Gold und EPON eingebetteten Proben         | Kein Fluoreszenzsignal nachweisbar |
| <i>Substitution:</i><br>Substitutionslösung: Ethanol und Isopropanol                                              | Kein Fluoreszenzsignal nachweisbar |

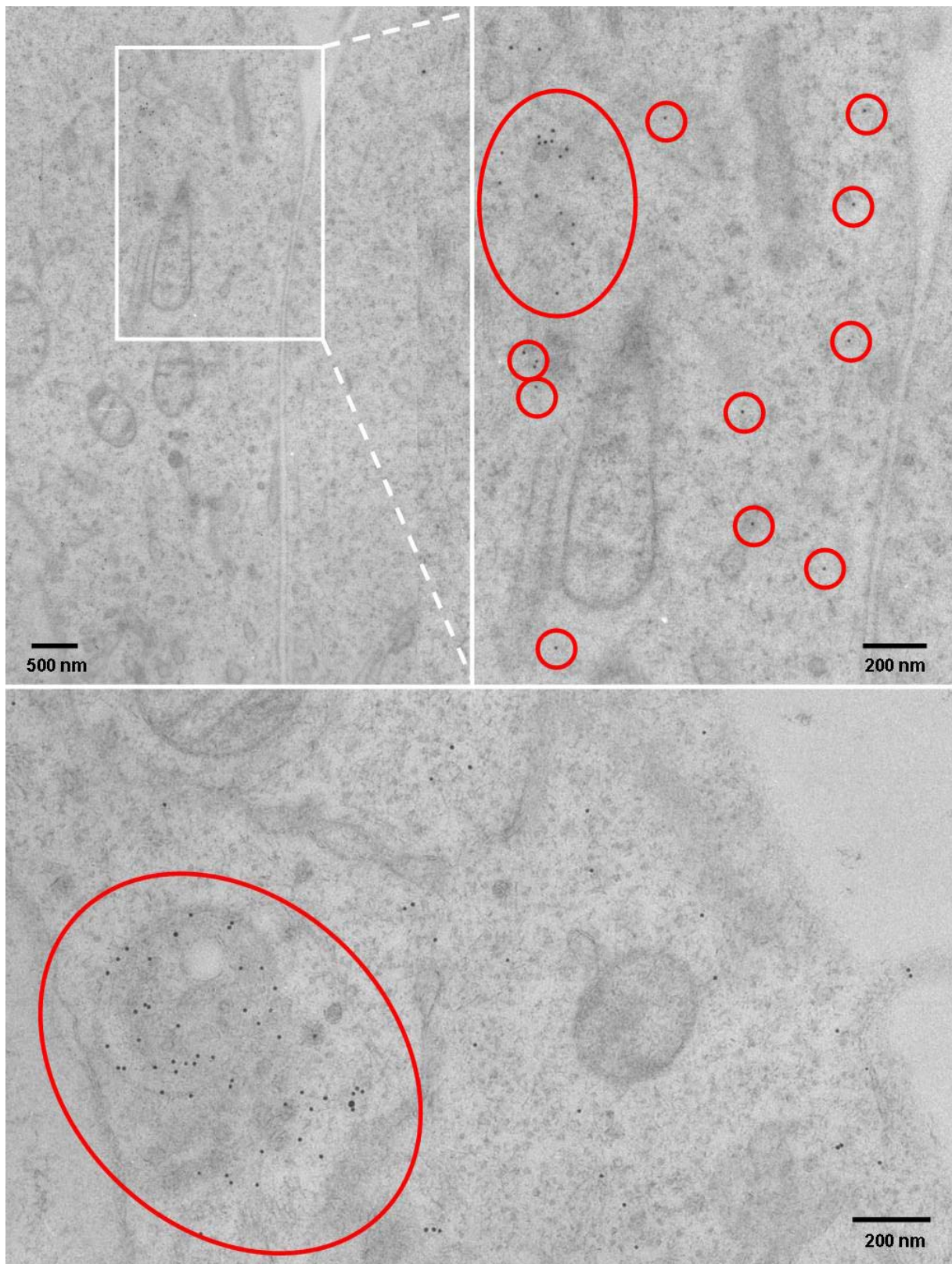
#### 4.3.2. Immunmarkierung

##### *4.3.2.1. GFP-Immunmarkierung*

Für die Immunmarkierung wurde der Antikörper Anti-GFP von Rockland Lot 17549 verwendet. Dabei zeigten pEGF-PKD2wt und pEGFP-PKD2se exprimierende Zellen das gleiche Markierungsmuster. Sie wiesen Goldpartikel im Zytoplasma auf, jedoch ohne genau definierbare Lokalisation (Abb. 19). Im Vergleich hierzu zeigten pEGFP-PKD2da exprimierende Zellen clusterförmige Anhäufungen von Goldpartikeln an nicht genau bestimmbaren Strukturen im Zytoplasma, sowie weitläufige Markierungsbereiche im Zytoplasma (Abb. 20). Auffallend war bei diesem Zelltyp die geringe Anzahl transfizierter Zellen, die nach Hochdruckkryofixation, Gefriersubstitution und Einbettung noch gefunden wurden. Die Transfektionsrate nach 24 h Inkubation betrug bei den lebenden Zellen 60 % - 80 % während nach der Präparation für die Elektronenmikroskopie weniger als 10 % transfizierte Zellen gefunden wurden. Die Adhäsion der transfizierten Zellen auf dem Saphirdisk war offenbar bedeutend schlechter als bei den anderen beiden transfizierten Zelltypen wie auch bei den nicht-transfizierten Zellen. Eine geringe Verbesserung der Adhäsion wurde durch eine Poly-L-Lysin Beschichtung der Saphirdisks erreicht (transfizierte Zellen im elektronenmikroskopischen Präparat um 10 %).



**Abb. 19:** GFP-Immunogoldmarkierung an pEGFP-PKD2 exprimierenden BON-Zellen. (A) pEGFP-PKD2wt exprimierende Zelle. Eine gleichmäßige Verteilung der Goldpartikel im Zytoplasma ist erkennbar. (B) pEGFP-PKD2se exprimierende Zelle. Das Markierungsmuster der Goldpartikel gleicht der einer pEGFP-PKD2wt Markierung.



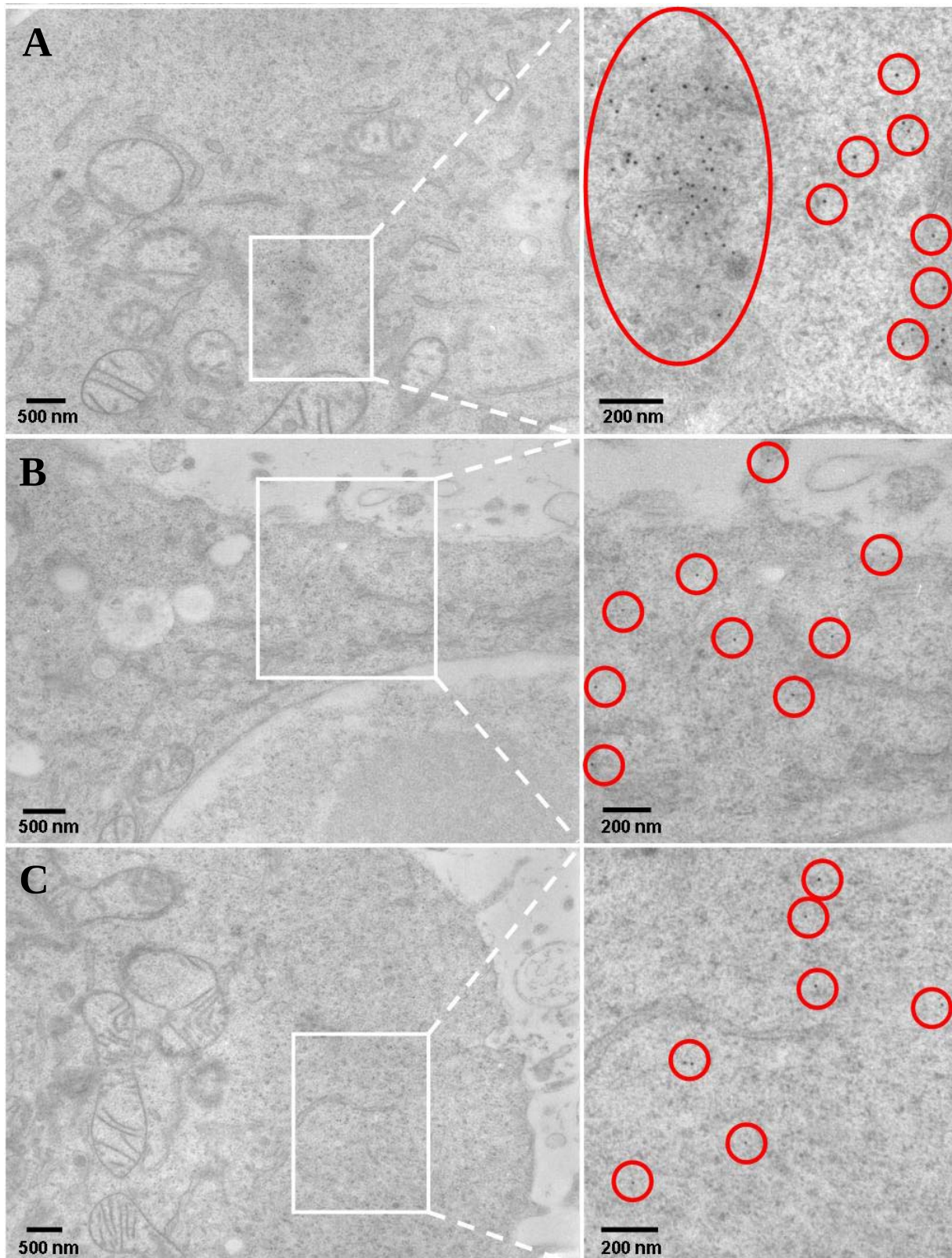
**Abb. 20:** GFP-Immunogoldmarkierung an pEGFP-PKD2da exprimierenden BON-Zellen. Clusterförmige Goldpartikelanhäufungen an nicht näher bestimmbare Zellstrukturen sind erkennbar. Größere Bereiche mit Goldpartikeln um die Cluster sind zu sehen.

#### 4.3.2.2. PKD2-Immunmarkierung

Um die Spezifität des zuvor verwendeten GFP-Antikörpers speziell bei pEGFP-Expression ermitteln zu können, wurde eine Immunmarkierung mit zwei verschiedenen PKD2-Antikörpern durchgeführt (Tab. 10). Das Markierungsmuster des PKD2-Antikörpers der Firma Orbigen deckte sich mit den zuvor gemachten GFP-Markierungen s.o. (Abb. 21). Der Antikörper der Firma Upstate wies hingegen nur unspezifische Markierungen im Zellkern auf.

*Tab. 10: Übersicht der getesteten Anti-PKD2-Primärantikörper und Sekundärantikörper und deren Markierungsdichte bei pEGFP-PKD2 exprimierenden Zellen. (-) weniger als 10 Goldpartikel, (+) 10 bis 100 Goldpartikel und (++) 100 bis 400 Goldpartikel.*

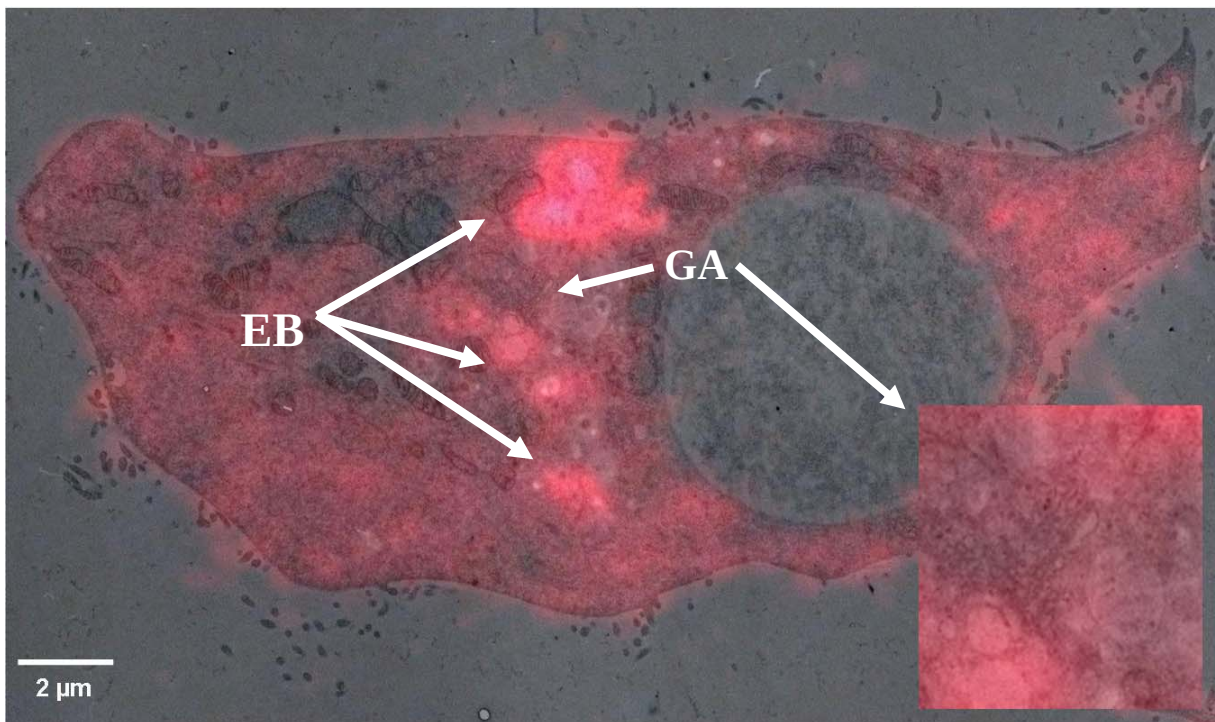
| Primärantikörper                | Sekundärantikörper | Markierungsdichte |            |
|---------------------------------|--------------------|-------------------|------------|
|                                 |                    | Zellkern          | Zytoplasma |
| Anti-PKD2<br>Upstate Lot 24561  | GAR                | ++                | -          |
| Anti-PKD2<br>Orbigen PAB -10222 | GAR                | +                 | ++         |



**Abb. 21: PKD2-Immunogoldmarkierung an pEGFP-PKD2 exprimierenden BON-Zellen.** (A) pEGFP-PKD2<sub>da</sub> exprimierende Zelle. Clusterförmige Markierungsbereiche sind in den Zellen erkennbar (analog der GFP-Immunmarkierung (Abb. 9)). (B) pEGFP-PKD2<sub>wt</sub> und (C) pEGFP-PKD2<sub>se</sub> exprimierende Zellen. Eine gleichmäßige Verteilung der Goldpartikel im Zytoplasma ist erkennbar.

#### 4.3.2.3. Lokalisation des PKD2-Expressionsbereiches mit Hilfe eines Cy3-Fluoreszenz-Sekundärantikörpers

Um den PKD2-Expressionsbereich nachweisen zu können, wurde eine Immunmarkierung mit dem Primärantikörper Anti-GFP von Rockland und einem Cy3-Sekundärantikörper an Ultradünnschnitten (70 nm) und Semidünnschnitten (500 nm) durchgeführt. Zuerst wurde das Fluoreszenzsignal an den Dünnschnitten im LM lokalisiert, anschließend wurden sie im TEM und im STEM ausgewertet. Die pEGFPPKD2wt und pEGFPPKD2se exprimierenden Zelltypen wiesen ein gleichmäßiges Fluoreszenzsignal im Zytoplasma auf, während die pEGFPPKD2da exprimierenden Zellen starke fluoreszierende Bereiche zeigten (Abb. 22). Es fiel auf, dass diese Bereiche stets in der Nähe, jedoch nie direkt auf einem Golgi-Apparat zu finden waren.



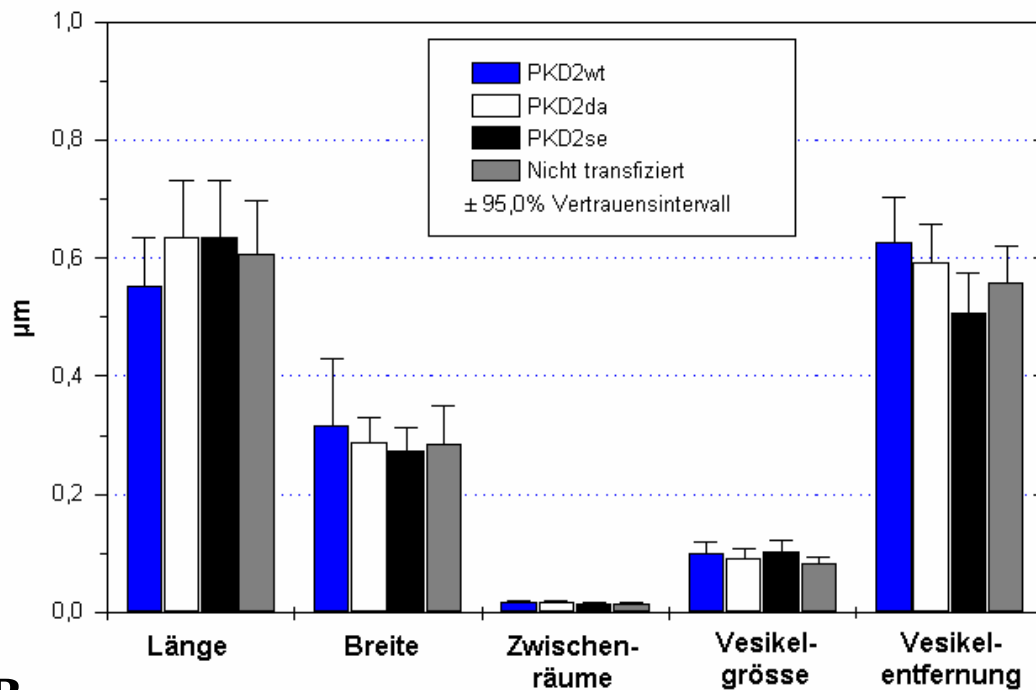
**Abb. 22:** Cy3-Immunmarkierung an einer pEGFPPKD2da exprimierenden BON-Zelle. Die TEM-Aufnahme wurde mit einer fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme überlagert. Diese Methode ermöglichte es, pEGFPPD2da Expressionsbereiche zu lokalisieren. Die Expression (EB) findet bei diesem transfizierten Zelltyp stets in der Umgebung eines Golgi-Apparates (GA) statt.

