

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Neuroanatomie

Prof. Dr. med. Gabriele M. Rune

Untersuchungen zur Interaktion und subzellulären Lokalisierung der neuronalen Proteine Synaptopodin und AIDA-1

Dissertation

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

vorgelegt von:

Jana Caumanns
aus Hamburg

Hamburg 2013

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 03.12.2013**

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/ die Vorsitzende: PD Dr. rer. nat. E. Mohr

Prüfungsausschuss, zweite/r GutachterIn: PD Dr. rer. nat. S. Kindler

Prüfungsausschuss, dritte/r GutachterIn: PD Dr. med. C. Meyer-Schwesinger

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG	6
I.1 NERVENGEWEBE	7
I.2 DIE SYNAPSE	7
I.2.1 Ultrastruktur der chemischen Synapse.....	8
I.3 SYNAPTISCHE PLASTIZITÄT	9
I.3.1 Langzeitpotenzierung (<i>long term potentiation</i> , LTP).....	9
I.4 DER SPINE-APPARAT	10
I.5 SYNAPTOPODIN, EIN ACTIN-BINDENDES, PROLINREICHES PROTEIN DER SYNAPSE	12
I.5.1 Molekulare Struktur und Expression.....	12
I.5.2 Funktion von Synpatopodin	15
I.6 AIDA-1-39.1, EIN NEUES MITGLIED DER AIDA-FAMILIE	16
I.6.1 Molekulare Struktur und Expression von AIDA-1-39.1	16
I.6.2 Funktion der AIDA-Proteine.....	19
I.7 FRAGESTELLUNG.....	21
II. MATERIAL UND METHODEN	22
II.1 MATERIAL	22
II.1.1 Produkte und Lösungen für Gele und Western Blots.....	22
II.1.1a) Lösungen.....	22
II.1.2b) Sonstige Produkte für Western Blots	23
II.1.2 Produkte und Lösungen für Fixierung und Immuncytochemie.....	24
II.1.2a) Lösungen.....	24
II.1.2b) Sonstige Produkte für die Immunzytochemie.....	24
II.1.3 Produkte und Lösungen für (Ko-) Immunpräzipitationen	24
II.1.3a) Lösungen.....	24
II.1.3b) Sonstige Produkte für die Ko-Immunpräzipitation.....	25

II.1.4 Medien für die Bakterienkultur	25
II.1.5 Produkte, Lösungen und Medien für die Hefekultur.....	26
II.1.5a) Medien, 1000ml	26
II.1.5b) Lösungen, 100ml	26
II.1.5c) Sonstige Produkte für die Hefekultur	27
II.1.6 Produkte, Lösungen und Medien für die Kultur etablierter Zelllinien.....	27
II.1.6a) Lösungen.....	27
II.1.6b) Medien.....	27
II.1.6c) Sonstige Produkte für die Kultur etablierter Zelllinien	28
II.1.7 Produkte, Lösungen und Medien für die Neuronenkultur	28
II.1.8 Bakterienstämme.....	28
II.1.9 Hefestämme	28
II.1.10 Eukaryontische Zelllinien und Gewebe.....	28
II.1.11 Antibiotika	29
II.1.12 Enzyme	29
II.1.12a) Restriktionsendonukleasen.....	29
II.1.12b) Sonstige Enzyme	29
II.1.13 Antikörper	30
II.1.13a) Tabelle II.1: Primäre Antikörper	30
II.1.13b) Tabelle II.2: Sekundäre Antikörper	30
II.1.14 DNA-Konstrukte.....	31
II.1.14a) Tabelle II.3: Durch PCR generierte DNA-Konstrukte	31
II.1.14b) Tabelle II.4: Durch Umklonieren generierte DNA-Konstrukte.....	32
II.1.15 Tabelle II.5: Oligonukleotide	32
II.1.16 Plasmide.....	33
II.1.17 Längenstandards.....	34
II.1.18 Fertigsysteme	34

II.1.19 Geräte	34
II.1.19a) Elektrophoresekammern.....	35
II.1.19b) Zentrifugen.....	35
II.1.20 Software	35
II.1.21 Sonstiges.....	35
II.2 METHODEN	36
II.2.1 DNA.....	36
II.2.1a) Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	36
II.2.1b) Reinigung von PCR-Produkten.....	36
II.2.1c) DNA-Gelelektrophorese	36
II.2.1d) Restriktion von DNA	37
II.2.1e) Ligation von DNA-Fragmenten	37
II.2.1f) Transformation von Bakterien.....	37
II.2.1g) DNA-Isolierung	38
II.2.1h) DNA-Sequenzierung.....	38
II.2.2 Protein	38
II.2.2a) Herstellung von Proteinextrakten aus eukaryontischen Zelllinien	38
II.2.2b) Bestimmung der Proteinkonzentration	39
II.2.2c) Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	39
II.2.2d) Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen.....	39
II.2.2e) Detektion von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen mit Hilfe von Antikörpern („Western Blot“)	40
II.2.2f) Immunpräzipitation	40
II.2.3 Eukaryontische Zellkultur	42
II.2.3a) Kultivierung von Zellen	42
II.2.3b) Transfektion von HEK 293-Zellen mit <i>Fugene HD</i>	43

