

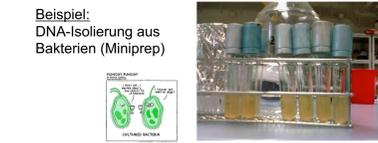
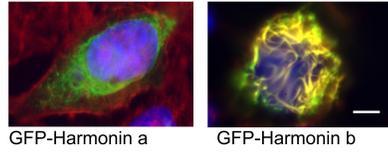
## Modul 10a: Vorlesung: Molekulare Zellbiologie; Seminar: Current Topics in Cell Biology Übungen: Molekulare Zellbiologie I (Versuche A - C):

### Versuch A: Rekombinante Expression von GFP-Proteinen in eukaryotischen Zellen

**Fragestellung:** Beeinflussen Proteinisoformen die Anordnung von Aktinfilamenten?

**Methodik:** Kultivierung und Transfektion von eukaryotischen Zellen

**Beispiel:** Expression von GFP-Harmonin-Isomeren (grün) verändert die Anordnung des Aktinzytoskeletts (rot) – Harmonin b bündelt Aktinfilamente (gelb)



**Vermittelte Methoden:**

- Kultivierung von eukaryotischen Zellen
- Transfektion von eukaryotischen Zellen
- Anfärbung von Zellkompartimenten
- Konfokale Fluoreszenzmikroskopie
- Bildinterpretation
- Bildverarbeitungsverfahren

**2. Molekularbiologie**

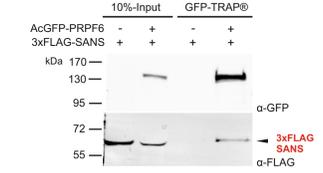
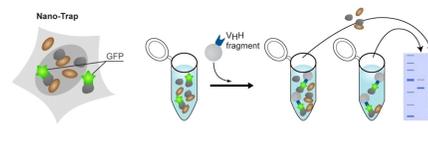
- Transformation von Bakterien
- DNA-Isolierung aus Bakterien
- Restriktionsverdau

### Versuch B: Analyse der Protein-Protein-Interaktion in vitro und in-situ in der Zelle

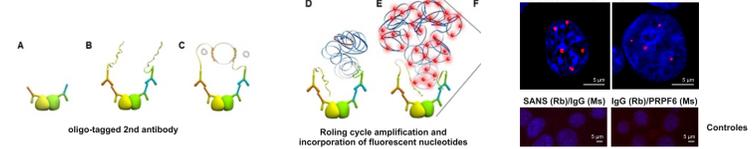
**Fragestellung:** Interagieren zwei Proteine miteinander? Wo in der Zelle geschieht das?

**Methodik:**

a. Co-expression in HEK293 Zellen und in vitro Trap-GFP/RFP Co-Immunpräzipitation



b. Proximity ligation assay (PLA) in HEK293T cells



### Versuch C: Subzelluläre Lokalisation von Molekülen mittels Licht- und Elektronenmikroskopie

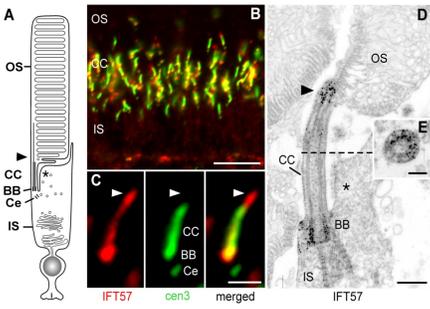
**Fragestellung:** In welchem Kompartiment der Zelle sind Moleküle lokalisiert?

**Methodik:** Immunohistochemische Detektion von Proteinen in Zellen bzw. Gewebeschnitten.

**Vermittelte Methoden:**

- Präparationsverfahren von Gewebe für die Licht- und Elektronenmikroskopie
- Indirekte Immunofluoreszenzmarkierung
- Immunoelektronenmikroskopie (Immuno-Gold-Markierung)
- Konfokale Fluoreszenz- und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)
- Bildinterpretation
- Bildverarbeitungsverfahren

**Beispiel:** Lokalisation von Intraflagellar transport (IFT) Molekülen in Cilien der Photorezeptorzellen der Säugerretina



Sedmak & Wolfrum (2010) J Cell Biol. Sedmak et al. (2009) Methods in Cell Biol.

### Ziele Modul 10a:

- Die Studierenden können in einem wichtigen Teilgebiet der modernen Biologie ein vertieftes Wissen durch Lösen komplexer Aufgaben demonstrieren.
- Sie können Grundkenntnisse in Planung und Design naturwissenschaftlicher Experimente demonstrieren.
- Sie sind in der Lage, unter Anleitung anspruchsvolle biochemische, zell- und molekularbiologische Versuche durchzuführen; die Ergebnisse in strukturelle und funktionale Zusammenhänge zu bringen; die Bedeutung von Kontrollexperimenten sicher einzuschätzen; ein Laborbuch zu führen; die Ergebnisse zu protokollieren und interpretieren.
- Sie sind in der Lage, die Ergebnisse in einem Vortrag zu präsentieren. Bei der Arbeit in Kleingruppen können sie Teamfähigkeit demonstrieren.
- Sie sind in der Lage, die aktuelle Fachliteratur zur Zellbiologie in einem Vortrag in Englischer Sprache zu präsentieren.