#### 4.3.3. Morphologie des Golgi-Apparates

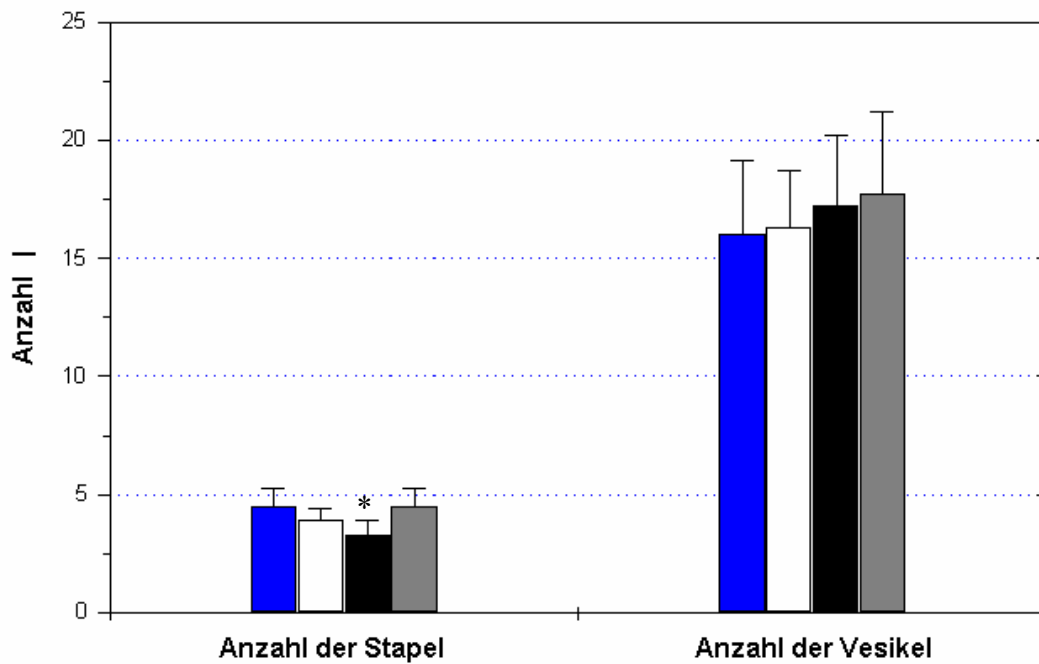
##### *4.3.3.1. Statistische Auswertung der Golgi-Apparate an Ultradünnschnitten (zweidimensionale TEM Bilder)*

Transfizierte Zellen wurden hochdruckgefroren, gefriersubstituiert und in LR-Gold eingebettet. Anschließend wurden Ultradünnschnitte der Proben angefertigt und GFP-Immunogoldmarkierungen mit dem Sekundärantikörper Anti-GFP von Rockland durchgeführt. Dadurch war eine spätere Lokalisation der transfizierten Zellen im TEM möglich. War bei den transfizierten Zellen ein Golgi-Apparat im TEM zu finden, wurde er bei einer definierten Grundfläche vermessen. Es wurden folgende Parameter untersucht: Vesikelanzahl pro Fläche, Vesikelgröße, Vesikelentfernung zum Mittelpunkt des Golgi-Apparates, Anzahl der Stapel (Zysternen), Länge und Breite des Golgi-Apparates und der Abstand zwischen den Stapeln (Zysternen). Als Kontrolle wurden Golgi-Apparate von nicht-transfizierten Zellen vermessen. Es ergaben sich hierbei meist keine signifikanten Unterschiede zwischen nicht-transfizierten Zellen und den Zellen die mit den drei pEGFPPKD2-Konstrukt-DNA-Typen transfiziert wurden. Einzig die Stapelanzahl von pEGFPPKD2se exprimierenden Zellen war signifikant verschieden zur Kontrolle und zu den pEGFPPKD2wt exprimierenden Zellen (Abb. 23; Tab. 11).

**A**



**B**



**Abb. 23: Golgimorphologie an TEM Ultradünnschnitten.** (A) Vergleich der Golgilänge und -breite, Zwischenräume der einzelnen Golgistapel, Vesikelgröße und -entfernung der pEGFPK2D2 exprimierenden Zellen und nicht transfizierten BON-Zellen. Signifikante Unterschiede waren nicht nachweisbar. (B) Vergleich der Stapel- und Vesikelanzahl. Ein signifikanter Unterschied ergab sich bei der Golgi-Stapelanzahl von pEGFPK2D2se exprimierenden Zellen und den pEGFPK2D2wt exprimierenden Zellen wie auch der Kontrolle.

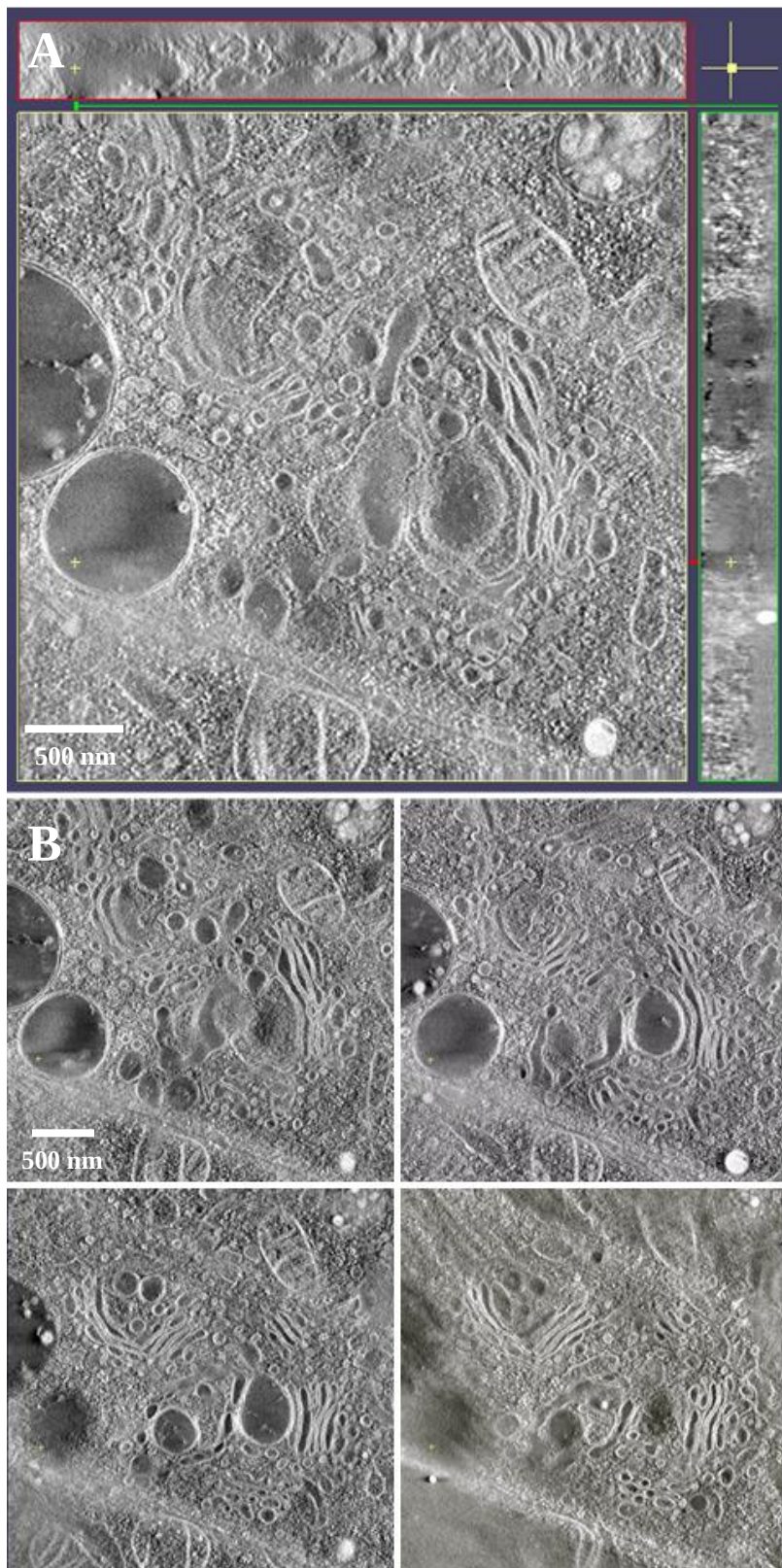
**Tab. 11:** *Ergebnis der Varianzanalyse (ANOVA), sowie des post-hoc Tests nach Tukey der ermittelten Golgiparameter von den verschiedenen pEGFPKD2 Konstrukten exprimierenden Zellen sowie den nicht-transfizierten BON-Zellen.*

| Golgiparameter    | ANOVA        |        | Tukey               |
|-------------------|--------------|--------|---------------------|
|                   | F (df)       | P      |                     |
| Länge             | 0,83 (3/75)  | ns     | ---                 |
| Breite            | 0,33 (3/74)  | ns     | ---                 |
| Zwischenräume     | 1,82 (3/151) | ns     | ---                 |
| Vesikelgröße      | 1,35 (3/454) | ns     | ---                 |
| Vesikelentfernung | 2,19 (3/455) | ns     | ---                 |
| Stapelanzahl      | 0,30 (3/75)  | ns     | ---                 |
| Vesikelanzahl     | 3,60 (3/75)  | < 0,05 | PKD2se vs PKD2wt/NT |

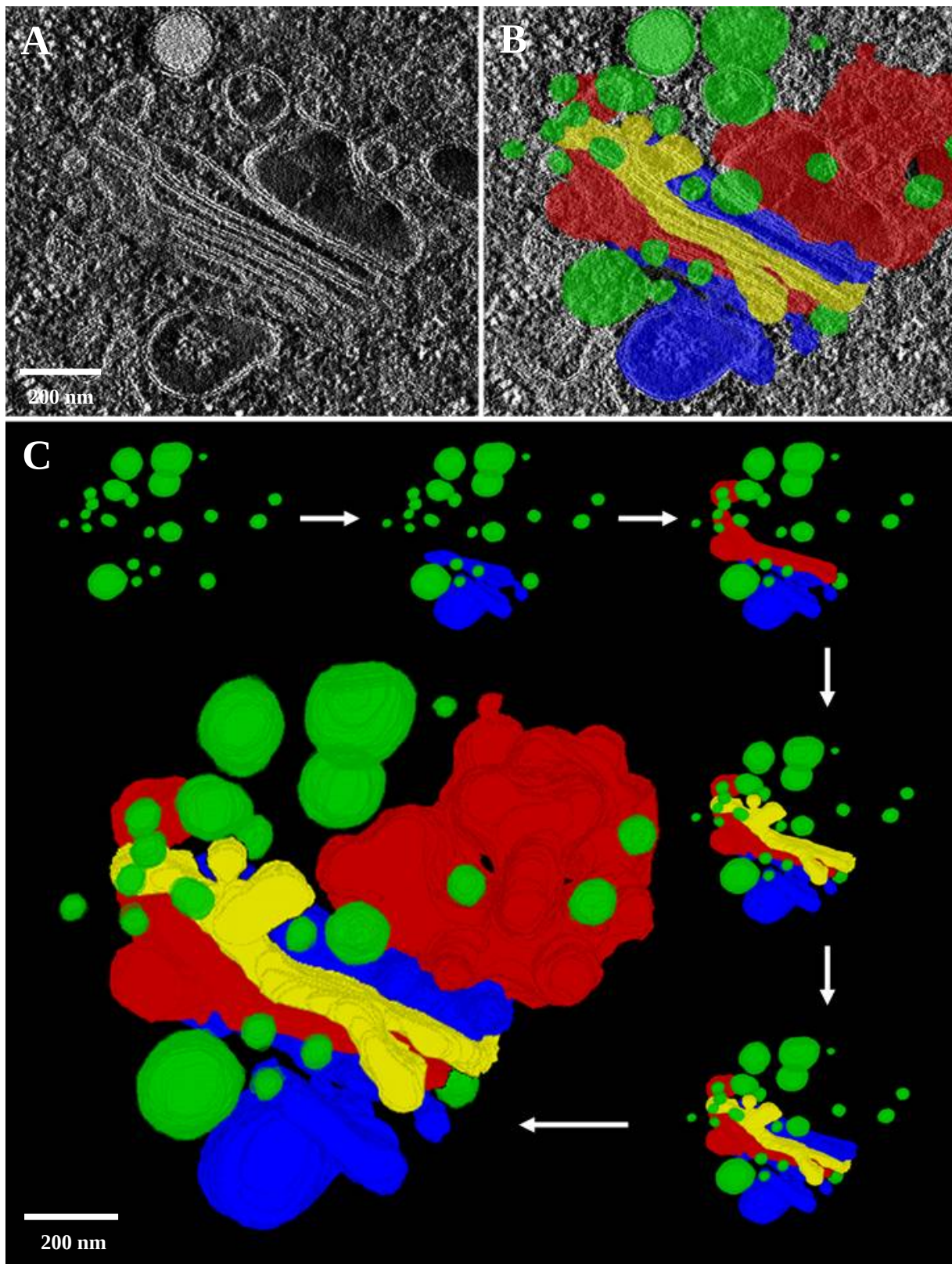
#### 4.3.4. Golgimorphologie mit Hilfe von STEM Tomographie

##### 4.3.4.1. Voruntersuchung an nicht-transfizierten BON Zellen

STEM-Tomographie wurde an nicht-transfizierten BON Zellen durchgeführt. Dabei wurden BON Zellen hochdruckkryofixiert, gefriersubstituiert und in LR-Gold und Epon eingebettet (LR-Gold wurde hinsichtlich einer späteren Immunmarkierung verwendet). Anschließend wurden 500 nm Dünnschnitte angefertigt und diese mit kolloidalen Goldpartikeln (15nm) versehen. Diese dienten später zum Alignment des Rohdatensatzes. Die Präparate, die in LR-Gold und Epon eingebettet waren, zeigten im STEM eine gute Ultrastruktur der einzelnen Zellbestandteile. Die beiden Hälften des Lipid-Bilayers waren deutlich erkennbar (Abb. 24). Die LR-Gold Schnitte zeigten jedoch eine größer Schrumpfung in z-Richtung als die Eponschnitte. Die STEM-Analyse erlaubte nun eine drei-dimensionale Rekonstruktion des Golgiapparates (Abb. 25). Es konnten mehrere Zisternen unterschieden werden, die zumindest in der analysierten Schnittebene nicht miteinander verbunden waren. Der Golgi-Stapel war jeweils von vielen abgeschnürten Vesikeln mit unterschiedlicher Größe umgeben. Aus der tomographischen Darstellung wurde eindeutig geklärt, dass diese Vesikel keine Verbindung zum Golgi-Stapel aufwiesen.



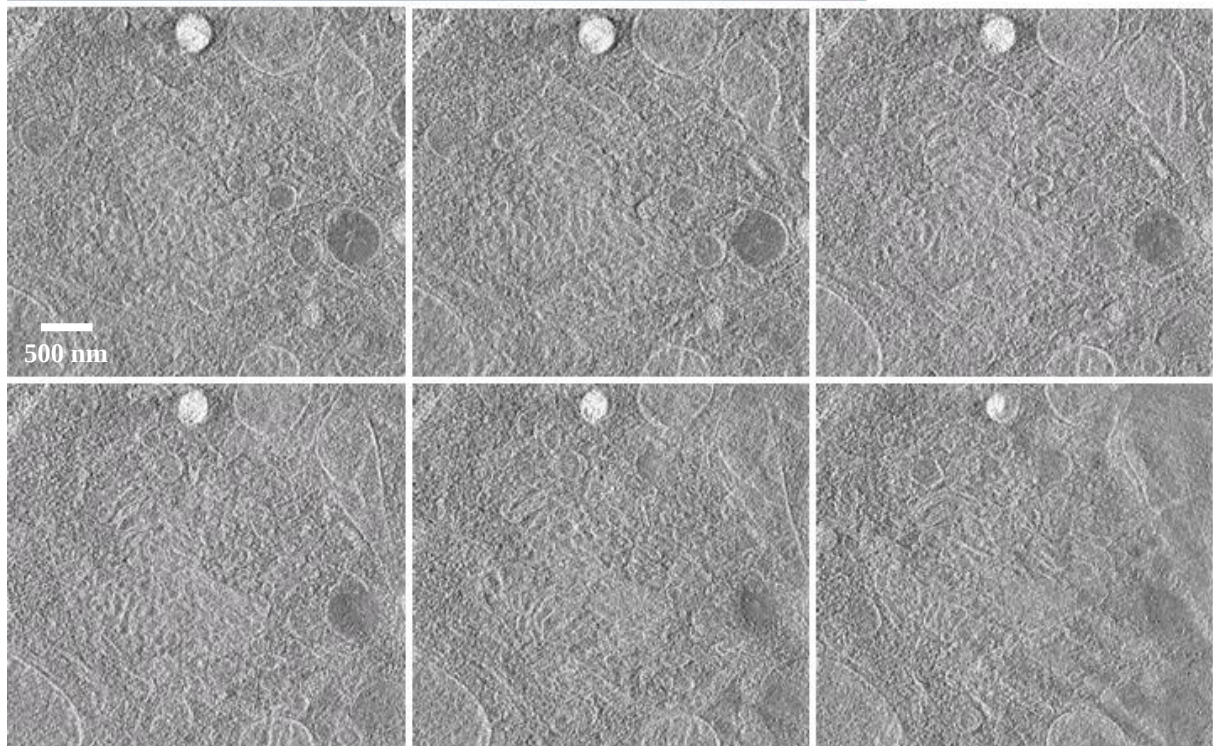
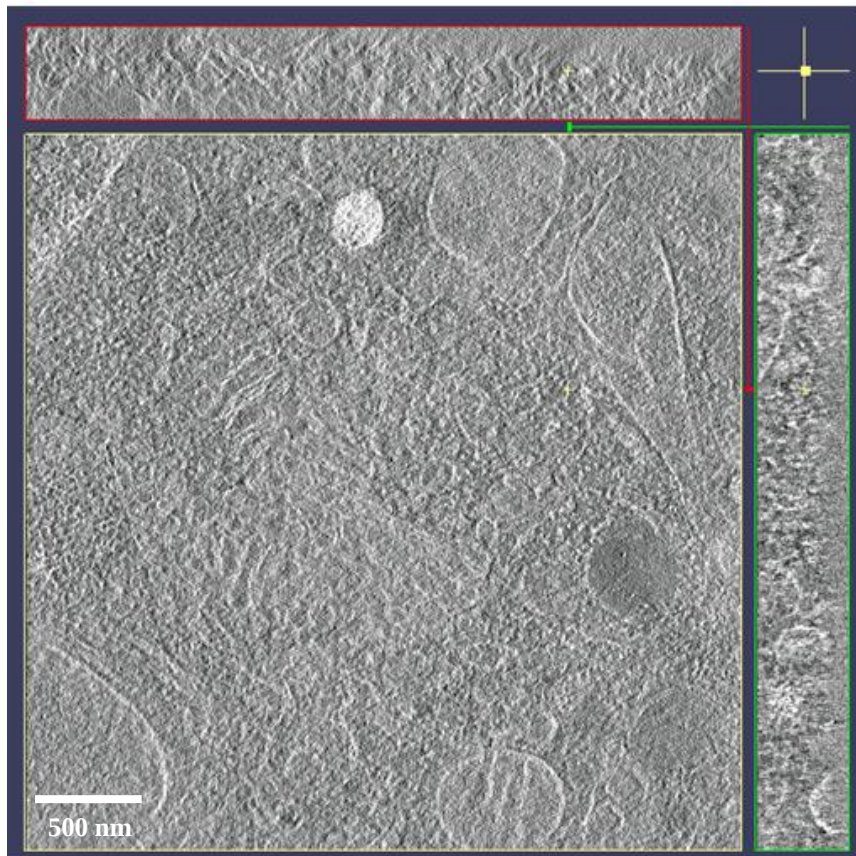
**Abb. 24:** STEM-Tomographie an einer nicht transfizierten BON Zelle. (A) Tomogramm von einem Bereich mit einem Golgi-Apparat. Schnitte durch die z-Achse werden durch die beiden Rechtecke oberhalb (rot) und rechts (grün) neben der Abbildung dargestellt. (B) Bildfolge des STEM-Tomogramms. Hierbei wurde jedes 10. Bild dargestellt um einen räumlichen Eindruck zu erhalten.