II.2.3c) Transfektion von COS 7- Zellen mit <i>Fugene 6</i>	43
II.2.3d) Kultivierung und Transfektion von Hippocampus-Neuronen.....	43
II.2.3e) Fixierung und Permeabilisierung von Zellen auf Deckgläschen.....	43
II.2.3f) Immuncytochemie.....	44
II.2.4 Detektion von Protein-Protein-Interaktionen mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid- Systems (<i>yeast-two-hybrid</i> , YTH).....	44
II.2.4a) Kultivierung von Hefezellen	47
II.2.4b) Transformation von Hefezellen	47
II.2.4c) Verpaarung von Hefezellen	48
III. ERGEBNISSE	50
III.1 CHARAKTERISIERUNG VON AIDA-1-39.1	50
III.2 IMMUNCYTOCHEMISCHE ANALYSEN ZUR SUBZELLULÄREN LOKALISATION VON AIDA-1-39.1.....	53
III.2.1 Expression von AIDA-1-39.1 in der eukaryontischen Zelllinie HEK 293 ..	53
III.2.2 Expression von AIDA-1-39.1 in kultivierten Hippocampus-Neuronen der Ratte.....	54
III.2.3 Charakterisierung der Targetingsequenzen von AIDA-1-39.1, die für die subzelluläre Lokalisation des Proteins erforderlich sein könnten	55
III.3 UNTERSUCHUNGEN ZUR INTERAKTION VON SYNAPTOPODIN MIT AIDA 1-39.1	60
III.3.1 Interaktion von Synaptopodin und AIDA-1-39.1. in Hefezellen.....	60
III.3.1a) Bestätigung der Interaktion durch Verpaarung	60
III.3.1b) Charakterisierung der Interaktion zwischen Synaptopodin und AIDA- 1-39.1.....	61
III.3.2 Lokalisation von Synaptopodin und AIDA-39.1 in der postsynaptischen Dichte von hippocampalen Neuronen der Ratte (Western Blot-Analyse)	67
III.3.3 Ko-Lokalisation von Synaptopodin und AIDA-1-39.1 in eukaryontischen Zelllinien	70

III.3.3a) Subzelluläre Verteilung von Synaptopodin und AIDA-1-39.1 in HEK- und COS-Zellen	70
III.3.3b) Ko-Expression von Synaptopodin und AIDA-1-39.1 in HEK- und COS-Zellen	70
III.3.4 Ko-Lokalisation von Synaptopodin und AIDA-1-39.1 in Hippocampus-Neuronen.....	73
III.3.5 Ko-Immunpräzipitationen zur Untersuchung der Interaktion zwischen Synaptopodin und AIDA-1-39.1	75
III.4. CHARAKTERISIERUNG DER SEQUENZEN VON SYNAPTOPODIN-SHORT, DIE FÜR DIE LOKALISATION IN DENDRITISCHEN DORNEN ERFORDERLICH SIND	75
IV. DISKUSSION	79
IV.1 CHARAKTERISIERUNG VON AIDA-1-39.1	79
IV.2 UNTERSUCHUNGEN ZUR INTERAKTION VON AIDA-1-39.1 MIT SYNAPTOPODIN	82
IV.3 CHARAKTERISIERUNG DER SEQUENZEN VON SYNAPTOPODIN-SHORT, DIE FÜR DIE LOKALISATION IN DENDRITEN UND DENDRITISCHE DORNEN ERFORDERLICH SIND	83
IV.4 AUSBLICK.....	85
V. ZUSAMMENFASSUNG	87
VI. LITERATURVERZEICHNIS	89
VII. ANHANG.....	100
Abkürzungsverzeichnis	100
Abbildungsverzeichnis	103
Tabellenverzeichnis	105
Herstellernachweis.....	106
Danksagung.....	108
Lebenslauf	109
Eidesstattliche Erklärung.....	111

I. EINLEITUNG

Das zentrale Nervensystem (ZNS) des Menschen besteht aus Gehirn und Rückenmark. Es bildet das Zentrum menschlichen Denkens und Handelns und steuert alle Funktionen des Körpers: Vom kontinuierlichen Herzschlag über einfache motorische Vorgänge, über die Bildung von Emotion und Trieb bis hin zu hochkomplexen Denkvorgängen.

Makroskopisch und funktionell lässt sich das Gehirn in 3 Teile gliedern: das Vorderhirn, bestehend aus Groß- und Zwischenhirn, das Kleinhirn und den Hirnstamm. Das Großhirn (Telencephalon) mit seinen beiden Hälften (Hemisphären) bildet das Zentrum des Bewusstseins. Es ist der entwicklungsgeschichtlich jüngste Teil des Gehirns. Hier entstehen Gedanken, und es werden Handlungen geplant. Sinneseindrücke werden verarbeitet und bewertet. Ein Teil des Großhirns, der Hippocampus, ist an Lernvorgängen und an der Bildung von Gedächtnis beteiligt.

Der zweite Teil des Vorderhirns, das Zwischenhirn (Diencephalon), ist am ehesten als eine Art „Schaltzentrale“ des Gehirns zu verstehen. Hier werden Sinneseindrücke weitergeleitet und das vegetative Nervensystem gesteuert. Dazu gehören z.B. die Bildung und Ausschüttung von Hormonen, die Körperfunktionen regulieren, sowie die Steuerung des Schlaf-Wach-Rhythmus und der Schmerz- und Temperaturempfindung. Das Kleinhirn (Cerebellum) besteht wie das Großhirn aus zwei Hemisphären. Es befindet sich an der Hirnbasis und ist maßgeblich für Gleichgewicht und Koordination verantwortlich. Im Gegensatz zum Großhirn gehört es zu den entwicklungsgeschichtlich alten Hirnteilen. Der Hirnstamm bildet die Verbindung zwischen Hirn und Rückenmark. Hier befindet sich das Atemzentrum, zudem werden basale Reflexe wie Schluck- und Hustenreflex gesteuert

(Silbernagl und Despopoulos 2003). Die enorme Leistung des Nervensystems, ständig neue Informationen aufzunehmen und zu bewerten, Gedächtnis zu bilden und Neues zu lernen sowie irrelevante Informationen zu „löschen“, setzt die Fähigkeit voraus, sich kontinuierlich nicht nur biochemisch, sondern auch strukturell verändern zu können. Diese Veränderungen finden an den schätzungsweise 100 Milliarden Nervenzellen und den dazugehörigen 100 Billionen neuronalen Verbindungsstellen, die Sherrington 1897 erstmals „Synapsen“ nannte, statt (Sherrington 1897;

Song et al. 2009). Die synaptischen Verbindungen befinden sich, abhängig von der Aktivität des Systems, im ständigen Wandel, es werden neue Verbindungen geschaffen und bestehende stabilisiert. Andere Synapsen verschwinden. Diese aktivitätsabhängigen Veränderungen sind noch weitestgehend unverstanden.