## Modul 10b: Fortgeschrittenen-Übungen Molekulare Zellbiologie II: Arbeiten an aktuellen Forschungsprojekten in den Labors der beteiligten Arbeitsgruppen

### Functional analysis of protein networks related to retinal ciliopathies - Wolfrum lab

**Aim:** Understanding sensory cilia function in health and disease.

**Research topics:**

Identification & characterization of novel molecules related to primary sensory cilia

Affinity proteomics, bioinformatics, cell biology tools

Protein networks related to Usher syndrome & other retinal ciliopathies

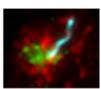
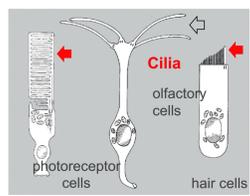
Affinity proteomics, bioinformatics

Protein function, e.g. transport, endocytosis, autophagy, splicing in health & disease.

Toolbox of methods from cell and molecular biology as well as biochemistry and biophysics ...

Evaluation of pathomechanisms in senso-neuronal degenerations  
Cell and animal disease models

Ciliated sensory cells in vertebrates



### Developing gene-based therapies for ocular disorders - Kerstin Nagel-Wolfrum

**Aim:** Develop gene-based therapies for ocular disorders

**Research topics:**

Translational read-through of pathogenic nonsense mutations

Screening of compound libraries for putative novel therapeutics

Functional validation of novel therapeutics in cellular & animal models

Determine off-target effects of novel identified drugs

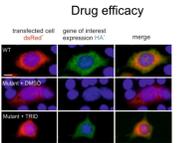
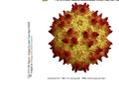
Gene augmentation using adeno-associated virus (AAV)

Subretinal injection in animal models and characterisation of the rescue immunohistochemistry, Western Blot analysis, qPCR, RNAseq

Characterise cellular and animal models for determining drug efficacy & safety  
patient derived fibroblasts, induced pluripotent stem cells, retinal organoids, animal models (USH1C-pig, mice)

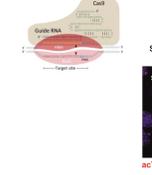


nagelwol@uni-mainz.de

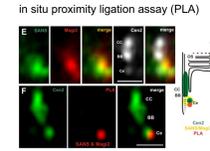


TOOL BOX

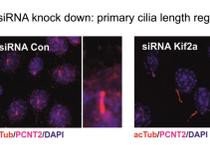
Gene editing by CRISPR-cas9



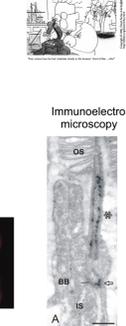
in situ proximity ligation assay (PLA)



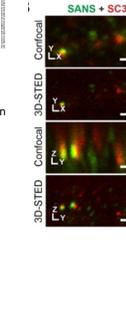
siRNA knock down: primary cilia length regulation



Immunoelectron microscopy



STED microscopy



### Molecular & biochemistry

Gene editing (repair and knock-out)  
Interaction assays (GST-pulldown, GFP/RFP-Trap)  
Omics: RNAseq & affinity proteomics  
Recombinant protein expression (bacteria, cells)

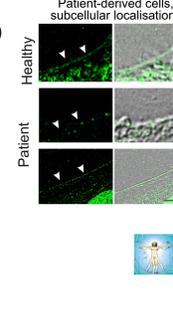
### Microscopy

Light microscopy - fluorescence (STED, Spinning disc, FRAP, FRET...)  
Live cell imaging  
(Immuno)-electronmicroscopy

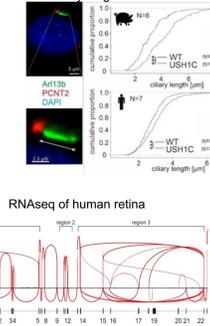
### Models

Eucaryotic cells (HEK293T, HeLa, hTERT-RPE)  
Primary cell culture (fibroblasts, neurons)  
Organotypic cultures  
Animals (USH1C pig, mice)

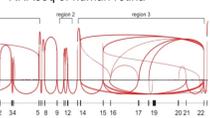
Patient-derived cells, subcellular localisation



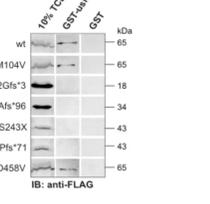
Ciliary length measurement



RNAseq of human retina



TOOL BOX



### Ziele Modul 10b:

- Sie können in einem aktuellen Forschungsprojekt aus dem Gebiet der molekularen Zellbiologie zuverlässige experimentelle Laborarbeit & eine vertieftes Verständnis demonstrieren.
- Sie sind in der Lage, wissenschaftliche Experimente unter Anleitung zu planen, durchzuführen und deren Ergebnisse darzustellen und zu interpretieren.
- Sie können aus selbst recherchierter Fachliteratur extrahierte relevante Arbeitsmethoden vorschlagen und diese unter Anleitung gezielt anwenden.
- Sie sind in der Lage, ein Laborbuch zu führen, die Bedeutung von Kontrollexperimenten zu bewerten und können solche Experimente unter Anleitung entwickeln.
- Sie können die Versuchsergebnisse auswerten sowie sprachlich angemessen formulieren und als Kurzvortrag präsentieren.
- Sie sind in der Lage, die aktuelle Fachliteratur zur Zellbiologie in einem Vortrag in Englischer Sprache zu präsentieren.

## Modul 10c Mol. Zellbio.: Vorlesung: Molekulare Zellbiologie; Seminar: Current Topics in Cell Biol.

- Ziele:**
- Die Studierenden sind in der Lage Fragen Grundkenntnissen in der modernen Zellbiologie zu beantworten.
  - Sie sind in der Lage, die aktuelle Fachliteratur zur Zellbiologie in einem Vortrag in Englischer Sprache zu präsentieren in Englischer Sprache zu präsentieren.