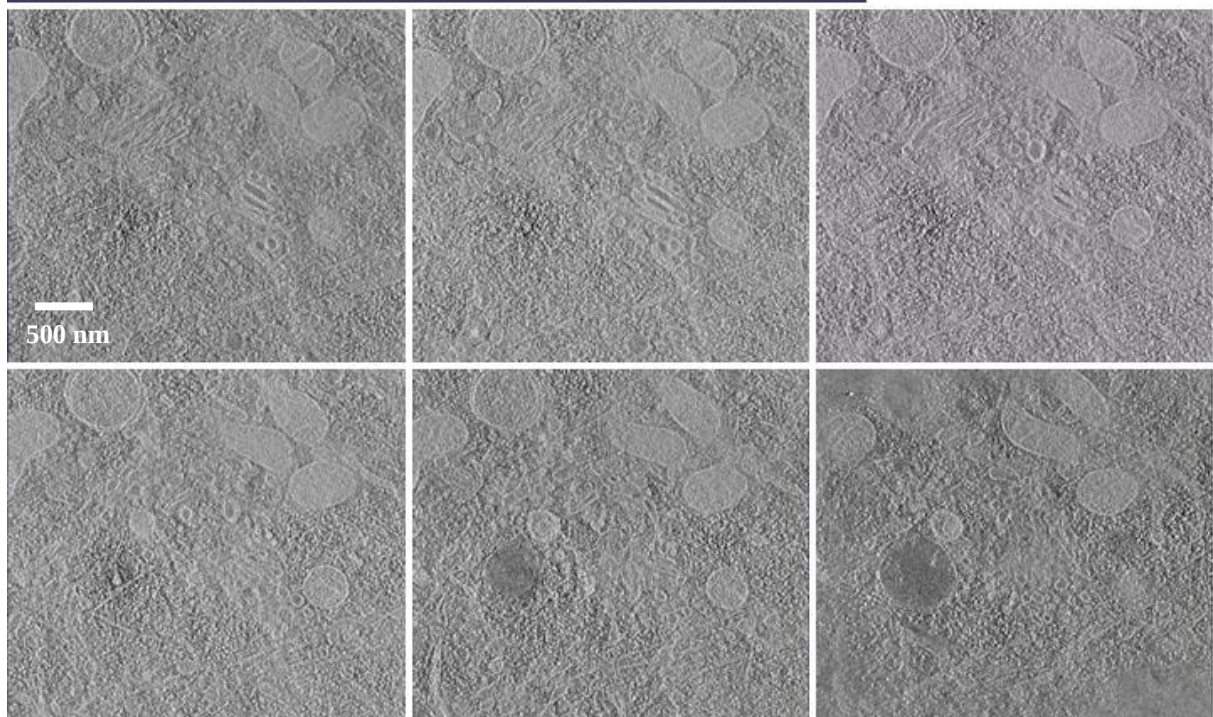
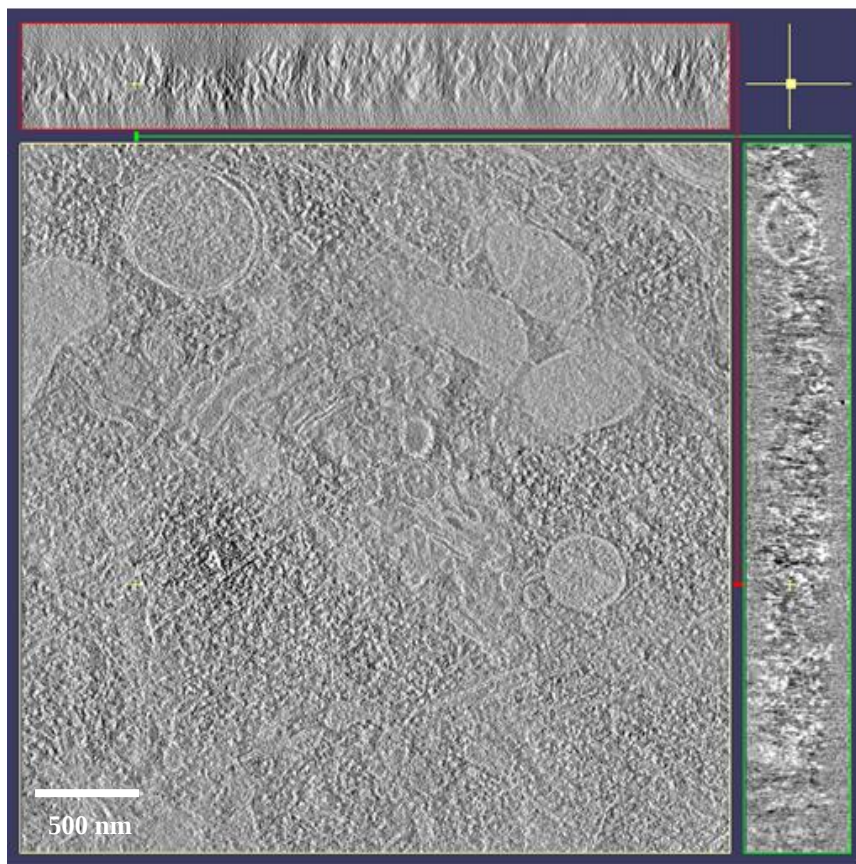
**Abb. 25: STEM-Tomographie eines Golgi-Apparates.** (A) Einzelbild aus einem STEM-Tomogramm. Die Ultrastruktur des Golgi-Apparates ist deutlich erkennbar. (B) Überlagerung des Einzelbildes mit der Rekonstruktion des Golgi-Apparates. (C) Rekonstruktion des Golgi-Apparates. Abgeschnürte Vesikel sind in grün dargestellt. Die unterschiedlichen Golgi-Zisternen sind in verschiedenen Farben dargestellt.

#### *4.3.4.2. Untersuchungen der Golgimorphologie an mit pEGFPKD2 transfizierten BON Zellen*

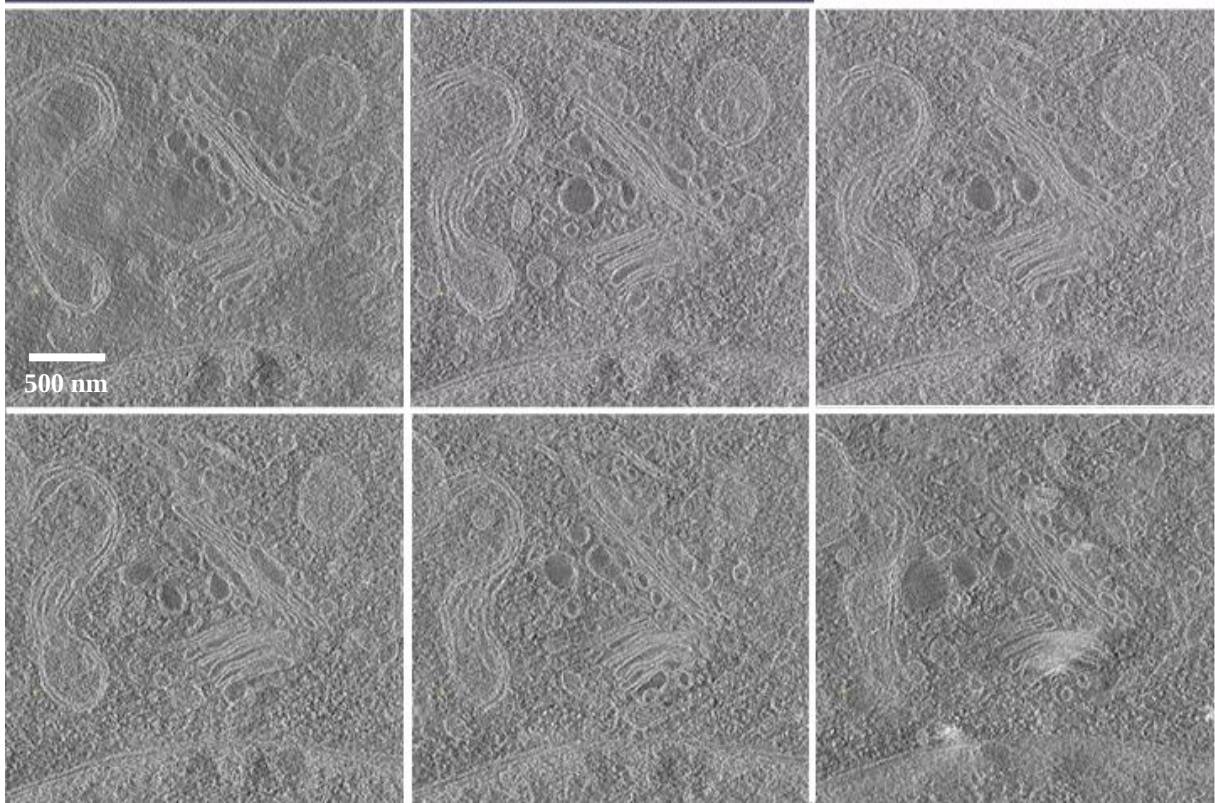
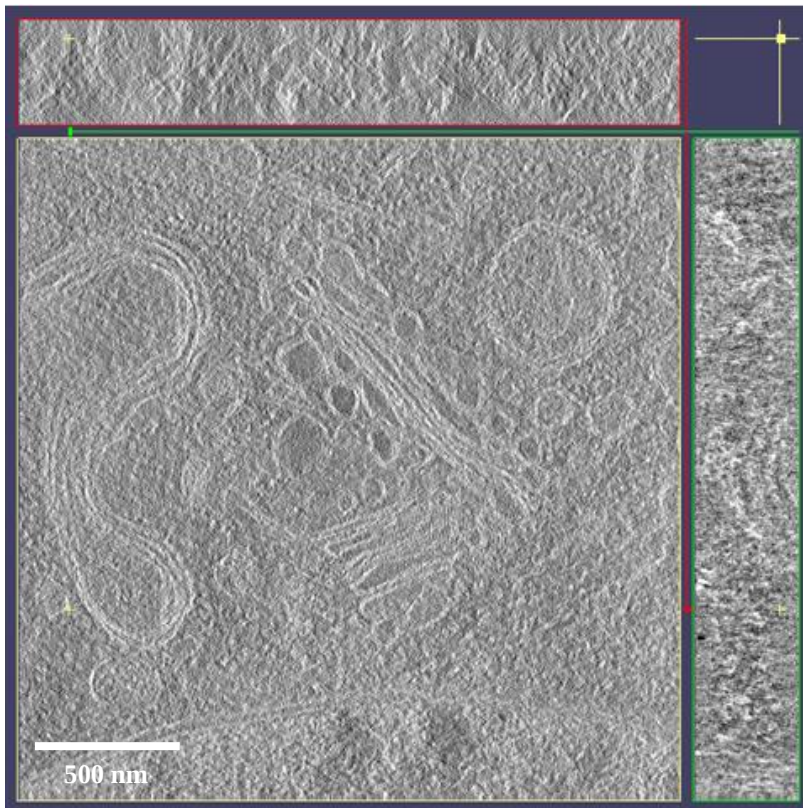
Anschließend wurde eine STEM-Tomographie an den transfizierten BON Zellen durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen hochdruckkryofixiert, gefriersubstituiert und in LR-Gold eingebettet. An den 500 nm Semidünnschnitten wurde eine Immunmarkierung durchgeführt (Primärantikörper: Anti-GFP von Rockland, Sekundärantikörper Cy3). Die darauf folgende Analyse im LM erlaubte es, die transfizierten Zellen auf dem Kupfer-Findernetzchen lokalisieren zu können. Anschließend wurden die Proben im STEM analysiert. Die Tomogramme zeigten eine deutliche Kontrastabnahme und eine verschlechterte Ultrastruktur der einzelnen Zellbestandteile durch die Immunmarkierung im Vergleich zu den nicht immunmarkierten Proben. Vor allem die Membranverläufe waren nicht mehr eindeutig zu erkennen. Deswegen war eine genaue Rekonstruktion des Golgi-Apparates nach objektiven Kriterien nicht mehr möglich. Morphologische Unterschiede zwischen den Golgi-Apparaten der drei PKD2 Expressionstypen ließen sich daher nicht eindeutig nachweisen (Abb. 26; Abb. 27; Abb. 28). Schrumpfungen in z-Richtung waren erneut zu beobachten.



**Abb. 26:** Bereich eines Golgi-Apparates bei einer pEGFPKD2wt exprimierenden Zelle. Golgistrukturen lassen sich wegen den schlecht erkennbaren Membranen nicht genau definieren.



**Abb. 27:** Bereich eines Golgi-Apparates bei einer *pEGFPPKD2da* exprimierenden Zelle. Golgistrukturen lassen sich nicht genau definieren.



**Abb. 28:** Bereich eines Golgi-Apparates bei einer pEGFPKD2se exprimierenden Zelle. Golgistrukturen lassen sich nicht genau definieren.

## 5. Diskussion

In dieser Arbeit wurden GFP und verschiedene PKD2-Konstrukte in Pankreaskarzinomzellen nachgewiesen. Dies wurde zum einen durch korrelative Fluoreszenzmikroskopie und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und zum anderen durch elektronenmikroskopische Immunogoldmarkierung erreicht. Dabei wurde eine GFP-Expression im Cytoplasma festgestellt. Das PKD2<sup>da</sup>-Konstrukt wies eine clusterförmige Lokalisation in der Nähe des Golgi-Apparates auf, während PKD2<sup>se</sup> und PKD2<sup>wt</sup> im Cytoplasma festgestellt wurden. Als optimale Präparationsmethode der Proben für das TEM stellte sich eine Kombination von Hochdruckkryofixation, Gefriersubstitution und eine Einbettung in LR-Gold und Epon heraus, was die Ergebnisse aus früheren Arbeiten bestätigte (Buser et al., 2007; Walther & Ziegler, 2002). Bei der zweidimensionalen elektronenmikroskopischen Analyse der Auswirkungen von PKD2 auf den Golgi-Apparat wurden keine signifikanten Veränderungen festgestellt. Bei einer dreidimensionalen Betrachtung der Golgistrukturen durch STEM-Tomographie stellte sich heraus, dass eine Schädigung der Ultrastruktur durch die Immunmarkierung bei den LR-Gold eingebetteten Proben auftrat und somit keine Golgi-Rekonstruktion durchgeführt werden konnte.

### 5.1. Voruntersuchungen

#### 5.1.1. Elektronenmikroskopische Voruntersuchungen

Zur Analyse zellbiologischer Prozesse werden zur Zeit vor allem licht- und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungsmethoden verwendet, da für diese Verfahren zahlreiche Fluoreszenzmarker zur Verfügung stehen. Moderne elektronenmikroskopische Analyseverfahren zeigen zwar eine optimale Auflösung aller ultrastrukturellen Zellbestandteile, jedoch sind die Markierungsmethoden noch sehr unbefriedigend. Als bekanntesten elektronenmikroskopischen Marker ist das kolloidale Gold zu nennen, welches aber nicht für alle Nachweisverfahren geeignet ist. Um die Lücke zu schließen, wurden in dieser Arbeit daher die Schwerpunkte auf eine Korrelation zwischen der Fluoreszenzmikroskopie und der Elektronenmikroskopie und auf postembedding Immunmarkierungsmethoden gelegt.

Bei dieser Untersuchung war eine gute Erhaltung der intrazellulären Feinstrukturen wichtig, da die Auswirkungen von PKD2 auf die Ultrastruktur des Golgi-Apparates untersucht und diese von Präparationsartefakten abgegrenzt werden sollten. Als geeignetste Präparationsmethode stellte sich daher eine Kombination von Hochdruckkryofixation, Gefriersubstitution und eine Einbettung in LR-Gold und Epon heraus. Für die Präparation wurden die Proben in direkter Nähe zur Hochdruckgefrieranlage gelagert und ohne Zeitverzögerung eingefroren. Der einzig limitierende Faktor war die Hochdruckgefrieranlage selbst, da diese nach einem Einfriervorgang zwei Minuten zur erneuten Betriebsbereitschaft benötigt.

#### *5.1.1.1. Einbettungsverfahren für die Immunmarkierung*

Pankreaskarzinoidzellen, die standardmäßig chemisch fixiert wurden und bei denen einzig Uranylacetat als Kontrastmittel verwendet wurde, wiesen im TEM eine schlechte Ultrastruktur auf (Abb. 11A; Abb. 11B). Bei den in Epon eingebetteten Zellen zeigte die Kernmembran wellenförmige Veränderungen und das Cristae-Membransystem war nur undeutlich erkennbar (Abb. 11A). Die Mitochondrien, der in LR-Gold eingebetteten Zellen wiesen eine wellenförmige Membranstruktur auf, während die Kernmembran nicht erkennbar war (Abb. 11B). Dieses Phänomen ist zum einen durch die langsame Fixationsgeschwindigkeit der chemischen Fixation und zum anderen durch das Fehlen von Osmium erklärbar. Dieser verhältnismäßig lange Fixationszeitraum reicht aus, um eine Schädigungen der Ultrastruktur durch osmotische Effekte zu bewirken. Insbesondere Pankreasgewebe weist bei dieser Präparationsmethode eine starke Artefaktbildung auf, da hierbei sehr schnell eine Zersetzung des Gewebes bzw. der Zellen durch die Verdauungsenzyme einsetzt. Osmiumtetroxid interagiert hingegen mit Doppelbindungen, also meist mit den Lipidstrukturen des biologischen Materials. Dies führt neben einer Kontrastierung auch zu einer gewissen Fixation und somit zu einer Stabilisation.

Um eine Verbesserung der Ultrastruktur zu erreichen und die langsame Fixationsgeschwindigkeit zu umgehen, wurden in den darauf folgenden Untersuchungen die Pankreaskulturzellen hochdruckkryofixiert. Als Kryosubstitutionslösungen wurden zum einen eine Isopropanol- und Uranylacetat-Lösung und zum anderen eine Aceton- und Uranylacetat-Lösung verwendet. Die verschiedenen Lösungsmittel wurden hinsichtlich einer Fluoreszenzerhaltung der transfizierten Pankreaskarzinomzellen verwendet. Die so behandelten Proben wurden anschließend in Epon eingebettet. (Abb. 11C; Abb. 11D; Abb.

11E). Die Proben, die mit Isopropanol als Lösungsmittel kryosubstituiert wurden, wiesen jedoch einen weitaus schlechteren Kontrast im TEM auf (Abb. 11C), als Zellen bei denen Aceton (Abb. 11D; Abb. 11E) verwendet wurde. Hieraus lässt sich schließen, dass bei Isopropanol die Bindungsfähigkeit des Uranylacetats nachlässt. Wurde für die Einbettung LR-Gold statt Epon verwendet, erhielt man die besten Resultate mit optimaler Feinstrukturhaltung mit einer Kryosubstitutionslösung, die Aceton, Wasser und Uranylacetat enthielt (Abb. 11E; Abb. 11F). Dies war zu erwarten, da das Wasser auch bei einer Aceton-, Osmium- und Uranylacetat-Lösung einen positiven Effekt bei kryosubstituierten biologischen Material aufweist (Walther & Ziegler, 2002).