Ist die normale Funktion der synaptischen Verbindung gestört, resultiert dies regelmäßig in neuropsychologischen Erkrankungen wie zum Beispiel M. Alzheimer oder Schizophrenie. Deshalb ist es Gegenstand intensiver Forschung, das zentrale Nervensystem mit seinen Bestandteilen und Signalwegen besser zu verstehen.

I.1 NERVENGEWEBE

Das Gewebe des zentralen Nervensystems besteht aus Nerven- und Gliazellen. Die verschiedenen Gliazelltypen sind zwar nicht direkt an der Signalübertragung beteiligt, aber unerlässlich für die Funktion des Nervensystems. Sie haben mechanische und metabolische Funktionen oder dienen als Hüllzellen bestimmter Strukturen (z.B. Myelinscheidenbildung, Auskleidung der Liquorräume). Nervenzellen hingegen dienen ausschließlich der Signalübertragung. Eine Nervenzelle (Neuron) besteht aus dem Zellkörper (Perikaryon), einem Axon und meist mehreren, baumartig verzweigten Dendriten. Sie ist in den meisten Fällen von einer Art Isolierschicht, der Myelinscheide, umkleidet, wodurch die Signalübertragung um ein Vielfaches beschleunigt wird (Lüllmann-Rauch 2003).

I.2 DIE SYNAPSE

Die Verbindungsstelle zwischen zwei Nervenzellen ist die Synapse. Der präsynaptische Teil dieser Verbindungsstelle wird durch den terminalen Teil des Axons, den Bouton, gebildet. Das Axon des Neurons leitet einen elektrischen Impuls in Form eines Aktionspotentials an die Präsynapse, wo es daraufhin zur Erhöhung der axoplasmatischen Calciumkonzentration kommt. Dies führt zur Exozytose präsynaptischer Vesikel in den synaptischen Spalt. Das Axon bildet also den efferenten Teil des Informationsflusses. Der Dendrit einer Nervenzelle, die einen Reiz empfängt, bildet den afferenten Teil des Informationsflusses. Die postsynaptische Membran

depolarisiert; dies geschieht bei exzitatorischem, d.h. erregendem, Reiz überwiegend über die Bindung des Neurotransmitters Glutamat, der aus präsynaptischen Vesikeln freigesetzt wird und an postsynaptische Rezeptoren bindet. Bei inhibitorischem, d.h. hemmendem, Reiz werden die Neurotransmitter GABA (Gamma-Amino-Buttersäure) und Glycin freigesetzt und an Rezeptoren der postsynaptischen Membran gebunden. Exzitatorische Synapsen werden aufgrund der im Vergleich zur präsynaptischen dickeren postsynaptischen Membran als asymmetrisch bezeichnet, inhibitorische *vice versa* als symmetrisch (Colonnier 1968). Eine Nervenzelle hat, je nach Größe ihres Dendritenbaums, über mehrere Hundert bis Hunderttausende von Synapsen Kontakt zu Axonen anderer Zellen. Zusätzlich zu der beschriebenen chemischen Synapse kommen im ZNS zu weitaus kleineren Teilen die phylogenetisch älteren elektrischen Synapsen vor, die direkte Zell-Zell-Verbindungen in Form von ionenleitfähigen Kanälen darstellen (Lüllmann-Rauch 2003; Trepel 2008).

I.2.1 Ultrastruktur der chemischen Synapse

Elektronenmikroskopisch ist die präsynaptische Seite einer Synapse, die aktive Zone, an den synaptischen Vesikeln, die eine Größe von jeweils etwa 40 nm haben, zu erkennen. Der synaptische Spalt ist etwa 20-24 nm breit. An der postsynaptischen Membran befindet sich die elektronendichte postsynaptische Dichte (*postsynaptic density*, PSD). Die PSD ist ein 200-800 nm breiter, 30-50 nm dicker Komplex von Proteinen, die an der postsynaptischen Aktivität und der synaptischen Plastizität beteiligt sind. Hierzu gehören -zum größten Teil glutamaterge- Rezeptoren, Ionenkanäle, Adhäsionsmoleküle und Enzyme, die an Gerüstproteine gebunden vorliegen. Ein biochemischer Marker für die PSD ist das Gerüstprotein *postsynaptic density*-Protein 95 (PSD-95; Peng et al. 2004; Sheng und Hoogenrad 2007). Die meisten Hauptneurone des Gehirns, z.B. die Pyramidenzellen von Großhirnrinde (Cortex) und Hippocampus, besitzen an ihren Dendriten pro μm zwischen einem und zehn dendritische Dornen (sogenannte *spines*), etwa 0,5-2 μm lange Ausbuchtungen, an deren Enden (*heads*) sich die synaptische Kontaktzone mit einem Actin-Cytoskelett, der PSD und anderen Organellen befindet. Der dendritische Dorn wurde erstmals von Cajal et al. beschrieben (1888) und ist über eine schmale Verbindung, dem Dornenhals, mit dem dendritischen Schaft verbunden (Harris und Kater 1994; Nimchinsky et al. 2002;