#### *5.1.1.2. $\alpha$ -Amylase und Insulin-Immunogoldmarkierung*

Um die Effizienz einer Immunogoldmarkierung zu ermitteln, wurde Mauspankreasgewebe hochdruckkryofixiert und in der oben beschriebenen Substitutionslösung kryosubstituiert, in LR-Gold eingebettet und ultradünngeschnitten. An diesen Schnitten wurde anschließend eine  $\alpha$ -Amylasemarkierung durchgeführt. Es ergaben sich hierbei Markierungen im Bereich des Granulas und des ER. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da aus der Literatur bekannt war, dass Amylase in diesen Bereichen gehäuft vorhanden ist (Geuze et al. 1979; Bhoola & Dorey, 1971). Es zeigte sich jedoch auch, dass die Markierungsdichte der Goldpartikel sehr gering war (Abb. 12A). Dies lag vermutlich daran, dass die Antikörper nur an den freien Antigenen der Schnittoberfläche banden. Daraus lässt sich schließen, dass die Expressionsrate des Antigens sehr hoch sein sollte um eine deutliche Markierung zu erhalten.

Exokrine Pankreastumorzellen Typ AR42J wurden analog dem Pankreasgewebe präpariert und eingebettet. Die Amylasemarkierung zeigte die zu erwartenden Goldpartikel in den Vesikeln, jedoch mit einer weitaus geringeren Partikeldichte als im Gewebe (Abb. 12B). Dies lag vermutlich an einer geringeren Amylase-Expressionrate der Kulturzellen.

Eine Insulinmarkierung an Inselzellen und endokrinen Kulturzellen Typ BON brachte kein positives Ergebnis, vermutlich weil der getestete Antikörper nicht spezifisch am Antigen band. Daraus folgert sich, dass es bei einer Immunmarkierungen unabdingbar ist, verschiedene Antikörper diverser Anbieter zu testen.

### 5.1.2. Lichtmikroskopische Voruntersuchungen an lebenden humanen Karzinoidzellen (BON)

Wurden die BON-Zellen mit pmaxGFP-DNA und PKD2-DNA kotransfiziert, wiesen sie nach 24 h ein Fluoreszenzsignal im Zytoplasma auf (Abb. 14B). Dies war zu erwarten, da aus der Literatur bekannt ist, dass GFP im Zytoplasma exprimiert wird (Ogawa et al., 1995). Ein PKD2-Nachweis konnte mit dieser Transfektionsmethode jedoch nicht erbracht werden, da einzig das GFP-Protein sichtbar war, jedoch nicht das PKD2 selbst.

Um PKD2 direkt nachweisen zu können, wurden die Zellen mit einer pEGFPPKD2-Konstrukt-DNA transfiziert. Wie zu erwarten war, ergab sich bei dieser Untersuchung ein anderes Fluoreszenzmuster; pEGFPPKDda exprimierende Zellen wiesen clusterförmige fluoreszierende Strukturen im Cytoplasma auf (Abb. 14C), während pEGFPPKD2wt und pEGFPPKDse exprimierende Zellen ein Fluoreszenzsignal im Cytoplasma, mit zum Teil helleren Bereichen in der Nähe des Zellkerns zeigten (Abb. 14D; Abb. 14E). Diese Ergebnisse deckten sich mit unabhängigen Untersuchungen (Von Wichert et al., 2008). Ziel war es nun transfizierte Zellen im Elektronenmikroskop lokalisieren zu können.

### 5.2. Korrelative Mikroskopie an Karzinoidzellen, die mit PKD2-Konstrukt-DNA transfiziert und mit pmaxGFP-DNA cotransfiziert wurden

Für die Untersuchung wurden zuerst pmaxGFP exprimierende BON-Zellen verwendet. Diese wurden hochdruckgefroren, kryosubstituiert, in Epon bzw. LR-Gold eingebettet und ultradünngeschnitten. An den Schnitten wurde anschließend eine DAPI-DNA-Färbung durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass ein starkes Fluoreszenzsignal bei LR-Gold eingebetteten Zellkernen nachzuweisen war (Abb. 15A), wohingegen Zellen, die in Epon eingebettet waren kein Signal im Zellkern aufwiesen. Dies lag vermutlich an der dichten Struktur von Epon, bei der keine Bindung des DAPI-Farbstoffes möglich war.

Bei beiden Polymerarten ließ sich ein postembedding-GFP-Fluoreszenzsignal nach Modifikationen des Standardeinbettverfahren nachweisen. Eponproben, die konventionell bei 60° C ausgehärtet wurden, zeigten keinerlei GFP-Fluoreszenzsignal. Dies lag wahrscheinlich an der Temperaturinstabilität des GFPs. Verringerte man deshalb die Polymerisationstemperatur auf 50° C war ein schwaches postembedding-Fluoreszenzsignal nachweisbar, jedoch litt dabei die Ultrastruktur. Erfolgte eine Auspolymerisation bei 55° C, war auch ein schwaches Fluoreszenzsignal erkennbar, jedoch ergab die TEM-Analyse keine deutliche Verbesserung der Ultrastruktur (Abb. 15B). Dies lag daran, dass das Epon bei diesen Temperaturen vermutlich nicht komplett auspolymerisieren konnte. Erfolgte eine LR-

Gold Einbettung mit dem Standardpräparationsverfahren und anschließender 48 stündiger UV-Polymerisation, so bestand das Problem, dass die lange UV-Exposition die Fluoreszenz stark verringerte (Abb. 15C). Wurden die Proben jedoch 48 h an der Fensterbank auspolymerisiert, erhielt man ein starkes Fluoreszenzsignal (Abb. 15D) und eine sehr gute Stukturerhaltung. Das Verfahren erlaubte es denselben Schnitt im Fluoreszenzmikroskop und anschließend im TEM zu analysieren. Überlagerte man beide Bilder, so konnten GFP-Expressionsbereiche gezielt ermittelt werden (Abb. 16). Diese Methode erlaubte es weiter, verschiedene GFP-Antikörper hinsichtlich ihrer Spezifität zu untersuchen. Es wurden Immunogoldmarkierungen an den Schnitten durchgeführt und diese anschließend im Fluoreszenzmikroskop und TEM analysiert. Es wurde erwartet, dass Goldpartikel im Zytoplasma bei den fluoreszierenden, sprich transfizierten Zellen nachzuweisen waren. Insgesamt wurden sechs GFP Antikörper verwendet (Tab. 7), wobei vier von ihnen nicht weiter verwendet wurden, da die Zellen eine große Anzahl Goldpartikel im Zellkern aufwiesen (bei fluoreszierenden und nicht-fluoreszierenden Zellen). Bei zwei der getesteten Antikörper ließen sich bei den fluoreszierenden Zellen gehäuft Goldpartikel im Zytoplasma feststellen. Bei einer Goldpartikelauszählung und anschließender statistischen Auswertung ergaben beide Antikörper eine signifikant spezifische GFP-Bindungsaffinität, sowie eine geringe Anzahl unspezifische Bindungen im Zytoplasma und Zellkern (Abb. 17). Die Eigenschaft spezifisch an GFP zu binden war am ausgeprägtesten bei dem Antikörper der Firma Rockland zu beobachten. Im Vergleich hierzu zeigte der Antikörper von Molekular Probes eine weitaus geringere spezifische Bindungsaffinität. Dies könnte bei geringen GFP-Expressionsraten ein Problem darstellen, da hier nur eine kleine Zahl spezifische Bindungsstellen auf der Schnittoberfläche vorhanden sind und sich diese nicht mehr von den unspezifischen Bindungen unterscheiden lassen. Für weitere Untersuchungen wurde deshalb der Antikörper der Firma Rockland verwendet.

### 5.3. Untersuchungen an Karzinoidzellen die mit pEGFP getaggtter PKD2-Konstrukt-DNA transfiziert wurden

Bei dieser Untersuchung war eine Kombination von Fluoreszenzmikroskopie und Elektronenmikroskopie nicht mehr möglich, da ein Fluoreszenzsignal nach dem Einbetten in Epon und LR-Gold nicht mehr nachzuweisen war. Es wurden daher noch mehr Modifikationen des Einbettungsverfahrens durchgeführt jedoch mit keinem positiven Ergebnis. Das fehlende Signal könnte verschiedene Ursachen haben. Zum einen enthielt das getaggte

Konstrukt einen anderen GFP-Typ, nämlich das pEGFP. Es könnte sein, dass dieser empfindlicher auf die Präparationen reagierte, d.h. empfindlicher gegenüber der UV-Polymerisation des LR-Gold, der Wärmepolymerisation von Epon oder den Lösungsmitteln der Gefriersubstitution. Ein weiterer Grund könnte auch die geringe Expressionsrate des pEGFPPKD2 sein. Dies würde bedeuten, dass das Fluoreszenzsignal zu gering für unser Fluoreszenzmikroskop war oder die Schnitte nicht die Expressionsbereiche enthielten.

### 5.3.1. Immunmarkierung

Da der Nachweis von GFP mithilfe der korrelativen Mikroskopie bei dieser Untersuchung nicht möglich war, wurden Immunmarkierungen mit dem zuvor als positiv ermittelten GFP Antikörper der Firma Rockland durchgeführt (s.o.). Hierbei zeigten pEGFPPKD2wt und pEGFPPKD2se transfizierte Zellen Goldpartikel im Cytoplasma (Abb. 19A; Abb. 19B), während pEGFPPKD2da eine clusterförmige Expression aufwies (Abb. 20). Ultrastrukturell ließen sich im Bereich dieser Cluster nicht näher bestimmbare Zellstrukturen feststellen. Das kolloidale Gold schien um diese Bereiche gestreut zu sein. Dies könnte von einer Verteilung des Antigens während der Präparation herrühren. Als Kontrolle wurde eine PKD2 Immunmarkierung mit dem Antikörper der Firma Orbigen durchgeführt. Diese Markierung zeigte die gleichen Ergebnisse wie die zuvor gemachte GFP-Markierung (Abb. 21). Diese Ergebnisse deckten sich mit den Fluoreszenzuntersuchungen an den lebenden Zellen.

Um diese clusterförmige Bereiche und deren Umfeld genauer lokalisieren zu können, wurde an den Ultradünnschnitten eine erneute GFP-Markierung durchgeführt, wobei jedoch ein Cy3 Fluoreszenzsekundärantikörper verwendet wurde. Bei den pEGFPPKD2wt und pEGFPPKD2se exprimierenden Zellen ergab sich ein Fluoreszenzsignal im Cytoplasma, während sich bei den pEGFPPKD2da exprimierenden Zellen sich fluoreszierende Bereiche nachweisen ließen (Abb. 22). Analyierte man anschließend den selben Schnitt im TEM, so waren diese Cluster stets in der Nähe eines Golgi-Apparates vorhanden. Es konnte somit angenommen werden, dass PKD2 Auswirkungen auf die Golgimorphologie bzw. der Sekretion haben könnte, da präpartiv bedingte Verwischungen des Antigens nicht auszuschließen waren.

### 5.3.2. Zweidimensionale Charakterisierung des Golgi-Apparates

Um morphologische Veränderungen des Golgi-Apparates genauer beschreiben zu können, wurden bei den mit den PKD2-Konstrukten transfizierten Zellen und als Kontrolle den nicht transfizierten Zellen verschiedene Golgi-Parameter statistisch ausgewertet. Es zeigten sich meist keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Parametern wie der Golgilänge, Golgbreite, Stapelzwischenräume, Vesikelanzahl, Vesikelgröße und Vesikelentfernung. Einzig bei der Stapelanzahl von PKD2<sup>se</sup>, PKD2<sup>wt</sup> und der Kontrolle ergab sich ein leicht signifikanter Unterschied (Abb. 23). Da jedoch bei den Ultradünnschnitten nur ein Teil des komplexen Golgi-Systems nachzuweisen war, konnte dieses Ergebnis als nicht aussagekräftig gewertet werden. Als großes Problem stellte sich die zweidimensionale Darstellung dar. Es zeigte sich, dass die konventionelle TEM Analyse der Ultradünnschnitte für eine genaue Untersuchung eines komplexen Systems wie des Golgi-Apparates nicht ausreicht.

### 5.3.3. Dreidimensionale Charakterisierung des Golgi-Apparates mit Hilfe von STEM-Tomographie

Als Voruntersuchung und als Kontrolle wurde eine STEM-Tomographie an nicht transfizierten Zellen vorgenommen. Die Zellen wurden hochdruckgefroren, mit Aceton und Uranylacetat kryosubstituiert, in LR-Gold eingebettet und dünn geschnitten (500 nm). Es stellte sich heraus, dass bei dieser Präparationsmethode eine Golgi-Rekonstruktion ohne weiteres möglich war (Abb. 25). Erfolgte jedoch eine Immunmarkierung um die transfizierten Zellen im STEM lokalisieren zu können, so ergab sich, dass die ultrastrukturelle Qualität der Zellen stark nachließ. Es war deshalb nicht mehr möglich eine Golgi-Rekonstruktion durchzuführen (Abb. 26; Abb. 27; Abb. 28). Dies lag vermutlich an den langen Expositionszeiten der Antikörper und den Waschschritten. Das wässrige Milieu löste wahrscheinlich das LR-Gold an und verschlechterte somit die zelluläre Feinstruktur. Außerdem war ein starker Kontrastverlust zu beobachten. Dies deutete darauf hin, dass das Uranylacetat, wenigstens zum Teil aus der Probe herausgelöst wurde. Um diesen Effekte so gering wie möglich zu halten, wurden die Expositionszeiten der Antikörper auf ein Minimum reduziert. Hierbei wurden jedoch keine besseren Resultate erzielt.

## 6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden GFP und PKD2-Konstrukttypen (PKD2wt, PKD2da und PKD2se) in humanen Karzinoidzellen (BON) und exokrinen Ratten-Pankreaskarzinomzellen (AR42J) elektronenmikroskopisch nachgewiesen. Dies wurde zum einen durch korrelative Fluoreszenzmikroskopie und Transmissions-Elektronenmikroskopie und zum anderen durch elektronenmikroskopische Immunmarkierung mit kolloidalem Gold erreicht.

Die Transfektion der lebenden Kulturzellen erfolgte mittels einem AMAXA Nucleofektor bzw. mit der Transfektionslösung Nanofektin. Beide Verfahren ergaben Transfektionsraten von 60 % bis 80 %. Wie zu erwarten, zeigte die fluoreszenzmikroskopische Analyse der nur mit GFP-transfizierten lebenden Zellen eine GFP-Expression im Zytoplasma. Mit pEGFP getaggte PKD2se- und PKD2wt-transfizierte lebende Zellen wiesen ein ähnliches PKD2-Expressionsmuster im Zytoplasma auf, wie die nur mit GFP-transfizierten Zellen. PKD2da zeigte jedoch eine clusterförmige Expression in Zellkernnähe.

Für die Elektronenmikroskopie erwies sich eine Kombination von Hochdruckkryofixation, Kryosubstitution (Substitutionslösung aus Aceton, Uranylacetat und Wasser) und die Einbettung in LR-Gold (Polymerisation bei Tageslicht) als optimales Präparationsverfahren, da hierbei an den Proben Immunmarkierungen durchgeführt werden konnten und die Ultrastruktur sehr gut erhalten war.

Im ersten Teil der Untersuchung wurden pmaxGFP exprimierende Zellen elektronenmikroskopisch untersucht. Die in LR-Gold eingebetteten Proben zeigten dabei ein deutliches GFP-Fluoreszenzsignal. Dies erlaubte es, denselben Ultradünnschnitt im Fluoreszenzmikroskop und anschließend im TEM korrelativ zu analysieren. Überlagerte man die beiden Bilder, konnten die GFP-Expressionsbereiche gezielt ermittelt werden. Es zeigte sich dabei eine GFP-Expression im Zytoplasma, wobei Zellorganellen wie Mitochondrien keine Expression aufwiesen. Dieses Verfahren erlaubte es weiter, verschiedene GFP-Antikörper bezüglich ihrer Spezifität zu untersuchen. Dazu wurden Immunmarkierungen mit sechs verschiedenen Anti-GFP-Antikörpern und kolloidalem Gold an den Schnitten durchgeführt und diese anschließend im Fluoreszenz- und im Transmissionselektronenmikroskop analysiert. Es wurde erwartet, dass Goldpartikel im Zytoplasma bei den fluoreszierenden, sprich transfizierten, Zellen nachzuweisen waren. Von

den sechs getesteten Anti-GFP-Antikörpern zeigten einzig die Antikörper der Firmen Molecular Probes und Rockland spezifische Markierungen. Im statistischen Vergleich zeigte der Antikörper von Rockland die ausgeprägteste spezifische Bindungsaffinität und wurde deshalb für weitere Untersuchungen verwendet.

Im zweiten Teil der Untersuchung wurden PKD2 (mit pEGFP getaggt) exprimierende Zellen elektronenmikroskopisch präpariert. Es zeigte sich dabei, dass hier eine korrelative Fluoreszenzmikroskopie und Transmissionselektronenmikroskopie nicht mehr möglich war, da nach dem Einbetten kein Fluoreszenzsignal nachzuweisen war. Es wurden daher Immunmarkierungen mit dem Anti-GFP-Antikörper der Firma Rockland und als weitere Kontrolle Markierungen mit dem Anti-PKD2-Antikörper der Firma Orbigen durchgeführt. PKD2wt und PKD2se exprimierende Zellen zeigten dabei Markierungen im Zytoplasma ohne genaue Lokalisation. PKD2da exprimierende Zellen wiesen clusterförmige Partikelanhäufungen an nicht genau definierten Strukturen in der Nähe des Golgi-Apparates auf. Ein nicht zu lösendes technisches Problem war, dass eine Schädigung der Ultrastruktur durch die Immunmarkierung bei den LR-Gold eingebetteten Proben auftrat.

Um Auswirkungen der PKD2-Konstrukte auf die Morphologie des Golgi-Apparates aufzuzeigen, wurden verschiedene strukturelle Parameter wie Breite des Golgi-Apparates, Länge der Zisternen, Zisternenanzahl, Vesikelanzahl, Entfernung der Vesikel vom Zentrum und Zwischenräume zwischen den Zisternen an zweidimensionalen TEM-Abbildungen gemessen und statistisch ausgewertet. Es zeigten sich dabei keine signifikanten Unterschiede zwischen den Golgi-Apparaten der PKD2 transfizierten und den nicht-transfizierten Zellen.

Mittels STEM-Tomographie konnte die Struktur des Golgi-Apparates dreidimensional rekonstruiert werden. Eine Kombination mit Immunmarkierung war allerdings wegen den oben erwähnten Strukturverschlechterungen schwierig. Es wäre daher von Vorteil, diesen Präparationsschritt zu umgehen. Dies könnte durch eine Zelllinie erreicht werden, bei der alle Zellen PKD2 exprimieren.

## 7. Ausblick

In dieser Arbeit wurden Methoden entwickelt und modifiziert um PKD2 und GFP elektronenmikroskopisch in Karzinoidzellen nachweisen zu können. Außerdem wurde die Golgi-Morphologie verschiedener transfizierter Zelltypen analysiert und verglichen.

Ein Schwerpunkt stellte die korrelative Fluoreszenz- und Transmissionselektronenmikroskopie dar. Dabei gelang es pmaxGFP exprimierende Pankreaskarzinomzellen nach Hochdruckkryofixation und Einbettung fluoreszenzmikroskopisch nachzuweisen. Es konnten Fluoreszenzsignale direkt am Ultradünnschnitt gezeigt werden und dieser dann im TEM analysiert werden. Jedoch konnte PKD2 das mit pEGFP getaggt war, durch korrelative Mikroskopie nicht direkt nachgewiesen werden, da nach Hochdruckkryofixation, Einbettung und Dünnschneiden kein Fluoreszenzsignal mehr erkennbar war. Möglicherweise war das pEGFP bei der Präparation empfindlicher als das pmaxGFP oder die Expressionsrate war zu gering. Es wäre interessant, Pankreaskarzinomzellen nur mit pEGFP-DNA zu transfizieren und dann analog den pmaxGFP exprimierenden Zellen zu präparieren, um zu testen, ob die Fluoreszenz von pEGFP nach der Präparation erhalten bleibt.

Allgemein ist festzuhalten, dass für die Lichtmikroskopie sehr viele Fluoreszenzmarker zur Verfügung stehen, die mit der in dieser Promotionsarbeit vorgestellten Methode für die Elektronenmikroskopie korrelativ genutzt werden könnten. Dazu müsste natürlich jeweils getestet werden, ob die Fluoreszenz der Farbstoffe nach der Präparation erhalten bleibt.

Beim immun-elektronenmikroskopischen Nachweis von GFP stellte sich der Antikörper der Firma Rockland als am besten geeignet heraus. Möglicherweise ist dieser Antikörper standardmäßig für den elektronenmikroskopischen Nachweis von GFP einsetzbar. Dies müsste aber in weiteren Versuchen in anderen Proteinen und Zelllinien getestet werden.

STEM-Tomographie eignete sich hervorragend zur dreidimensionalen Darstellung des Golgi-Apparates präpariert durch Hochdruckkryofixation und Gefriersubstitution. Wenn PKD2-transfizierte Zellen durch Immunmarkierung identifiziert werden mussten, traten Probleme auf, weil die Ultrastruktur durch die einzelnen Inkubations- und Waschschriffe verschlechtert

wurde. Es wäre daher von Vorteil, diesen Präparationsschritt zu umgehen. Dies könnte durch eine Zelllinie erreicht werden, bei der alle Zellen PKD2 exprimieren.

## 8. Referenzen

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: *Molekularbiologie der Zelle*. Wiley-VCH (2003)
- Auer A: *Charakterisierung der regulatorischen Domäne der Proteinkinase D2*. Dissertation Universität Ulm (2006)
- Auer A, Blume J, Sturany S, Wichert G, Van Lint J, Vandenheede J, Adler G, Seufferlein T: *Role of the Regulatory Domain of Protein Kinase D2 in Phorbol Ester Binding, Catalytic Activity, and Nucleocytoplasmic Shuttling*. Mol. Biol. Cell. 16: 4375-4385 (2005)
- Baron CL, Malhorta V: *Role of Diacylglycerol in PKD recruitment to the TGN and protein transport to the plasma membrane*. Science. 295:325-328 (2002)
- Bhoola BKD, Dorey G: *The intracellular localisation of Kallikrein, Trypsin and Amylase in Dog Pancreas*. J. Physiol. 214: 553-570 (1971)
- Buser C, Walther P, Mertens T, Michel D: *Cytomegalovirus Primary Envelopment Occurs at Large Infoldings of the Inner Nuclear Membrane*. J. Virol. 81: 3042-3048 (2007)
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC: *Green-fluorescent protein as a marker for gene expression*. Science 263: 802-805 (1994)
- Cody CW, Prasher DC, Westler WM, Prendergast FG, Ward WW: *Chemical structure of the hexapeptide chromophore of Aequorea green-fluorescent protein*. Biochemistry 32: 1212-1218 (1993)
- Colliex C, Kohl H: *Elektronenmikroskopie: Eine anwendungsbezogene Einführung*. Wissenschtl. Verlagsgesellschaft (2008)
- Cormack BP, Valdivia R, Falkow S: *FACS-optimized mutants of the green-fluorescent protein (GFP)*. Gene 173: 33-38 (1996)
- Dubochet J, Sartori Blanc N: *The cell in absence of aggregation artifacts*. Micron. 32:91-92, 99 (2001)
- Eiseler T: *Role of Protein Kinase D in migration, invasion and cell adhesion of pancreatic ductal adenocarcinoma cells*. Dissertation Universität Stuttgart (2006)
- Edenfeld T: *Charakterisierung der Funktion der Proteinkinase D2 als Regulator der Chromogranin A-Sekretion in humanen BON neuronendokrinen Tumorzellen*. Dissertation Universität Ulm (2008)

- Endo K, Oki E, Biedermann V, Kojima H, Yoshida K, Johannes FJ, Kufe D, Datta R: *Proteolytic cleavage and activation of protein kinase C [micro] by caspase-3 in the apoptotic response of cells to 1-beta -D-arabinofuranosylcytosine and other genotoxic agents.* J. Biol. Chem. 275(24):18476-18481 (2000)
- FEI Company: *Titan 80-300 Expanding the Bondaries and Achieving New Result.* FEI Company (2005)
- Geuze JJ, Slot JW, Tokuyasu KT, Goedemans WEM, Griffith JM: *Immunocytochemical localisation of Amylase and Chymotrypsinogen in exocrine pancreatic cell with spezial attention to the Golgi Complex.* J. Cell Biol. 82: 697-707 (1979)
- Gilkerson RW, Selker JML, Capaldi RC: *The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation.* FEBS Lett. 546: 355-358 (2003)
- Hayashi A, Seki N, Hattori A, Kozuma S, Saito T: *PKC $\nu$ , a novel member of the protein kinase C family, composes a fourth subfamily with PKC $\mu$ .* Biochem. Biophys. Acta. 1450: 99-106 (1999)
- Hell SW: *Neues Gesetz zur Auflösung in der Lichtmikroskopie ermöglicht Bilder in bisher unbekannter Schärfe.* Tätigkeitsbericht 2005 Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen (2005)
- Heim R, Cubitt AB, Tsien RY: *Improved green fluorescence.* Nature 373: 663-664 (1995)
- Hohenberg H, Mannweiler K, Müller M: *High-pressure freezing of cell suspensions in cellulose capillary tubes.* J. Microsc. 175: 34-43 (1994)
- Hunter T, Plowman GD: *The protein kinases of budding yeast: Six score and more.* Trends Biochem. Sci. 22: 18-21 (1997)
- Inouye S, Tsuji FI: *Aequorea green fluorescent protein: Expression of the gene and fluorescent characteristics of the recombinant protein.* FEBS Lett. 341: 277-280 (1994)
- Jamora C, Yamanouye N, Van Lint J, Laudenslager J, Vandenheede JR, Faulkner DJ, Malhotra V: *G $\beta$ -mediated regulation of Golgi organization is through the direct activation of protein kinase D.* Cell. 98: 59-68 (1999)
- Johannes FJ, Prestle J, Eis S, Oberhagemann P, Pfizenmaier K: *PKC $\mu$  is a novel, atypical member of the protein kinase C family.* J. Biol. Chem. 269 (8): 6140-6148 (1994)
- Kandela IK, Bleher R and Albrecht RM: *Correlative Immunolabeling on Etched Epon Samples* Microsc. Microanal. 11 (Suppl 2): 1098-1099 (2005)
- Kaneko Y, Walther P: *Comparison of Ultrastructure of Germinating Pea Leaves Prepared by High-Pressure-freezing, freeze substitution and conventional chemical fixation.* J. Electron Microsc. 44: 104-109 (1995)
- Krebs E, Beavo J: *Phosphorylation-Dephosphorylation of Enzymes.* Ann. Rev. Biochem. 48: 923-959 (1979)

- Kwade A, Kampen I: *Mikroskopie und Partikelmessung im Mikro- und Nanometerbereich*. Vorlesungsskript Institut für Partikeltechnik TU Braunschweig (2008)
- Lange RH, Blödorn J: *Das Elektronenmikroskop TEM + REM*. Thieme (1981)
- Liljedahl M, Maeda Y, Colanzi A, Ayala I, Van Lint J, Malhotra V: *Protein Kinase D Regulates the Fission of Cell Surface Destined Transport Carriers from the Trans-Golgi Network*. Cell 104 /3: 409 – 420 (2001)
- Lindberg RA, Quinn AM, Hunter T: *Dual-specificity protein kinases: Will Any Hydroxyl do?* Trends Biochem. Sci. 17/3: 114-119 (1992)
- Maeda Y, Beznoussenko GV, Van Lint J, Mironov AA, Malhotra V: *Recruitment of protein kinase D to the trans Golgi network via the first cysteine-rich domain*. Embo J. 20(21): 5982-5990 (2001)
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S: *The protein kinase complement of the human genome*. Science 298: 1912-1916 (2002)
- Matthews SA, Iglesias T, Rozengurt E, Cantrell D: *Spatial and temporal regulation of protein kinase D (PKD)*. EMBO J. 19(12): 2935-45 (2000)
- Melnikova I, Golden J: *Targeting protein kinases*. Nat. Rev. Drug Discov. 3: 993-994 (2004)
- Moor H, Bellin G, Sandri C, Akert K: *The influence of high pressure freezing on mammalian nerve tissue*. Cell Tissue Res. 209: 201-216 (1980)
- Moor H, Riehle U: *Snap-freezing under high pressure: a new fixation technique for freeze-etching*. Proc. 4th European Reg. Conf. Elect. Microsc. 2: 33-34 (1968)
- Moore ED, Ring M, Scriven DR, Smith VC, Meloche RM, Buchan AM. *The role of protein kinase C isozymes in bombesin-stimulated gastrin release from human antral gastrin cells*. J. Biol. Chem. 274 (32): 22493-501 (1999)
- Mullin KA, Foth BJ, Ilgoutz SC, Callaghan JM, Zawadzki JL, McFadden GI, McConville MJ: *Regulated Degradation of an Endoplasmic Reticulum Membrane Protein in a Tubular Lysosome in Leishmania mexicana*. Mol. Biol. Cell 12: 2364–2377 (2001)
- Müller J: *Kryo-Rasterkraftmikroskopie an biologischen Systemen*. Dissertation Universität Hamburg (2000)
- Newton AC, Johnson JE. *Protein kinase C: A paradigm for regulation of protein function by two membrane-targeting modules*. Biochim. Biophys. Acta. 1376: 155-172 (1998)
- Oancea E, Bezzerides VJ, Greka, Clapham DE. *Mechanism of persistent protein kinase D1 translocation and activation*. Devel. cell. 4(4): 561-574 (2003)
- Ogawa H, Inouye S, Tsuji FI, Yasuda K, Umesono K: *Localisation, trafficking, and temperature-dependence of the Aequorea green fluorescent protein in cultured vertebrate cells*. Proc. Natl. Acad. Sci 92: 11899-11903 (1995)

- Plattner H, Zingsheim HP: *Elektronenmikroskopische Methodik in der Zell- und Molekularbiologie*. Gustav Fischer (1987)
- Posthuma G, Slot JW, Veenendaal T, Geuze HJ: *Immunogold determination of amylase concentrations in pancreatic subcellular compartments*. J. Cell. Biol. 46(2): 327-335 (1988)
- Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ: *Primary structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein*. Gene 111: 229-233 (1992)
- Prestle J, Pfizenmaier K, Brenner J, Johannes FJ. Protein kinase C  $\mu$  is located at the Golgi compartment. J. Cell Biol. 134(6): 1401-10 (1996)
- Reaves B, Banting G: *Perturbation of the morphology of the transgolgi- network following Brefeldin A treatment: redistribution of a TGN-specific integral membrane proteins, TGN38*. J. Cell Biol. 116: 85-94 (1992)
- Rey O, Zhukova E, Sinnott-Smith J, Rozengurt E: *Vasopressin-induced intracellular redistribution of protein kinase D in intestinal epithelial cells*. J. Cell. Physiol. 196: 483-492 (2003)
- Rey O, Reeve JR, Zhukova, Sinnott-Smith J, Rozengurt E. *G protein-coupled receptor-mediated phosphorylation of the activation loop of protein kinase D*. J. Biol. Chem. 279(33): 34361-72 (2004)
- Robinson DR, Wu Y, Lin S. *The protein tyrosine kinase family of the human genome*. Oncogene 19: 5548-5557 (2000)
- Röcken C, Roessner A: *An Evaluation of Antigen Retrieval Procedures for Immunoelectron Microscopic Classification of Amyloid Deposits*. J. Histochem. Cytochem 47(11): 1385–1394 (1999)
- Roos N, Morgan JA: *Cryopreparation of Thin Biological Specimens for Electron Microscopy: Methods and Applications*. Oxford Science Publications J. R. Microsc. Soc. (1990)
- Ryck A, De Kimpe L, Mikhalap S, Vantus T, Seufferlein T, Vandenheede J. R., Van Lint J: *Protein kinase D: a family affair*. FEBS Lett. 546: 81-86 (2003)
- Scheffler A: *Elektronenmikroskopische Analyse von murinem Pankreasgewebe: Unterschiede in der zellulären Ultrastruktur in Abhängigkeit von der Methode der Fixation*. Diplomarbeit Universität Ulm (2007)
- Schwarz H, Humbel BM: *Correlative Light and Electron Microscopy Using Immunolabeled Resin Sections*. Methods Mol. Biol. 369: 229-256 (2007)
- Shimomura O, Hohnson FH, Saiga Y: *Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, Aequorea*. J. Cell Comp. Physiol. 59: 223-227 (1962)

- Shimoni E, Müller M: *On Optimizing high-pressure freezing: from heat transfer theory to a new microbiopsy device*. J. Microsc. 192(3): 236-247 (1998)
- Steinbrecht RA, Müller M: *Freeze substitution and freeze drying*. In Steinbrecht R. A., Zierold K(eds): *Cryotechniques in Biological Electron Microscopy*. Springer Verlag: 149-172 (1987)
- Studer D, Michel M, Müller M: *High pressure freezing comes of age*. Scanning Microsc. Suppl. 3: 253-268, discuss. 268-269 (1989)
- Studer D, Michel M, Wohlwendt M, Hunziker EB, Buschmann MD: *Vitrification of articular cartilage by high-pressure freezing*. J. Microsc. 179: 321-332 (1995)
- Sturany S, Van Lint J, Muller F, Wilda M, Hameister H, Hocker M, Brey A, Gern U, Vandenheede J, Gress T, Adler G, Seufferlein T: *Molecular cloning and characterization of the human protein kinase D2*. J. Biol. Chem. 276: 3310-3318 (2001)
- Sturany S, Van Lint J, Gilchrist A, Vandenheede JR, Adler G, Seufferlein T: *Mechanism of activation of protein kinase D2 (PKD2) by the CCK<sub>B</sub>/gastrin receptor*. J. Biol. Chem. 277: 29431-29436 (2002)
- Szczesny PJ, Walther P, Müller M: *Light damage in rod outer segments: the effects of fixation on ultrastructural alterations*. Curr. Eye Res. 15: 807-814 (1996)
- Tooze SA, Flatmark T, Tooze J, Huttner WB: *Characterization of the immature secretory granule, an intermediate in granule biogenesis*. J. Cell Biol. 115: 1491-1503 (1991)
- Traub LM, Kornfeld S: *The trans-golgi-network: a late secretory sorting station*. Curr. Opin. Cell Biol. 103: 839-850 (1997)
- Valverde AM, Sinnott-Smith J, Van Lint J, Rozengurt E: *Molecular cloning and characterization of protein kinase D: a target for diacylglycerol and phorbol esters with a distinctive catalytic domain*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91: 8572-8576 (1994)
- Van Lint J, Rykx A, Maeda Y, Vantus T, Sturany S, Malhotra V, Vandenheede JR, Seufferlein T: *Protein kinase D: an intracellular traffic regulator on the move*. Trends Cell Biol. 12: 193-200 (2002)
- Vertommen D, Rider M, Ni Y, Waelkens E, Merlevede W, Vandenheede JR, Van Lint J: *Regulation of protein kinase D by multisite phosphorylation. Identification of phosphorylation sites by mass spectrometry and characterization by site-directed mutagenesis*. J. Biol. Chem. 275(26): 19567-76 (2000)
- V Wichert G, Jehle PM, Hoefflich A, Koschnick S, Dralle H, Wolf E, Wiedenmann B, Boehm BO, Adler G, Seufferlein T: *Insulin-like growth factor-I is an autocrine regulator of chromogranin A secretion and growth in human neuroendocrine tumour cells*. Cancer Res. 60: 4573-4581 (2000)
- V Wichert, Edenfeld T, V Blume J, Krisp H, Krndija D, Schmid H, Oswald F, Walther P, Adler G, Seufferlein T: *Protein kinase D2 regulates chromogranin A secretion in human BON neuroendocrine tumour cells*. Cell. Signal. 20(5): 925-34 (2008)

- Waldron RT, Rozengurt E: *Protein Kinase C phosphorylates Protein Kinase D activation loop Ser 744 and Ser 748 and releases autoinhibition by the Pleckstrin Homology Domain*. The Journal of biological chemistry 278(1): 154-163 (2003)
- Waldron RT, Rey O, Iglesias T, Tugal T, Cantrell D, Rozengurt E: *Activation loop Ser744 and Ser748 in protein kinase D are transphosphorylated in vivo*. J. Biol. Chem. 276(35): 32606-15 (2001)
- Waldron RT, Iglesias T, Rozengurt E: *The pleckstrin homology domain of protein kinase D interacts preferentially with the eta isoform of protein kinase C*. J. Biol. Chem. 274: 9224-9230 (1999)
- Walther P, Ziegler A: *Freeze substitution of high-pressure frozen samples: the visibility of biological membranes is improved when the substitution medium contains water*. J. Microsc. 208: 3-10 (2002)
- Westphal V, Hell SW: *Nanoscale Resolution in the Focal Plane of an Optical Microscope*. Phys. Rev. Lett. 94: 143903 (2005)
- Yang F, Moss LG, Phillips Jr. GN: *The molecular structure of green fluorescent protein*. Nature Biotech. 14: 1246-1251 (1996)
- Yeaman C, Ayala MI, Wright J, Bard F, Bossard C, Ang A, Mweda Y, Seufferlein T, Mellman I, Nelson JW, Malhotra V: *Protein kinase D regulates basolateral membrane protein exit from Golgi-network*. Nat. Cell Biol. 6: 106-112 (2004)
- Zugaza JL, Sinnott-Smith J, Van Lint J, Rozengurt E: *Protein kinase D (PKD) activation in intact cells through a protein kinase C-dependent signal transduction pathway*. EMBO Journal. 15(22):6220-30 (1996)