Sheng und Hoogenrad 2007). Morphologisch werden sie nach ihrer Form in dünn (*thin*), kurz (*stubby*), verzweigt (*branched*) und pilzförmig (*mushroom-shaped*) eingeteilt, wobei an reifen Synapsen meist die pilzförmigen Dornen vorkommen. Dendritische Dornen sind hochdynamisch, sie verändern sich in Zahl, Größe und Struktur aktivitätsabhängig, d.h. abhängig von der Aktivität an der Präsynapse, von hormonellen und anatomischen Veränderungen (Valverde 1967; Frotscher et al. 1977; Kretz et al. 2004). Deshalb wird ihnen eine besondere Bedeutung für Lernen und Gedächtnisbildung zugesprochen; sie sind sozusagen Korrelat für aktivitätsabhängige Veränderungen an neuronalen Verbindungen im Gehirn.

I.3 SYNAPTISCHE PLASTIZITÄT

Abhängig von der Aktivität an der Synapse können Zellen die Stärke der synaptischen Verbindung modulieren und dendritische Dornen sich mit all ihren Komponenten in ihren morphologischen Eigenschaften und ihrer Motilität verändern. Es können außerdem neue Verbindungen geschaffen und bestehende eliminiert werden. Auf diesem Phänomen, das man synaptische Plastizität nennt, beruhen jegliche Lernprozesse sowie die Speicherung von neuen Gedächtnisinhalten (Hughes 1958). Die molekularen Mechanismen, die diesen Vorgängen zugrunde liegen, sind Gegenstand intensiver Forschung.

I.3.1 Langzeitpotenzierung (*long term potentiation*, LTP)

Ein neurophysiologisches Modell, mit dem man Lernen und Gedächtnisbildung veranschaulichen kann, ist die Langzeitpotenzierung (*long-term potentiation*, LTP). Hierunter versteht man eine nach wiederholter Reizung bis zu tagelang anhaltende Verstärkung synaptischer Verbindungen (Bliss und Collingridge 1993; Lømo 2003; Cooke und Bliss 2006).

Die Erregung der postsynaptischen Membran durch Freisetzung von Glutamat in den synaptischen Spalt führt zur Aktivierung von AMPA (Alpha-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionsäure)-Rezeptoren und zum schnellen Natrium-Einstrom. Die postsynaptische Membran wird depolarisiert. Durch wiederholte Aktivierung von postsynaptischen AMPA-Rezeptoren im hochfrequenten Bereich kommt es zur Akti-

vierung von NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptoren (das den Rezeptor blockierende Magnesium-Ion diffundiert ab). Der langsame Calcium-Einstrom führt zu einer Erhöhung der cytosolischen Calcium-Konzentration. Calcium aktiviert die Proteinkinase C und bildet mit Calmodulin einen Komplex, der die CaM-Kinase II (Calcium-abhängige Proteinkinase II) durch Autophosphorylierung aktiviert. Dies führt, ebenfalls über Phosphorylierung, zur Erhöhung der Leitfähigkeit von bestehenden AMPA-Rezeptoren und zum vermehrten Einbau von glutamatergen AMPA- und Kainat-Rezeptoren, sowie langfristig zu physikalischem Wachstum der dendritischen Dornen (Silbernagl und Despopoulos 2003).

Ein solcher Vorgang kann kurz-, mittel- und langfristige Veränderungen zur Folge haben; somit wird die Langzeitpotenzierung in LTP 1, 2, oder 3, oder Früh- (*early*, E), Mittel- (*intermediate*- I) und Spät- (*late* –L) LTP eingeteilt.

LTP 1 ist eine kurzfristige Form der Potenzierung, die circa eine Stunde anhält und unabhängig von Proteinbiosynthese ist, das heißt zur Aufrechterhaltung genügen kovalente Modifikationen bereits bestehender synaptischer Proteine. LTP 2 ist ein langsamer abfallendes Potenzial (1-3 Stunden), das die Translation bereits bestehender mRNAs (*messenger RNAs*) erfordert. LTP 3, die zu einer langfristigen Veränderung führende Form der Potenzierung, benötigt schließlich Transkription und Translation (Nguyen et al. 1994; Stephani 2001; Vickers et al. 2005; Reymann et al. 2006).

Hierzu werden Kommunikationswege zwischen Synapse und Zellkern benötigt. Doch welche genauen biochemischen Prozesse sind für diese Veränderungen an der Synapse verantwortlich, wie werden sie gesteuert, das heißt verstärkt oder auch inhibiert? Nach der aktuellen Datenlage scheint der PSD eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion an zentralen exzitatorischen Synapsen zuzukommen. Die PSD wird durch Hunderte von Proteinen gebildet; die Funktionen vieler dieser Proteine sind zu einem großen Teil jedoch noch unbekannt (Peng et al. 2004; Sheng und Hoogenrad 2007).