## 9. Anhang

### 9.1. Rohdaten

**Tab. 14: Goldpartikelanzahl der GFP-Antikörper. Das Flächenverhältnis Kern zu Zytoplasma (1:1,74) wurde mit berücksichtigt. Abkürzungen: AC, fluoreszierende Zellen - Zytoplasma mit Primärantikörper; AN, fluoreszierende Zellen - Zellkern mit Primärantikörper; BC, fluoreszierende Zellen - Zytoplasma ohne Primärantikörper; BN, fluoreszierende Zellen - Zellkern ohne Primärantikörper; CC, nicht fluoreszierende Zellen - Zytoplasma mit Primärantikörper; CN, nicht fluoreszierende Zellen - Zellkern mit Primärantikörper; DC, nicht fluoreszierende Zellen - Zytoplasma ohne Primärantikörper; DN, nicht fluoreszierende Zellen - Zellkern ohne Primärantikörper**

| AC               | AN | BC | BN | CC  | CN | DC | DN |
|------------------|----|----|----|-----|----|----|----|
| Molecular Probes |    |    |    |     |    |    |    |
| 263              | 40 | 16 | 18 | 89  | 30 | 17 | 9  |
| 155              | 16 | 9  | 25 | 73  | 11 | 14 | 9  |
| 193              | 73 | 26 | 11 | 132 | 83 | 10 | 4  |
| 244              | 74 | 19 | 17 | 124 | 49 | 23 | 16 |
| 136              | 37 | 24 | 19 | 73  | 41 | 10 | 4  |
| 160              | 47 | 31 | 9  | 56  | 45 | 9  | 11 |
| 235              | 53 | 16 | 17 | 91  | 30 | 17 | 8  |
| 193              | 61 | 24 | 11 | 124 | 69 | 16 | 11 |
| 169              | 41 | 33 | 8  | 155 | 70 | 19 | 7  |
| 178              | 51 | 23 | 15 | 124 | 53 | 12 | 5  |
| Rockland         |    |    |    |     |    |    |    |
| 758              | 48 | 21 | 9  | 78  | 62 | 37 | 24 |
| 717              | 18 | 56 | 15 | 111 | 34 | 31 | 31 |
| 987              | 90 | 26 | 18 | 59  | 41 | 26 | 25 |
| 681              | 57 | 47 | 12 | 78  | 54 | 33 | 27 |
| 890              | 74 | 49 | 24 | 59  | 25 | 51 | 26 |
| 507              | 12 | 30 | 12 | 89  | 63 | 47 | 19 |
| 1249             | 78 | 56 | 18 | 101 | 21 | 54 | 14 |
| 813              | 56 | 37 | 21 | 73  | 34 | 24 | 17 |
| 693              | 43 | 30 | 23 | 91  | 54 | 37 | 31 |
| 737              | 65 | 71 | 7  | 51  | 39 | 56 | 21 |

**Tab. 15: Rohdaten der Statistik für die Golgi-Apparat Vermessung. Die Grundfläche auf dem entwickelten TEM-Negativ war 6,0 cm x 8,3 cm was bei einer Umrechnung die tatsächliche Fläche von 1,9 µm x 2,63 µm ergab. Abkürzungen: A, Entfernung auf dem Negativ in cm; B, tatsächliche Entfernung in µm.**

| Golgilänge |      | Golgbreite |      | Zwischenräume |      | Vesikelgröße |      | Vesikelentfernung |      |
|------------|------|------------|------|---------------|------|--------------|------|-------------------|------|
| A          | B    | A          | B    | A             | B    | A            | B    | A                 | B    |
| PKD2wt     |      |            |      |               |      |              |      |                   |      |
| 1,48       | 0,47 | 3,71       | 1,18 | 0,06          | 0,02 | 1,82         | 0,58 | 3,14              | 1    |
| 1,96       | 0,62 | 0,57       | 0,18 | 0,1           | 0,03 | 0,53         | 0,17 | 3,28              | 1,04 |
| 1,78       | 0,57 | 0,82       | 0,26 | 0,02          | 0,01 | 2,19         | 0,7  | 3,38              | 1,07 |
| 1,93       | 0,61 | 0,54       | 0,17 | 0,03          | 0,01 | 0,35         | 0,11 | 1,71              | 0,54 |
| 1,46       | 0,46 | 1,15       | 0,37 | 0,05          | 0,02 | 0,58         | 0,18 | 3,27              | 1,04 |
| 1,87       | 0,59 | 0,72       | 0,23 | 0,04          | 0,01 | 0,42         | 0,13 | 4,95              | 1,57 |
| 1,65       | 0,52 | 0,72       | 0,23 | 0,04          | 0,01 | 0,16         | 0,05 | 2,31              | 0,73 |
| 1,14       | 0,36 | 0,67       | 0,21 | 0,07          | 0,02 | 0,34         | 0,11 | 3,22              | 1,02 |

|      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 2,31 | 0,73 | 1,31 | 0,42 | 0,07 | 0,02 | 0,4  | 0,13 | 4,13 | 1,31 |
| 1,25 | 0,4  | 0,72 | 0,23 | 0,04 | 0,01 | 0,56 | 0,18 | 1,21 | 0,38 |
| 1,23 | 0,39 | 0,5  | 0,16 | 0,06 | 0,02 | 0,23 | 0,07 | 2,16 | 0,69 |
| 1,11 | 0,35 | 0,64 | 0,2  | 0,05 | 0,02 | 0,45 | 0,14 | 0,82 | 0,26 |
| 1,05 | 0,33 | 0,93 | 0,3  | 0,03 | 0,01 | 0,38 | 0,12 | 2,95 | 0,94 |
| 2,83 | 0,9  | 1,83 | 0,58 | 0,05 | 0,02 | 0,39 | 0,12 | 0,76 | 0,24 |
| 2,44 | 0,77 | 0,61 | 0,19 | 0,06 | 0,02 | 0,25 | 0,08 | 0,74 | 0,23 |
| 2,63 | 0,83 | 0,72 | 0,23 | 0,04 | 0,01 | 0,21 | 0,07 | 1,13 | 0,36 |
| 1,26 | 0,4  | 0,75 | 0,24 | 0,04 | 0,01 | 0,13 | 0,04 | 1,44 | 0,46 |
| 2,13 | 0,68 | 1,12 | 0,36 | 0,03 | 0,01 | 0,26 | 0,08 | 0,69 | 0,22 |
| 1,61 | 0,51 | 0,9  | 0,29 | 0,03 | 0,01 | 0,41 | 0,13 | 4,26 | 1,35 |
|      |      |      |      | 0,02 | 0,01 | 0,31 | 0,1  | 3,88 | 1,23 |
|      |      |      |      | 0,07 | 0,02 | 0,29 | 0,09 | 3,12 | 0,99 |
|      |      |      |      | 0,04 | 0,01 | 1,1  | 0,35 | 1,54 | 0,49 |
|      |      |      |      | 0,06 | 0,02 | 0,2  | 0,06 | 1,82 | 0,58 |
|      |      |      |      | 0,06 | 0,02 | 0,24 | 0,08 | 1,33 | 0,42 |
|      |      |      |      | 0,05 | 0,02 | 0,15 | 0,05 | 3,32 | 1,05 |
|      |      |      |      | 0,08 | 0,03 | 0,22 | 0,07 | 1,36 | 0,43 |
|      |      |      |      | 0,09 | 0,03 | 0,13 | 0,04 | 2,19 | 0,7  |
|      |      |      |      | 0,09 | 0,03 | 0,18 | 0,06 | 0,48 | 0,15 |
|      |      |      |      | 0,06 | 0,02 | 0,25 | 0,08 | 0,92 | 0,29 |
|      |      |      |      | 0,04 | 0,01 | 0,19 | 0,06 | 1,1  | 0,35 |
|      |      |      |      | 0,05 | 0,02 | 0,98 | 0,31 | 3,9  | 1,24 |
|      |      |      |      | 0,05 | 0,02 | 0,56 | 0,18 | 3,88 | 1,23 |
|      |      |      |      | 0,05 | 0,02 | 0,74 | 0,23 | 3,71 | 1,18 |
|      |      |      |      | 0,1  | 0,03 | 0,17 | 0,05 | 1,12 | 0,36 |
|      |      |      |      | 0,05 | 0,02 | 0,32 | 0,1  | 1,13 | 0,36 |
|      |      |      |      | 0,04 | 0,01 | 0,42 | 0,13 | 1,49 | 0,47 |
|      |      |      |      | 0,04 | 0,01 | 1,27 | 0,4  | 2,85 | 0,9  |
|      |      |      |      | 0,14 | 0,04 | 0,17 | 0,05 | 0,99 | 0,31 |
|      |      |      |      |      |      | 0,38 | 0,12 | 2,18 | 0,69 |
|      |      |      |      |      |      | 0,14 | 0,04 | 0,95 | 0,3  |
|      |      |      |      |      |      | 0,17 | 0,05 | 0,48 | 0,15 |
|      |      |      |      |      |      | 0,12 | 0,04 | 0,69 | 0,22 |
|      |      |      |      |      |      | 0,63 | 0,2  | 1,49 | 0,47 |
|      |      |      |      |      |      | 0,37 | 0,12 | 1,18 | 0,37 |
|      |      |      |      |      |      | 0,33 | 0,1  | 0,86 | 0,27 |
|      |      |      |      |      |      | 0,18 | 0,06 | 1,76 | 0,56 |
|      |      |      |      |      |      | 0,2  | 0,06 | 1,15 | 0,37 |
|      |      |      |      |      |      | 0,14 | 0,04 | 0,53 | 0,17 |
|      |      |      |      |      |      | 0,17 | 0,05 | 1,76 | 0,56 |
|      |      |      |      |      |      | 0,17 | 0,05 | 2,51 | 0,8  |
|      |      |      |      |      |      | 0,18 | 0,06 | 1,96 | 0,62 |
|      |      |      |      |      |      | 0,07 | 0,02 | 1,52 | 0,48 |
|      |      |      |      |      |      | 0,31 | 0,1  | 0,7  | 0,22 |
|      |      |      |      |      |      | 0,07 | 0,02 | 0,77 | 0,24 |
|      |      |      |      |      |      | 0,35 | 0,11 | 0,74 | 0,23 |
|      |      |      |      |      |      | 0,27 | 0,09 | 3,03 | 0,96 |
|      |      |      |      |      |      | 0,32 | 0,1  | 3,42 | 1,09 |
|      |      |      |      |      |      | 0,18 | 0,06 | 0,69 | 0,22 |
|      |      |      |      |      |      | 0,12 | 0,04 | 0,35 | 0,11 |
|      |      |      |      |      |      | 0,14 | 0,04 | 0,62 | 0,2  |
|      |      |      |      |      |      | 0,37 | 0,12 | 3,84 | 1,22 |

|  |  |  |  |  |  |      |      |      |      |
|--|--|--|--|--|--|------|------|------|------|
|  |  |  |  |  |  | 0,19 | 0,06 | 2,61 | 0,83 |
|  |  |  |  |  |  | 0,11 | 0,03 | 3,85 | 1,22 |
|  |  |  |  |  |  | 0,5  | 0,16 | 0,58 | 0,18 |
|  |  |  |  |  |  | 0,17 | 0,05 | 0,79 | 0,25 |
|  |  |  |  |  |  | 0,08 | 0,03 | 0,81 | 0,26 |
|  |  |  |  |  |  | 0,25 | 0,08 | 2,98 | 0,95 |
|  |  |  |  |  |  | 0,2  | 0,06 | 3,32 | 1,05 |
|  |  |  |  |  |  | 0,26 | 0,08 | 0,36 | 0,11 |
|  |  |  |  |  |  | 0,17 | 0,05 | 0,53 | 0,17 |
|  |  |  |  |  |  | 0,12 | 0,04 | 0,72 | 0,23 |
|  |  |  |  |  |  | 0,13 | 0,04 | 0,56 | 0,18 |
|  |  |  |  |  |  | 0,2  | 0,06 | 4,59 | 1,46 |
|  |  |  |  |  |  | 0,22 | 0,07 | 2,47 | 0,78 |
|  |  |  |  |  |  | 0,17 | 0,05 | 2,69 | 0,85 |
|  |  |  |  |  |  | 0,18 | 0,06 | 0,97 | 0,31 |
|  |  |  |  |  |  | 0,23 | 0,07 | 0,63 | 0,2  |
|  |  |  |  |  |  | 0,18 | 0,06 | 2,99 | 0,95 |
|  |  |  |  |  |  | 0,79 | 0,25 | 2,79 | 0,89 |
|  |  |  |  |  |  | 0,55 | 0,17 | 1,59 | 0,5  |
|  |  |  |  |  |  | 0,25 | 0,08 | 2,69 | 0,85 |
|  |  |  |  |  |  | 0,14 | 0,04 | 3,07 | 0,97 |
|  |  |  |  |  |  | 0,15 | 0,05 | 0,3  | 0,1  |
|  |  |  |  |  |  | 0,3  | 0,1  | 0,6  | 0,19 |
|  |  |  |  |  |  | 0,69 | 0,22 | 6,41 | 2,03 |
|  |  |  |  |  |  | 0,11 | 0,03 | 4,07 | 1,29 |
|  |  |  |  |  |  | 0,14 | 0,04 | 2,25 | 0,71 |
|  |  |  |  |  |  | 0,21 | 0,07 | 1,9  | 0,6  |
|  |  |  |  |  |  | 0,18 | 0,06 | 0,8  | 0,25 |
|  |  |  |  |  |  | 0,21 | 0,07 | 0,79 | 0,25 |
|  |  |  |  |  |  | 0,43 | 0,14 | 4,91 | 1,56 |
|  |  |  |  |  |  | 0,62 | 0,2  | 4,23 | 1,34 |
|  |  |  |  |  |  | 0,22 | 0,07 | 2,16 | 0,69 |
|  |  |  |  |  |  | 0,22 | 0,07 | 1,41 | 0,45 |
|  |  |  |  |  |  | 0,11 | 0,03 | 0,67 | 0,21 |
|  |  |  |  |  |  | 0,15 | 0,05 | 1,79 | 0,57 |
|  |  |  |  |  |  | 0,56 | 0,18 | 2,31 | 0,73 |
|  |  |  |  |  |  | 0,68 | 0,22 | 1,87 | 0,59 |
|  |  |  |  |  |  | 0,27 | 0,09 | 0,95 | 0,3  |
|  |  |  |  |  |  | 0,25 | 0,08 | 1,36 | 0,43 |
|  |  |  |  |  |  | 0,16 | 0,05 | 0,59 | 0,19 |
|  |  |  |  |  |  | 0,11 | 0,03 | 0,71 | 0,23 |
|  |  |  |  |  |  | 0,58 | 0,18 | 2,85 | 0,9  |
|  |  |  |  |  |  | 0,31 | 0,1  | 2,18 | 0,69 |
|  |  |  |  |  |  | 0,15 | 0,05 | 1,27 | 0,4  |
|  |  |  |  |  |  | 0,11 | 0,03 | 1,13 | 0,36 |
|  |  |  |  |  |  | 0,07 | 0,02 | 2,91 | 0,92 |
|  |  |  |  |  |  | 0,19 | 0,06 | 1,13 | 0,36 |
|  |  |  |  |  |  | 0,39 | 0,12 | 4,16 | 1,32 |
|  |  |  |  |  |  | 0,11 | 0,03 | 3,2  | 1,02 |
|  |  |  |  |  |  | 0,14 | 0,04 | 2,63 | 0,83 |
|  |  |  |  |  |  | 0,14 | 0,04 | 1,57 | 0,5  |
|  |  |  |  |  |  | 0,1  | 0,03 | 0,88 | 0,28 |
|  |  |  |  |  |  | 0,14 | 0,04 | 1,02 | 0,32 |

| PKD2da |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 2,13   | 0,68 | 0,99 | 0,31 | 0,05 | 0,02 | 0,73 | 0,23 | 2,67 | 0,85 |
| 2,78   | 0,88 | 1,04 | 0,33 | 0,04 | 0,01 | 0,49 | 0,16 | 2,82 | 0,9  |
| 3,36   | 1,07 | 0,92 | 0,29 | 0,04 | 0,01 | 0,23 | 0,07 | 1,79 | 0,57 |
| 3,1    | 0,98 | 1,1  | 0,35 | 0,07 | 0,02 | 0,67 | 0,21 | 0,7  | 0,22 |
| 1,76   | 0,56 | 0,84 | 0,27 | 0,03 | 0,01 | 0,16 | 0,05 | 0,9  | 0,29 |
| 1,38   | 0,44 | 1,11 | 0,35 | 0,04 | 0,01 | 0,12 | 0,04 | 1,68 | 0,53 |
| 1,57   | 0,5  | 0,87 | 0,28 | 0,07 | 0,02 | 0,28 | 0,09 | 1,17 | 0,37 |
| 0,87   | 0,28 | 1,47 | 0,47 | 0,05 | 0,02 | 0,2  | 0,06 | 2,15 | 0,68 |
| 2,45   | 0,78 | 1,04 | 0,33 | 0,04 | 0,01 | 0,14 | 0,04 | 1,47 | 0,47 |
| 1,81   | 0,57 | 1,19 | 0,38 | 0,04 | 0,01 | 0,46 | 0,15 | 1,02 | 0,32 |
| 2,21   | 0,7  | 1    | 0,32 | 0,07 | 0,02 | 0,2  | 0,06 | 0,42 | 0,13 |
| 1,74   | 0,55 | 0,78 | 0,25 | 0,06 | 0,02 | 0,18 | 0,06 | 1,29 | 0,41 |
| 2,2    | 0,7  | 0,49 | 0,16 | 0,03 | 0,01 | 0,27 | 0,09 | 0,88 | 0,28 |
| 1,41   | 0,45 | 0,59 | 0,19 | 0,08 | 0,03 | 0,33 | 0,1  | 1,65 | 0,52 |
| 1,51   | 0,48 | 0,46 | 0,15 | 0,07 | 0,02 | 0,14 | 0,04 | 0,81 | 0,26 |
| 2,1    | 0,67 | 0,66 | 0,21 | 0,1  | 0,03 | 0,13 | 0,04 | 2,13 | 0,68 |
| 2,13   | 0,68 | 0,82 | 0,26 | 0,04 | 0,01 | 1,5  | 0,48 | 3,18 | 1,01 |
| 2,1    | 0,67 | 1,26 | 0,4  | 0,1  | 0,03 | 0,25 | 0,08 | 3,9  | 1,24 |
| 1,33   | 0,42 | 0,51 | 0,16 | 0,05 | 0,02 | 0,19 | 0,06 | 3,57 | 1,13 |
|        |      |      |      | 0,08 | 0,03 | 0,25 | 0,08 | 1,72 | 0,55 |
|        |      |      |      | 0,06 | 0,02 | 0,23 | 0,07 | 2,12 | 0,67 |
|        |      |      |      | 0,07 | 0,02 | 1,67 | 0,53 | 1,2  | 0,38 |
|        |      |      |      | 0,06 | 0,02 | 0,17 | 0,05 | 3,12 | 0,99 |
|        |      |      |      | 0,04 | 0,01 | 0,14 | 0,04 | 1,57 | 0,5  |
|        |      |      |      | 0,05 | 0,02 | 0,47 | 0,15 | 0,78 | 0,25 |
|        |      |      |      | 0,04 | 0,01 | 0,24 | 0,08 | 2,67 | 0,85 |
|        |      |      |      | 0,07 | 0,02 | 0,22 | 0,07 | 3,65 | 1,16 |
|        |      |      |      | 0,06 | 0,02 | 0,21 | 0,07 | 2,77 | 0,88 |
|        |      |      |      | 0,06 | 0,02 | 0,19 | 0,06 | 3,72 | 1,18 |
|        |      |      |      | 0,06 | 0,02 | 0,21 | 0,07 | 3,65 | 1,16 |
|        |      |      |      | 0,08 | 0,03 | 0,24 | 0,08 | 0,85 | 0,27 |
|        |      |      |      | 0,05 | 0,02 | 0,16 | 0,05 | 2,21 | 0,7  |
|        |      |      |      | 0,05 | 0,02 | 0,15 | 0,05 | 1,91 | 0,61 |
|        |      |      |      | 0,05 | 0,02 | 0,25 | 0,08 | 2,59 | 0,82 |
|        |      |      |      | 0,05 | 0,02 | 0,12 | 0,04 | 2,2  | 0,7  |
|        |      |      |      | 0,07 | 0,02 | 0,13 | 0,04 | 0,93 | 0,3  |
|        |      |      |      | 0,06 | 0,02 | 0,52 | 0,17 | 0,38 | 0,12 |
|        |      |      |      | 0,04 | 0,01 | 0,56 | 0,18 | 0,64 | 0,2  |
|        |      |      |      |      |      | 0,25 | 0,08 | 0,7  | 0,22 |
|        |      |      |      |      |      | 0,28 | 0,09 | 2,78 | 0,88 |
|        |      |      |      |      |      | 0,22 | 0,07 | 1,62 | 0,51 |
|        |      |      |      |      |      | 0,19 | 0,06 | 1,32 | 0,42 |
|        |      |      |      |      |      | 0,7  | 0,22 | 1,53 | 0,49 |
|        |      |      |      |      |      | 0,55 | 0,17 | 2,9  | 0,92 |
|        |      |      |      |      |      | 0,23 | 0,07 | 4,34 | 1,38 |
|        |      |      |      |      |      | 0,18 | 0,06 | 1,68 | 0,53 |
|        |      |      |      |      |      | 0,49 | 0,16 | 3,09 | 0,98 |
|        |      |      |      |      |      | 0,18 | 0,06 | 2,38 | 0,76 |
|        |      |      |      |      |      | 1,22 | 0,39 | 3,12 | 0,99 |
|        |      |      |      |      |      | 0,1  | 0,03 | 2,11 | 0,67 |
|        |      |      |      |      |      | 0,2  | 0,06 | 1,23 | 0,39 |
|        |      |      |      |      |      | 0,16 | 0,05 | 1,68 | 0,53 |

|  |  |  |  |  |  |      |      |      |      |
|--|--|--|--|--|--|------|------|------|------|
|  |  |  |  |  |  | 0,22 | 0,07 | 1,22 | 0,39 |
|  |  |  |  |  |  | 0,14 | 0,04 | 0,61 | 0,19 |
|  |  |  |  |  |  | 0,32 | 0,1  | 3,47 | 1,1  |
|  |  |  |  |  |  | 0,45 | 0,14 | 3,63 | 1,15 |
|  |  |  |  |  |  | 0,36 | 0,11 | 2,77 | 0,88 |
|  |  |  |  |  |  | 0,27 | 0,09 | 1,98 | 0,63 |
|  |  |  |  |  |  | 0,15 | 0,05 | 0,62 | 0,2  |
|  |  |  |  |  |  | 0,13 | 0,04 | 0,77 | 0,24 |
|  |  |  |  |  |  | 0,4  | 0,13 | 4,57 | 1,45 |
|  |  |  |  |  |  | 0,26 | 0,08 | 4,25 | 1,35 |
|  |  |  |  |  |  | 0,27 | 0,09 | 3,16 | 1    |
|  |  |  |  |  |  | 0,14 | 0,04 | 1,24 | 0,39 |
|  |  |  |  |  |  | 0,1  | 0,03 | 0,83 | 0,26 |
|  |  |  |  |  |  | 0,16 | 0,05 | 0,42 | 0,13 |
|  |  |  |  |  |  | 0,19 | 0,06 | 1,44 | 0,46 |
|  |  |  |  |  |  | 0,22 | 0,07 | 3,81 | 1,21 |
|  |  |  |  |  |  | 0,22 | 0,07 | 0,94 | 0,3  |
|  |  |  |  |  |  | 0,13 | 0,04 | 0,7  | 0,22 |
|  |  |  |  |  |  | 0,09 | 0,03 | 0,89 | 0,28 |
|  |  |  |  |  |  | 0,17 | 0,05 | 1,36 | 0,43 |
|  |  |  |  |  |  | 0,44 | 0,14 | 2,13 | 0,68 |
|  |  |  |  |  |  | 0,31 | 0,1  | 0,71 | 0,23 |
|  |  |  |  |  |  | 0,2  | 0,06 | 0,69 | 0,22 |
|  |  |  |  |  |  | 0,12 | 0,04 | 0,51 | 0,16 |
|  |  |  |  |  |  | 0,09 | 0,03 | 2,41 | 0,77 |
|  |  |  |  |  |  | 0,14 | 0,04 | 1,52 | 0,48 |
|  |  |  |  |  |  | 0,31 | 0,1  | 3,58 | 1,14 |
|  |  |  |  |  |  | 0,49 | 0,16 | 2,82 | 0,9  |
|  |  |  |  |  |  | 0,16 | 0,05 | 0,59 | 0,19 |
|  |  |  |  |  |  | 0,22 | 0,07 | 1,46 | 0,46 |
|  |  |  |  |  |  | 0,15 | 0,05 | 1,34 | 0,43 |
|  |  |  |  |  |  | 0,1  | 0,03 | 0,34 | 0,11 |
|  |  |  |  |  |  | 0,95 | 0,3  | 1,93 | 0,61 |
|  |  |  |  |  |  | 0,19 | 0,06 | 2,61 | 0,83 |
|  |  |  |  |  |  | 0,13 | 0,04 | 1,83 | 0,58 |
|  |  |  |  |  |  | 0,13 | 0,04 | 0,99 | 0,31 |
|  |  |  |  |  |  | 0,14 | 0,04 | 1,13 | 0,36 |
|  |  |  |  |  |  | 0,14 | 0,04 | 2,38 | 0,76 |
|  |  |  |  |  |  | 0,81 | 0,26 | 2,93 | 0,93 |
|  |  |  |  |  |  | 0,2  | 0,06 | 3,1  | 0,98 |
|  |  |  |  |  |  | 0,15 | 0,05 | 0,53 | 0,17 |
|  |  |  |  |  |  | 0,14 | 0,04 | 1,12 | 0,36 |
|  |  |  |  |  |  | 0,11 | 0,03 | 2,42 | 0,77 |
|  |  |  |  |  |  | 0,4  | 0,13 | 1,27 | 0,4  |
|  |  |  |  |  |  | 1,28 | 0,41 | 2,36 | 0,75 |
|  |  |  |  |  |  | 0,16 | 0,05 | 3,88 | 1,23 |
|  |  |  |  |  |  | 0,1  | 0,03 | 1,37 | 0,43 |
|  |  |  |  |  |  | 0,15 | 0,05 | 1,32 | 0,42 |
|  |  |  |  |  |  | 0,19 | 0,06 | 0,96 | 0,3  |
|  |  |  |  |  |  | 0,42 | 0,13 | 1,02 | 0,32 |
|  |  |  |  |  |  | 0,18 | 0,06 | 1,44 | 0,46 |
|  |  |  |  |  |  | 0,22 | 0,07 | 1,33 | 0,42 |
|  |  |  |  |  |  | 0,12 | 0,04 | 1,13 | 0,36 |

|               |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|---------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|               |      |      |      |      |      | 0,11 | 0,03 | 2,24 | 0,71 |
|               |      |      |      |      |      | 0,27 | 0,09 | 0,43 | 0,14 |
|               |      |      |      |      |      | 0,2  | 0,06 | 1,42 | 0,45 |
|               |      |      |      |      |      | 0,46 | 0,15 | 3,15 | 1    |
|               |      |      |      |      |      | 0,19 | 0,06 | 4,11 | 1,3  |
|               |      |      |      |      |      | 0,16 | 0,05 | 0,47 | 0,15 |
|               |      |      |      |      |      | 0,13 | 0,04 | 0,97 | 0,31 |
|               |      |      |      |      |      | 0,12 | 0,04 | 0,92 | 0,29 |
|               |      |      |      |      |      | 0,22 | 0,07 | 1,82 | 0,58 |
| <b>PKD2se</b> |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 2,26          | 0,72 | 1,08 | 0,34 | 0,03 | 0,01 | 0,95 | 0,3  | 2,76 | 0,88 |
| 3,17          | 1,01 | 0,34 | 0,11 | 0,04 | 0,01 | 0,75 | 0,24 | 2,76 | 0,88 |
| 1,47          | 0,47 | 0,68 | 0,22 | 0,05 | 0,02 | 0,38 | 0,12 | 3,26 | 1,03 |
| 1,21          | 0,38 | 0,66 | 0,21 | 0,03 | 0,01 | 0,13 | 0,04 | 1,64 | 0,52 |
| 1,16          | 0,37 | 0,62 | 0,2  | 0,03 | 0,01 | 0,09 | 0,03 | 1,03 | 0,33 |
| 2,17          | 0,69 | 0,83 | 0,26 | 0,05 | 0,02 | 0,24 | 0,08 | 1,61 | 0,51 |
| 1,47          | 0,47 | 0,81 | 0,26 | 0,04 | 0,01 | 0,2  | 0,06 | 1,87 | 0,59 |
| 1,26          | 0,4  | 0,73 | 0,23 | 0,03 | 0,01 | 0,25 | 0,08 | 1,68 | 0,53 |
| 1,64          | 0,52 | 0,7  | 0,22 | 0,06 | 0,02 | 0,19 | 0,06 | 2,11 | 0,67 |
| 1,96          | 0,62 | 1,16 | 0,37 | 0,04 | 0,01 | 1,69 | 0,54 | 0,37 | 0,12 |
| 2,02          | 0,64 | 0,92 | 0,29 | 0,07 | 0,02 | 0,88 | 0,28 | 1,22 | 0,39 |
| 2,27          | 0,72 | 1,27 | 0,4  | 0,04 | 0,01 | 0,32 | 0,1  | 0,67 | 0,21 |
| 2,03          | 0,64 | 1,07 | 0,34 | 0,04 | 0,01 | 0,27 | 0,09 | 3,56 | 1,13 |
| 1,93          | 0,61 | 1,17 | 0,37 | 0,04 | 0,01 | 0,13 | 0,04 | 2,32 | 0,74 |
| 1,92          | 0,61 | 0,87 | 0,28 | 0,06 | 0,02 | 0,09 | 0,03 | 2,37 | 0,75 |
| 2,38          | 0,76 | 0,51 | 0,16 | 0,05 | 0,02 | 0,25 | 0,08 | 0,74 | 0,23 |
| 3,57          | 1,13 | 0,91 | 0,29 | 0,05 | 0,02 | 0,24 | 0,08 | 0,65 | 0,21 |
| 2,03          | 0,64 | 1,2  | 0,38 | 0,04 | 0,01 | 0,84 | 0,27 | 0,84 | 0,27 |
| 2,16          | 0,69 | 0,87 | 0,28 | 0,04 | 0,01 | 2,05 | 0,65 | 2,36 | 0,75 |
|               |      |      |      | 0,03 | 0,01 | 0,59 | 0,19 | 2,57 | 0,82 |
|               |      |      |      | 0,05 | 0,02 | 0,51 | 0,16 | 1,19 | 0,38 |
|               |      |      |      | 0,04 | 0,01 | 0,18 | 0,06 | 3,66 | 1,16 |
|               |      |      |      | 0,03 | 0,01 | 0,09 | 0,03 | 0,44 | 0,14 |
|               |      |      |      | 0,04 | 0,01 | 0,14 | 0,04 | 0,39 | 0,12 |
|               |      |      |      | 0,05 | 0,02 | 0,59 | 0,19 | 2,15 | 0,68 |
|               |      |      |      | 0,04 | 0,01 | 0,59 | 0,19 | 2,56 | 0,81 |
|               |      |      |      | 0,08 | 0,03 | 0,22 | 0,07 | 0,38 | 0,12 |
|               |      |      |      | 0,04 | 0,01 | 0,1  | 0,03 | 0,38 | 0,12 |
|               |      |      |      | 0,05 | 0,02 | 0,1  | 0,03 | 0,46 | 0,15 |
|               |      |      |      | 0,05 | 0,02 | 0,07 | 0,02 | 2,83 | 0,9  |
|               |      |      |      | 0,04 | 0,01 | 0,52 | 0,17 | 4,02 | 1,28 |
|               |      |      |      | 0,06 | 0,02 | 0,22 | 0,07 | 2,15 | 0,68 |
|               |      |      |      | 0,05 | 0,02 | 0,27 | 0,09 | 3,05 | 0,97 |
|               |      |      |      | 0,07 | 0,02 | 0,1  | 0,03 | 1,09 | 0,35 |
|               |      |      |      | 0,06 | 0,02 | 0,14 | 0,04 | 0,71 | 0,23 |
|               |      |      |      | 0,05 | 0,02 | 0,06 | 0,02 | 0,51 | 0,16 |
|               |      |      |      | 0,07 | 0,02 | 0,19 | 0,06 | 2,7  | 0,86 |
|               |      |      |      | 0,11 | 0,03 | 0,17 | 0,05 | 2,33 | 0,74 |
|               |      |      |      |      |      | 0,18 | 0,06 | 0,77 | 0,24 |
|               |      |      |      |      |      | 0,35 | 0,11 | 1,38 | 0,44 |
|               |      |      |      |      |      | 0,09 | 0,03 | 0,82 | 0,26 |
|               |      |      |      |      |      | 0,11 | 0,03 | 0,61 | 0,19 |
|               |      |      |      |      |      | 0,36 | 0,11 | 1,36 | 0,43 |

|  |  |  |  |  |  |      |      |      |      |
|--|--|--|--|--|--|------|------|------|------|
|  |  |  |  |  |  | 0,41 | 0,13 | 0,48 | 0,15 |
|  |  |  |  |  |  | 0,67 | 0,21 | 1,8  | 0,57 |
|  |  |  |  |  |  | 0,3  | 0,1  | 0,6  | 0,19 |
|  |  |  |  |  |  | 0,09 | 0,03 | 0,45 | 0,14 |
|  |  |  |  |  |  | 0,1  | 0,03 | 0,79 | 0,25 |
|  |  |  |  |  |  | 0,15 | 0,05 | 2,05 | 0,65 |
|  |  |  |  |  |  | 0,14 | 0,04 | 0,65 | 0,21 |
|  |  |  |  |  |  | 0,12 | 0,04 | 0,66 | 0,21 |
|  |  |  |  |  |  | 0,19 | 0,06 | 0,23 | 0,07 |
|  |  |  |  |  |  | 0,66 | 0,21 | 0,98 | 0,31 |
|  |  |  |  |  |  | 0,13 | 0,04 | 0,79 | 0,25 |
|  |  |  |  |  |  | 1,46 | 0,46 | 4,34 | 1,38 |
|  |  |  |  |  |  | 0,95 | 0,3  | 3,52 | 1,12 |
|  |  |  |  |  |  | 0,64 | 0,2  | 2,77 | 0,88 |
|  |  |  |  |  |  | 0,16 | 0,05 | 0,83 | 0,26 |
|  |  |  |  |  |  | 0,18 | 0,06 | 0,86 | 0,27 |
|  |  |  |  |  |  | 0,28 | 0,09 | 0,59 | 0,19 |
|  |  |  |  |  |  | 0,48 | 0,15 | 4,13 | 1,31 |
|  |  |  |  |  |  | 0,36 | 0,11 | 2,78 | 0,88 |
|  |  |  |  |  |  | 0,36 | 0,11 | 1,29 | 0,41 |
|  |  |  |  |  |  | 0,12 | 0,04 | 0,72 | 0,23 |
|  |  |  |  |  |  | 0,13 | 0,04 | 1,4  | 0,44 |
|  |  |  |  |  |  | 0,12 | 0,04 | 0,77 | 0,24 |
|  |  |  |  |  |  | 0,27 | 0,09 | 1,9  | 0,6  |
|  |  |  |  |  |  | 0,18 | 0,06 | 0,94 | 0,3  |
|  |  |  |  |  |  | 0,1  | 0,03 | 0,83 | 0,26 |
|  |  |  |  |  |  | 0,08 | 0,03 | 0,95 | 0,3  |
|  |  |  |  |  |  | 0,11 | 0,03 | 0,58 | 0,18 |
|  |  |  |  |  |  | 0,13 | 0,04 | 0,64 | 0,2  |
|  |  |  |  |  |  | 0,41 | 0,13 | 4,4  | 1,4  |
|  |  |  |  |  |  | 0,41 | 0,13 | 1,97 | 0,63 |
|  |  |  |  |  |  | 0,8  | 0,25 | 1,45 | 0,46 |
|  |  |  |  |  |  | 0,19 | 0,06 | 0,75 | 0,24 |
|  |  |  |  |  |  | 0,21 | 0,07 | 0,73 | 0,23 |
|  |  |  |  |  |  | 0,1  | 0,03 | 0,85 | 0,27 |
|  |  |  |  |  |  | 0,89 | 0,28 | 4,82 | 1,53 |
|  |  |  |  |  |  | 0,39 | 0,12 | 2,72 | 0,86 |
|  |  |  |  |  |  | 0,3  | 0,1  | 2,64 | 0,84 |
|  |  |  |  |  |  | 0,1  | 0,03 | 1,71 | 0,54 |
|  |  |  |  |  |  | 0,1  | 0,03 | 1,11 | 0,35 |
|  |  |  |  |  |  | 0,27 | 0,09 | 0,28 | 0,09 |
|  |  |  |  |  |  | 0,58 | 0,18 | 1,8  | 0,57 |
|  |  |  |  |  |  | 0,53 | 0,17 | 1,43 | 0,45 |
|  |  |  |  |  |  | 0,4  | 0,13 | 2,37 | 0,75 |
|  |  |  |  |  |  | 0,22 | 0,07 | 2,12 | 0,67 |
|  |  |  |  |  |  | 0,26 | 0,08 | 1,01 | 0,32 |
|  |  |  |  |  |  | 0,14 | 0,04 | 0,72 | 0,23 |
|  |  |  |  |  |  | 0,37 | 0,12 | 3,18 | 1,01 |
|  |  |  |  |  |  | 0,27 | 0,09 | 1,91 | 0,61 |
|  |  |  |  |  |  | 0,26 | 0,08 | 1,46 | 0,46 |
|  |  |  |  |  |  | 0,04 | 0,01 | 1,36 | 0,43 |
|  |  |  |  |  |  | 0,14 | 0,04 | 0,41 | 0,13 |
|  |  |  |  |  |  | 0,16 | 0,05 | 0,54 | 0,17 |