I.4 DER SPINE-APPARAT

Der Spine-Apparat wurde erstmals 1959 beschrieben (Gray). Er kommt in einer Subpopulation der Dornen von Dendriten telencephaler Strukturen, nämlich dem Cortex,

Bulbus olfactorius und Hippocampus, vor (Mundel et al. 1997; Deller et al. 2000, 2003). Am Häufigsten finden sich Spine-Apparate in den Dornenhälsen von ausdifferenzierten, pilzförmigen dendritischen Dornen. Spacek und Harris (1997) wiesen in 80% der pilzförmigen dendritischen Dornen der CA-1-Region des Hippocampus Spine-Apparate nach, durchschnittlich tragen im Hippocampus 20% der dendritischen Dornen Spine-Apparate (Deller et al. 2003). Der Spine-Apparat besteht aus Zisternen von regional spezialisiertem, glattem endoplasmatischem Retikulum, zwischen denen sich elektronendichtes Material befindet (Spacek 1985; Spacek und Harris 1997). Er ist mit verschiedenen Proteinen assoziiert. Dazu gehören unter anderem F-Actin, α -Actinin und Synaptopodin (Cohen et al. 1985; Wyszynski et al. 1998.; Deller et al. 2000a), das essentiell zur Bildung des Spine-Apparates ist (Deller et al. 2003). Dies konnte mithilfe von Experimenten mit Synaptopodin-defizienten Mäusen, in denen das Synaptopodin-Gen homozygot deletiert ist, gezeigt werden. Die Gehirne dieser Tiere waren lichtmikroskopisch unauffällig, elektronenmikroskopisch wiesen die Neurone jedoch ein komplettes Fehlen des Spine-Apparates auf (Deller et al. 2003). Synaptopodin-defiziente Mäuse zeigten zudem Defizite in der Langzeitpotenzierung, sowohl in der frühen als auch in der späten LTP, *in vitro* (Deller et al. 2003) und *in vivo* (Jedlicka et al. 2009). Verhaltensstudien ergaben bei den Tieren Defizite im räumlichen Denken, vor allem was längerfristiges Lernen und das Gedächtnis im Raum anbetraf (Deller et al. 2003). Passend dazu konnte eine vermehrte Gen-Expression und ein vermehrtes Vorkommen von Synaptopodin als Folge von Langzeit-Potenzierung beobachtet werden (Matsuo et al. 1998, 2000; Yamazaki et al. 2001).

Die genaue Rolle des Spine-Apparates in dieser Hinsicht und insbesondere die Vorgänge auf zellulärer Ebene sind jedoch noch immer weitestgehend unbekannt. Einige Arbeitsgruppen (Golding und Segal 2003; Mc Carthy et al. 2003) postulierten, dass er in lokale Translation dendritischer mRNA und den Transport lokal synthetisierter Proteine involviert sein könnte.

Fifkova et al. (1983) nahmen für den Spine-Apparat eine Funktion als Ort der lokalen Calcium-Speicherung im dendritischen Dorn an. Eine Verbindung zwischen der immer wieder angenommenen Rolle für die lokale Calcium-Homöostase (Fifkova 1985; Segal 1995, 2005) an dendritischen Dornen und der gezeigten Bedeutung für zelluläre Veränderungen, die synaptische Plastizität bedingen und *in vivo* Voraussetzung

für bestimmte Lernvorgänge zu sein scheinen, könnten die Experimente von Vlachos et al. (2009, 2011) zeigen. Diese geben Hinweise dafür, dass das im Spine-Apparat gespeicherte Calcium im direkten Zusammenhang mit aktivitätsabhängigen Veränderungen an der Synapse stehen könnte. Die Versuche zeigten, dass die Assoziation von Synaptopodin mit Calcium-Speichern des Spine-Apparates zu einer vermehrten Freisetzung von Glutamat und in der Folge zu einer verstärkten Akkumulation glutamaterger (GluR1) AMPA-Rezeptoren an exzitatorischen Synapsen führte und synaptische Verbindungen somit stärkte. Die vermehrte Ausschüttung von Glutamat beruht auf der Funktionsfähigkeit eines Calcium-abhängigen Ryanodin-Rezeptors (RyR). Interessanterweise konnte auch eine Calcium-abhängige Abschwächung synaptischer Verbindungen über einen Inositol-Triphosphat-Rezeptor (IP3R) gezeigt werden (Vlachos et al. 2009; Holbro et al. 2009).

Diese Ergebnisse könnten auf eine entscheidende Rolle des Spine-Apparates in Verbindung mit dem synaptischen Protein Synaptopodin für Langzeitpotenzierung (LTP) und synaptische Plastizität hinweisen (Vlachos et al. 2009; Vlachos 2011).

I.5 SYNAPTOPODIN, EIN ACTIN-BINDENDEN, PROLINREICHES PROTEIN DER SYNAPSE

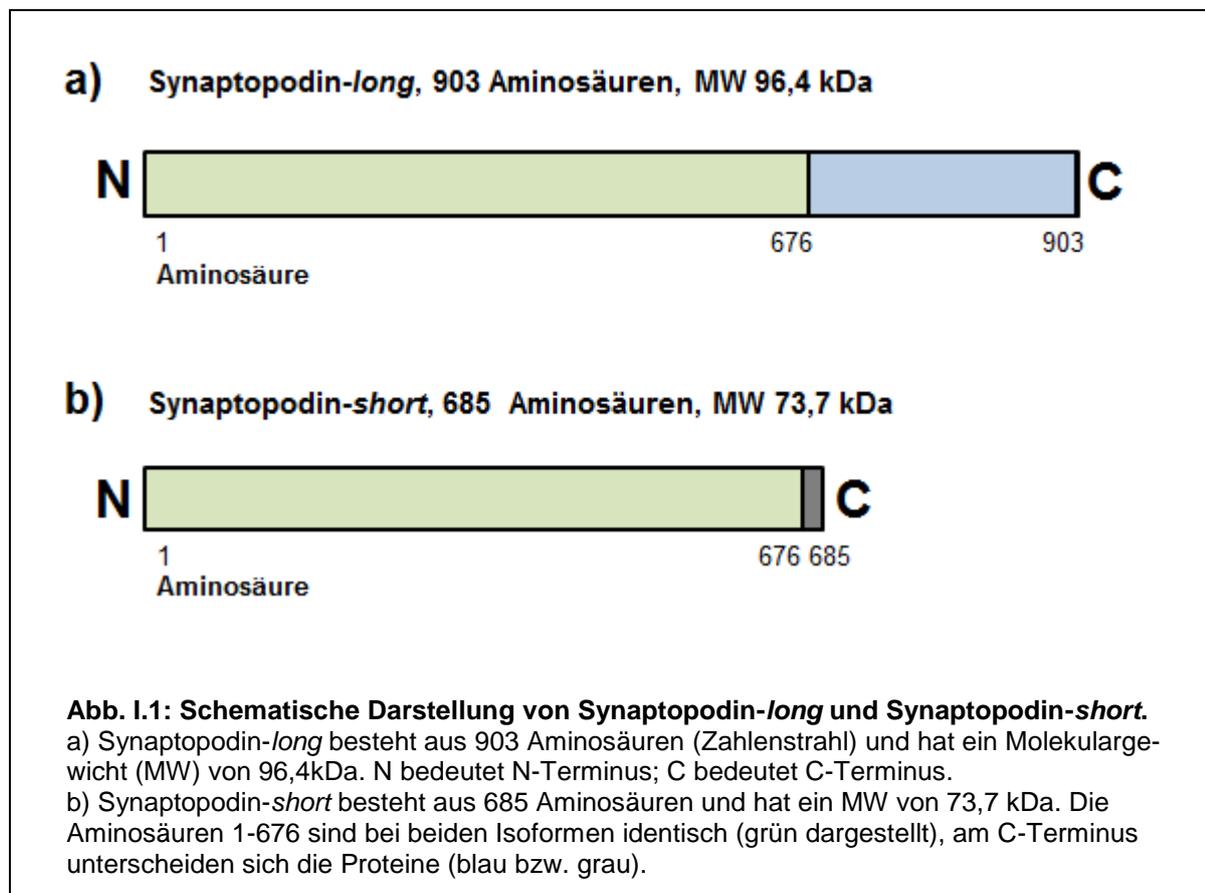
I.5.1 Molekulare Struktur und Expression

Synaptopodin, charakterisiert durch Mundel et al. (1997), ist ein Actin-assoziiertes Protein, das in dendritischen Dornen von Nervenzellen und in Podozyten der Niere vorkommt. Durch *in-situ*-Hybridisierung konnte Synaptopodin mRNA im Gehirn im Bulbus olfactorius, Cortex, Striatum und Hippocampus -also ausschließlich in Strukturen des Vorderhirns- nachgewiesen werden. Es ist ein Prolin-reiches Protein (etwa 20%), weshalb es wahrscheinlich keine globuläre Struktur annehmen kann und in gestreckter Form vorliegt (Mundel et al. 1997).

Das Synaptopodin-Gen der Maus enthält drei Exons. Es kommen zwei mRNAs vor. Durch alternatives Spleißen und differentielle Polyadenylierung werden drei Isoformen des Proteins kodiert: Die lange Form (*Synpo-long*) besteht aus 903 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 96,4 kDa (Kilodalton). Die kurze Form (*Synpo-short*) besteht aus 685 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 73,7 kDa. Die

Aminosäuren 1-676 der beiden Isoformen sind jeweils identisch. Zusätzlich wurde noch eine weitere Isoform (Synpo-T) mit 188 Aminosäuren isoliert (Asanuma et al. 2005).

Auf DNA-Ebene hat das Synaptopodin-Gen der Maus im Vergleich zu dem des Menschen eine Ähnlichkeit von 77,3%, auf Protein-Ebene besteht eine Ähnlichkeit von 81,3% (Mundel et al. 1997). Eine schematische Darstellung von Synaptopodin-*long* und -*short* zeigt Abb. II.1.



Laut Asanuma et al. (2005) kommt die lange Form des Synaptopodin (*Synpo-long*) in Podozyten der Niere und die kurze Form (*Synpo-short*) im Gehirn vor. Dieser Befund wird jedoch kontrovers diskutiert. Kremerskothen et al. (2005) postulierten, dass ausschließlich die lange Form im Gehirn vorkommt und dass es sich bei der kurzen Form um eine inkomplette Sequenz in der Datenbank handelt. Die Arbeitsgruppe Mohr konnte in Western Blot-Analysen, durch *real-time* PCR und *in-situ*-Hybridisierung die Existenz von sowohl der langen als auch der kurzen Form im Gehirn der Ratte zeigen, überwiegend kam in diesen Experimenten hier jedoch Synaptopodin short vor (PD Dr. rer. nat. E. Mohr, Institut für Neuroanatomie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, unveröffentlichte Daten).

Synaptopodin verfügt über mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen, unter anderem für die Proteinkinase C, und zwei PPXY-Motive (P steht für Prolin, X für eine beliebige Aminosäure, Y für Tyrosin), die das Protein dazu befähigen könnten, mit WW-Domänen bestimmter anderer Proteine zu interagieren (Einbound und Sudol 1996). WW-Domänen -bezeichnet nach 2 konservierten Tryptophanresten (W)- sind etwa 30-40 Aminosäuren umfassende Proteindomänen, die durch Bindung an prolinreiche Sequenzen Protein-Protein-Wechselwirkungen vermitteln. Im zentralen Nervensystem sind Proteine mit WW-Domänen die der MAGI-Familie (Membran-assoziierte Guanylat-Kinasen mit invertierter Orientierung). Diese sind involviert in Neurotransmission und synaptische Plastizität (Xu et al. 2001). Unter anderem finden sich diese WW-Domänen zudem in Proteinen des postsynaptischen Cytoskeletts (Bork und Sudol 1994).