|                                           |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|-------------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|                                           |      |      |      |      |      | 0,34 | 0,11 | 1,34 | 0,43 |
|                                           |      |      |      |      |      | 0,17 | 0,05 | 1    | 0,32 |
|                                           |      |      |      |      |      | 0,19 | 0,06 | 3,88 | 1,23 |
|                                           |      |      |      |      |      | 0,08 | 0,03 | 0,17 | 0,05 |
|                                           |      |      |      |      |      | 0,11 | 0,03 | 0,49 | 0,16 |
|                                           |      |      |      |      |      | 0,1  | 0,03 | 0,59 | 0,19 |
|                                           |      |      |      |      |      | 0,17 | 0,05 | 3,46 | 1,1  |
|                                           |      |      |      |      |      | 0,37 | 0,12 | 3,86 | 1,23 |
|                                           |      |      |      |      |      | 0,13 | 0,04 | 1,56 | 0,5  |
|                                           |      |      |      |      |      | 0,13 | 0,04 | 1,44 | 0,46 |
|                                           |      |      |      |      |      | 0,12 | 0,04 | 0,61 | 0,19 |
|                                           |      |      |      |      |      | 0,46 | 0,15 | 0,34 | 0,11 |
|                                           |      |      |      |      |      | 1,2  | 0,38 | 1,81 | 0,57 |
|                                           |      |      |      |      |      | 0,52 | 0,17 | 3,88 | 1,23 |
|                                           |      |      |      |      |      | 0,21 | 0,07 | 2,51 | 0,8  |
|                                           |      |      |      |      |      | 0,14 | 0,04 | 0,89 | 0,28 |
|                                           |      |      |      |      |      | 0,26 | 0,08 | 1,27 | 0,4  |
|                                           |      |      |      |      |      | 0,14 | 0,04 | 0,36 | 0,11 |
| <b>BON nicht transfiziert (Kontrolle)</b> |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 2,1                                       | 0,67 | 0,87 | 0,28 | 0,06 | 0,02 | 0,31 | 0,1  | 0,89 | 0,28 |
| 1,72                                      | 0,55 | 0,9  | 0,29 | 0,03 | 0,01 | 0,14 | 0,04 | 1,79 | 0,57 |
| 2,3                                       | 0,73 | 1,31 | 0,42 | 0,04 | 0,01 | 0,26 | 0,08 | 1,31 | 0,42 |
| 1,69                                      | 0,54 | 0,87 | 0,28 | 0,05 | 0,02 | 0,14 | 0,04 | 1,48 | 0,47 |
| 1,62                                      | 0,51 | 0,77 | 0,24 | 0,05 | 0,02 | 0,1  | 0,03 | 0,46 | 0,15 |
| 1,84                                      | 0,58 | 1,09 | 0,35 | 0,04 | 0,01 | 0,27 | 0,09 | 0,85 | 0,27 |
| 2,36                                      | 0,75 | 1,26 | 0,4  | 0,03 | 0,01 | 0,46 | 0,15 | 3,45 | 1,1  |
| 1,26                                      | 0,4  | 0,67 | 0,21 | 0,05 | 0,02 | 0,33 | 0,1  | 3,96 | 1,26 |
| 2,07                                      | 0,66 | 2,37 | 0,75 | 0,06 | 0,02 | 0,11 | 0,03 | 1,9  | 0,6  |
| 1,42                                      | 0,45 | 0,7  | 0,22 | 0,05 | 0,02 | 0,26 | 0,08 | 1,29 | 0,41 |
| 1,47                                      | 0,47 | 0,78 | 0,25 | 0,04 | 0,01 | 1,04 | 0,33 | 0,52 | 0,17 |
| 2,07                                      | 0,66 | 0,61 | 0,19 | 0,04 | 0,01 | 0,12 | 0,04 | 0,65 | 0,21 |
| 3                                         | 0,95 | 0,94 | 0,3  | 0,05 | 0,02 | 0,3  | 0,1  | 3,9  | 1,24 |
| 3,38                                      | 1,07 | 0,74 | 0,23 | 0,12 | 0,04 | 0,27 | 0,09 | 3,65 | 1,16 |
| 1,32                                      | 0,42 | 0,8  | 0,25 | 0,05 | 0,02 | 0,3  | 0,1  | 1,55 | 0,49 |
| 2,27                                      | 0,72 | 0,86 | 0,27 | 0,04 | 0,01 | 0,18 | 0,06 | 2,08 | 0,66 |
| 1,71                                      | 0,54 | 0,57 | 0,18 | 0,05 | 0,02 | 0,41 | 0,13 | 0,77 | 0,24 |
| 1,81                                      | 0,57 | 0,39 | 0,12 | 0,05 | 0,02 | 0,08 | 0,03 | 1,25 | 0,4  |
| 1,01                                      | 0,32 | 0,7  | 0,22 | 0,04 | 0,01 | 0,38 | 0,12 | 1,85 | 0,59 |
|                                           |      |      |      | 0,04 | 0,01 | 0,48 | 0,15 | 1,35 | 0,43 |
|                                           |      |      |      | 0,04 | 0,01 | 0,42 | 0,13 | 1,73 | 0,55 |
|                                           |      |      |      | 0,03 | 0,01 | 0,23 | 0,07 | 2,12 | 0,67 |
|                                           |      |      |      | 0,05 | 0,02 | 0,11 | 0,03 | 0,38 | 0,12 |
|                                           |      |      |      | 0,07 | 0,02 | 0,09 | 0,03 | 0,44 | 0,14 |
|                                           |      |      |      | 0,04 | 0,01 | 0,72 | 0,23 | 1,54 | 0,49 |
|                                           |      |      |      | 0,06 | 0,02 | 0,12 | 0,04 | 1,68 | 0,53 |
|                                           |      |      |      | 0,05 | 0,02 | 0,14 | 0,04 | 0,93 | 0,3  |
|                                           |      |      |      | 0,06 | 0,02 | 0,15 | 0,05 | 0,89 | 0,28 |
|                                           |      |      |      | 0,07 | 0,02 | 0,09 | 0,03 | 1,18 | 0,37 |
|                                           |      |      |      | 0,04 | 0,01 | 0,22 | 0,07 | 0,49 | 0,16 |
|                                           |      |      |      | 0,06 | 0,02 | 0,11 | 0,03 | 2,84 | 0,9  |
|                                           |      |      |      | 0,03 | 0,01 | 0,13 | 0,04 | 2,52 | 0,8  |
|                                           |      |      |      | 0,04 | 0,01 | 0,13 | 0,04 | 1,02 | 0,32 |
|                                           |      |      |      | 0,06 | 0,02 | 0,64 | 0,2  | 2,41 | 0,77 |

|  |  |  |  |      |      |      |      |      |      |
|--|--|--|--|------|------|------|------|------|------|
|  |  |  |  | 0,03 | 0,01 | 0,19 | 0,06 | 1,27 | 0,4  |
|  |  |  |  | 0,04 | 0,01 | 0,18 | 0,06 | 1,6  | 0,51 |
|  |  |  |  | 0,06 | 0,02 | 0,3  | 0,1  | 2,05 | 0,65 |
|  |  |  |  | 0,03 | 0,01 | 0,22 | 0,07 | 1,27 | 0,4  |
|  |  |  |  |      |      | 0,14 | 0,04 | 1,18 | 0,37 |
|  |  |  |  |      |      | 0,13 | 0,04 | 0,91 | 0,29 |
|  |  |  |  |      |      | 0,1  | 0,03 | 1,04 | 0,33 |
|  |  |  |  |      |      | 0,1  | 0,03 | 2,38 | 0,76 |
|  |  |  |  |      |      | 0,2  | 0,06 | 3,08 | 0,98 |
|  |  |  |  |      |      | 0,23 | 0,07 | 3,86 | 1,23 |
|  |  |  |  |      |      | 0,5  | 0,16 | 1,06 | 0,34 |
|  |  |  |  |      |      | 0,61 | 0,19 | 0,85 | 0,27 |
|  |  |  |  |      |      | 0,1  | 0,03 | 1,2  | 0,38 |
|  |  |  |  |      |      | 0,08 | 0,03 | 0,49 | 0,16 |
|  |  |  |  |      |      | 0,2  | 0,06 | 4,27 | 1,36 |
|  |  |  |  |      |      | 0,21 | 0,07 | 3,62 | 1,15 |
|  |  |  |  |      |      | 0,15 | 0,05 | 2,98 | 0,95 |
|  |  |  |  |      |      | 0,12 | 0,04 | 2,59 | 0,82 |
|  |  |  |  |      |      | 0,14 | 0,04 | 0,54 | 0,17 |
|  |  |  |  |      |      | 1,15 | 0,37 | 0,85 | 0,27 |
|  |  |  |  |      |      | 0,58 | 0,18 | 3,84 | 1,22 |
|  |  |  |  |      |      | 0,3  | 0,1  | 3,1  | 0,98 |
|  |  |  |  |      |      | 0,22 | 0,07 | 1,59 | 0,5  |
|  |  |  |  |      |      | 0,29 | 0,09 | 1,63 | 0,52 |
|  |  |  |  |      |      | 0,13 | 0,04 | 0,36 | 0,11 |
|  |  |  |  |      |      | 0,19 | 0,06 | 1,03 | 0,33 |
|  |  |  |  |      |      | 0,11 | 0,03 | 3,96 | 1,26 |
|  |  |  |  |      |      | 0,13 | 0,04 | 3,15 | 1    |
|  |  |  |  |      |      | 0,1  | 0,03 | 2,16 | 0,69 |
|  |  |  |  |      |      | 0,71 | 0,23 | 0,84 | 0,27 |
|  |  |  |  |      |      | 0,65 | 0,21 | 0,43 | 0,14 |
|  |  |  |  |      |      | 0,31 | 0,1  | 0,54 | 0,17 |
|  |  |  |  |      |      | 0,27 | 0,09 | 2,94 | 0,93 |
|  |  |  |  |      |      | 0,33 | 0,1  | 2,09 | 0,66 |
|  |  |  |  |      |      | 0,41 | 0,13 | 2,17 | 0,69 |
|  |  |  |  |      |      | 0,2  | 0,06 | 0,47 | 0,15 |
|  |  |  |  |      |      | 0,09 | 0,03 | 0,91 | 0,29 |
|  |  |  |  |      |      | 0,13 | 0,04 | 1,14 | 0,36 |
|  |  |  |  |      |      | 0,35 | 0,11 | 2,23 | 0,71 |
|  |  |  |  |      |      | 0,38 | 0,12 | 1,67 | 0,53 |
|  |  |  |  |      |      | 0,56 | 0,18 | 3,16 | 1    |
|  |  |  |  |      |      | 0,17 | 0,05 | 1,34 | 0,43 |
|  |  |  |  |      |      | 0,1  | 0,03 | 2,18 | 0,69 |
|  |  |  |  |      |      | 0,13 | 0,04 | 1,9  | 0,6  |
|  |  |  |  |      |      | 0,42 | 0,13 | 3,34 | 1,06 |
|  |  |  |  |      |      | 0,39 | 0,12 | 2,47 | 0,78 |
|  |  |  |  |      |      | 0,3  | 0,1  | 2,69 | 0,85 |
|  |  |  |  |      |      | 0,14 | 0,04 | 1,46 | 0,46 |
|  |  |  |  |      |      | 0,12 | 0,04 | 1,31 | 0,42 |
|  |  |  |  |      |      | 0,14 | 0,04 | 1,5  | 0,48 |
|  |  |  |  |      |      | 0,11 | 0,03 | 3,56 | 1,13 |
|  |  |  |  |      |      | 0,11 | 0,03 | 3,64 | 1,16 |
|  |  |  |  |      |      | 0,19 | 0,06 | 2,77 | 0,88 |

|  |  |  |  |  |  |      |      |      |      |
|--|--|--|--|--|--|------|------|------|------|
|  |  |  |  |  |  | 0,25 | 0,08 | 0,68 | 0,22 |
|  |  |  |  |  |  | 0,2  | 0,06 | 1,05 | 0,33 |
|  |  |  |  |  |  | 0,31 | 0,1  | 0,91 | 0,29 |
|  |  |  |  |  |  | 0,81 | 0,26 | 2,74 | 0,87 |
|  |  |  |  |  |  | 0,31 | 0,1  | 1,03 | 0,33 |
|  |  |  |  |  |  | 0,27 | 0,09 | 3,1  | 0,98 |
|  |  |  |  |  |  | 0,1  | 0,03 | 1,16 | 0,37 |
|  |  |  |  |  |  | 0,1  | 0,03 | 0,71 | 0,23 |
|  |  |  |  |  |  | 0,22 | 0,07 | 1,21 | 0,38 |
|  |  |  |  |  |  | 0,41 | 0,13 | 4,13 | 1,31 |
|  |  |  |  |  |  | 0,76 | 0,24 | 1,32 | 0,42 |
|  |  |  |  |  |  | 0,17 | 0,05 | 1,14 | 0,36 |
|  |  |  |  |  |  | 0,13 | 0,04 | 0,94 | 0,3  |
|  |  |  |  |  |  | 0,12 | 0,04 | 0,67 | 0,21 |
|  |  |  |  |  |  | 0,08 | 0,03 | 0,85 | 0,27 |
|  |  |  |  |  |  | 0,42 | 0,13 | 3,9  | 1,24 |
|  |  |  |  |  |  | 0,35 | 0,11 | 1,99 | 0,63 |
|  |  |  |  |  |  | 0,29 | 0,09 | 1,93 | 0,61 |
|  |  |  |  |  |  | 0,13 | 0,04 | 1,29 | 0,41 |
|  |  |  |  |  |  | 0,09 | 0,03 | 1    | 0,32 |
|  |  |  |  |  |  | 0,09 | 0,03 | 0,95 | 0,3  |
|  |  |  |  |  |  | 0,2  | 0,06 | 2,63 | 0,83 |
|  |  |  |  |  |  | 0,11 | 0,03 | 3,02 | 0,96 |
|  |  |  |  |  |  | 0,05 | 0,02 | 0,71 | 0,23 |
|  |  |  |  |  |  | 0,33 | 0,1  | 0,65 | 0,21 |
|  |  |  |  |  |  | 0,19 | 0,06 | 0,58 | 0,18 |
|  |  |  |  |  |  | 0,33 | 0,1  | 0,12 | 0,04 |

**Tab. 16: Rohdaten der Anzahl der Golgistapel (A) und der Vesikel (B). Abkürzungen: n.t., nicht transfiziert.**

| PKD2wt |    | PKD2da |    | PKD2se |    | BON Zellen n. t. (Kontrolle) |    |
|--------|----|--------|----|--------|----|------------------------------|----|
| A      | B  | A      | B  | A      | B  | A                            | B  |
| 7      | 19 | 5      | 18 | 4      | 14 | 5                            | 8  |
| 7      | 10 | 3      | 17 | 3      | 9  | 3                            | 21 |
| 4      | 12 | 4      | 16 | 3      | 9  | 7                            | 11 |
| 4      | 15 | 3      | 22 | 3      | 21 | 4                            | 8  |
| 4      | 18 | 5      | 19 | 1      | 17 | 3                            | 15 |
| 3      | 23 | 3      | 11 | 2      | 13 | 6                            | 33 |
| 4      | 20 | 4      | 12 | 2      | 15 | 4                            | 16 |
| 3      | 7  | 4      | 16 | 4      | 17 | 4                            | 15 |
| 6      | 18 | 5      | 10 | 2      | 19 | 9                            | 31 |
| 3      | 10 | 5      | 21 | 3      | 12 | 4                            | 11 |
| 3      | 10 | 3      | 16 | 4      | 32 | 5                            | 22 |
| 3      | 15 | 4      | 15 | 4      | 10 | 4                            | 26 |
| 4      | 9  | 4      | 11 | 6      | 18 | 5                            | 12 |
| 7      | 18 | 3      | 12 | 4      | 15 | 5                            | 18 |
| 4      | 16 | 3      | 20 | 4      | 12 | 3                            | 22 |
| 3      | 16 | 3      | 31 | 3      | 25 | 4                            | 19 |
| 4      | 30 | 4      | 14 | 5      | 26 | 3                            | 18 |
| 7      | 29 | 6      | 12 | 4      | 22 | 4                            | 21 |
| 6      | 10 | 4      | 17 | 2      | 21 | 4                            | 10 |

## **10. Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Professor Dr. Paul Walther von der Zentralen Einrichtung Elektronenmikroskopie bedanken, der mich während meiner Promotion jederzeit tatkräftig unterstützte, hilfsbereit und ideenreich zur Seite stand und immer Zeit und ein offenes Ohr für all meine Probleme und Fragen hatte. Auch danke ich ihm für die Ermöglichung dieser Arbeit durch Bereitstellung des Themas und den Räumlichkeiten.

Außerdem bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. Götz von Wichert vom Zentrum für Innere Medizin I für die Zweitbetreuung dieser Arbeit, dem Bereitstellen seines Labors und die tatkräftige Unterstützung.

Vielen Dank auch an Herrn Professor Dr. Thomas Seufferlein, von dem viele Denkanstöße ausgingen.

Bedanken möchte ich mich auch ganz besonders bei Jasmine Eismann, Andrea Scheffler, Maren Müller, Michala Sailer, Katharina Höhn, Renate Kunz, Helge Fabritius, Christian Soor, Martin Dass, Andreas Merz, Eberhard Schmid und Reinhard Weih für die immer wieder benötigte Unterstützung und Hilfe bei theoretischen und praktischen Fragen und die sehr gute Atmosphäre im Labor.

Auch danke ich allen anderen Mitarbeitern der Zentralen Einrichtung Elektronenmikroskopie und dem Zentrum für Innere Medizin I, die mir bei akuten Problemen stets hilfreich zur Seite gestanden haben.

Desweiteren möchte ich Christina Heuter danken, die mich immer unterstützt und ermutigt hat.

Schließlich möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern bedanken, die mir mein Studium und meinen gesamten Werdegang ermöglicht haben und mich auch während dieser Arbeit immer wieder aufmunternd unterstützt haben.

## 11. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Geboren am 21.06.1974 in Ulm  
ledig

### Berufstätigkeit

|                   |                                                                                                             |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 09-2008 – heute   | Firma Wala Heilmittel GmbH<br>Junior Mitarbeiter Arzneimittelregistrierung                                  |
| 09/2004 – 07/2008 | <b>Universität Ulm</b><br>Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Zentralen Einrichtung<br>Elektronenmikroskopie |
| 04/1995 – 08/1996 | <b>Firma Nagel Mietservice GmbH, Ulm</b><br>Kaufmännischer Sachbearbeiter                                   |

### Studium und Ausbildung

|                   |                                                                                      |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 10/1998 – 06/2004 | Universität Ulm, Biologiestudium<br>Abschluss: Diplom Biologe                        |
| 09/1996 – 06/1998 | Technische Oberschule, Ulm<br>Abschluss: Fachgebundene Hochschulreife                |
| 08/1991 – 03/1994 | Ausbildung Firma Ernst Nagel KG, Ulm<br>Abschluss: Kaufmann im Groß- und Außenhandel |
| 07/1985 – 07/1991 | Realschule, Erbach<br>Abschluss: Mittlere Reife                                      |
| 07/1981 – 07/1985 | Grund- und Hauptschule, Ulm-Einsingen                                                |

### Wehrdienst

|                   |                                      |
|-------------------|--------------------------------------|
| 04/1994 – 03/1995 | 1. Stabs-/Fernmelderegiment 210, Ulm |
|-------------------|--------------------------------------|