Die Expression von Synaptopodin während der postnatalen Entwicklung in Neuronen des Hippocampus von Ratten wurde von Czarnecki et al. durch immunhistochemische Analysen untersucht (Czarnecki et al. 2005). Synaptopodin wurde zum Zeitpunkt der Geburt bereits in Pyramidenzellen der CA3- (von Cornu ammonis; Ammonshorn) Regionen exprimiert, am 6. postnatalen Tag konnte es bereits in CA1-Pyramidenzellen nachgewiesen werden. Am neunten Tag war die Verteilung von Synaptopodin bereits in fast allen Hauptneuronen nachweisbar, wobei die mRNA-Expression zu allen Zeitpunkten in der CA3-Region am stärksten war. Die Expression war zu diesem Zeitpunkt nahezu genauso hoch wie im Hippocampus einer ausgewachsenen Ratte. Hier war die Synaptopodin-Expression auf mRNA-Ebene am

stärksten in den Hauptneuronen, außerdem in Mooszellen und einigen Interneuronen des Stratum lucidum (Deller et al. 2000; Deller et al. 2002; Bas Orth et al. 2005; Czarnecki et al. 2005). Synaptopodin scheint somit erst in einer späten neuronalen Entwicklungsphase, in der die Differenzierung der dendritischen Dornen stattfindet, exprimiert zu werden, um dann in erwachsenen hippocampalen Neuronen weiterzubestehen (Deller et al. 2006).

I.5.2 Funktion von Synpatopodin

Wie im vorigen Abschnitt beschrieben, scheint Synaptopodin über seine Bedeutung für den Spine-Apparat und Bildung und Aufrechterhaltung von LTP in synaptische Plastizität und aktivitätsabhängige Veränderungen an der Synapse involviert zu sein (Deller et al. 2003, Jedlicka et al 2009).

Die synaptische Plastizität, also die Fähigkeit neuronaler Strukturen, neue Verbindungen zu knüpfen und Verbindungen langfristig zu stabilisieren, hängt zudem von der Motilität des Spines ab. Für die Funktion von Synaptopodin im Rahmen der Spine-Motilität und Formierung des Spine-Apparates könnte seine Assoziation mit den Proteinen Actin und α -Actinin von Bedeutung sein (Mundel et al. 1997; Asanuma et al. 2005; Kremerskothen et al. 2005). Kremerskothen et al. haben gezeigt, dass Synaptopodin über eine Actin- und eine α -Actinin-Bindungsstelle verfügt und somit die Bindung der beiden Proteine stabilisiert. Die Interaktion von Synaptopodin mit α -Actinin-2 resultierte *in vitro* in einer Elongation von Actinfilamenten und der parallelen Anordnung von Actinfasern. Passend hierzu haben weitere Studien einen Zusammenhang zwischen Synaptopodin und der Vergrößerung von dendritischen Dornen gezeigt (Okubo-Suzuki et al. 2008; Vlachos et al. 2009). Synaptopodin könnte also durch Regulierung des Cytoskeletts einen entscheidenden Beitrag zur Spine-Motilität und -Morphologie leisten (Mundel et al. 1997; Kremerskothen et al. 2005; Okubo-Suzuki et al. 2008; Vlachos et al. 2009).

Zudem ist es essentieller Bestandteil des Spine-Apparates, der mit seiner Rolle in der lokalen Calcium-Homöostase ebenfalls Einfluss auf aktivitätsabhängige Veränderungen an der Synapse und somit auf die synaptische Plastizität haben könnte (Holbro et al. 2009; Vlachos et al. 2009; Vlachos 2011). Synaptopodin scheint an der

Steuerung der lokalen Calcium-Freisetzung direkt beteiligt zu sein (Kokortian und Segal 2011).

Um mehr über die Funktion von Synaptopodin herauszufinden, wurden potentielle Interaktionspartner des Proteins gesucht (B. Meyer-Hiemer, Institut für Neuroanatomie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, AG Mohr, Dissertation in Vorbereitung). Hierzu wurde das Hefe-2-Hybrid-System (*yeast-two-hybrid*; YTH) verwendet. Das YTH-System wird genutzt, um mögliche Interaktionspartner für ein Protein zu identifizieren bzw. Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vivo* zu untersuchen (Fields und Song 1989).

I.6 AIDA-1-39.1, EIN NEUES MITGLIED DER AIDA-FAMILIE

Die YTH-Experimente zeigten eine Interaktion von Synaptopodin mit einer bisher nicht beschriebenen Form des *Amyloid- β Protein Precursor Intracellular Domain-associated Protein-1* (AIDA-1) (B. Meyer-Hiemer, Institut für Neuroanatomie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, AG Mohr, Dissertation in Vorbereitung). Von mehr als 100 Klonen codierten über 30% für diese Isoform. Die identifizierte Sequenz kodiert für eine am N-terminalen Ende unvollständige Isoform und wird im Folgenden AIDA-1-39.1 genannt.

I.6.1 Molekulare Struktur und Expression von AIDA-1-39.1

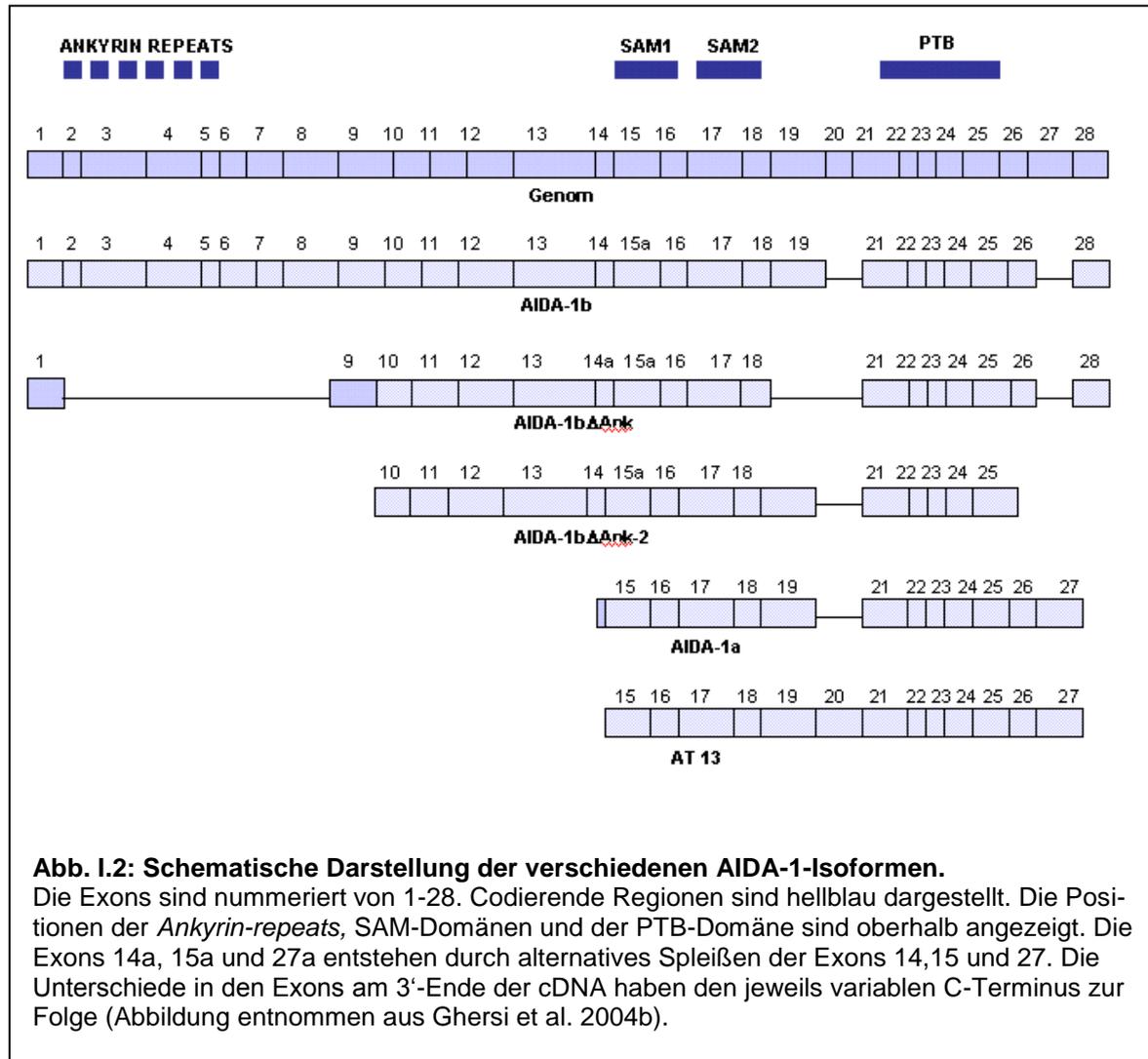
Das Protein AIDA-1 konnte erstmals von Ghersi et al. (2004a) im Rahmen der Alzheimer-Forschung charakterisiert werden. Die Arbeitsgruppe führte YTH-Experimente durch, um mögliche Interaktionspartner für das Transmembranprotein *Amyloid- β Protein Precursor Protein* (A β PP), ein Protein, dessen Spaltprodukt Amyloid- β eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie des M. Alzheimer spielt, zu identifizieren. Hierbei wurde das Protein *A β PP intracellular domain* (AID), das den cytoplasmatischen Teil von A β PP bildet und in verschiedene Prozesse des Zellstoffwechsels, wie z.B. Apoptose und Transkriptionsregulation involviert ist, als Köderprotein verwendet.

Aus der für die YTH-Experimente verwendeten cDNA-Bibliothek wurden drei cDNAs, AT13, AT38 und LK80, isoliert und sequenziert. Es zeigte sich, dass alle drei cDNAs

Spleißvarianten einer Sequenz sind, dessen Protein-Produkt schon in Leukämie-Zellen charakterisiert werden konnte (Fu et al. 1999). Die drei Spleißvarianten enthalten sämtlich kein Startcodon, sind also unvollständig und codieren für den C-terminalen Teil eines vermutlich größeren Proteins. Das Translationsprodukt war das Protein AIDA-1a, bestehend aus 459 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 47kDa. Es beinhaltet eine C-terminale Phosphotyrosin-Bindungsdomäne (PTB-Domäne) und zwei *Sterile-Alpha-Motive* (SAM)-Domänen (vgl. Abb. I.1). PTB-Domänen kommen meist in Adapterproteinen vor und fungieren als Protein-Protein-Interaktions-Domänen (Bork und Margolis 1995). Die SAM-Domäne findet sich in unterschiedlichen Proteinen und Kinasen, die häufig in Transkriptions- und Translationsregulation involviert sind. Sie ist, wie die PTB-Domäne, an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt (Schultz et al. 1997). Die Interaktion von AIDA-1a mit A β PP konnte *in vivo* durch Co-Immunpräzipitationen sowie FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) bestätigt werden. Immunocytochemische Experimente zeigten eine Anreicherung des Proteins im Zellkern, jedoch, ko-exprimiert mit A β PP, eine Kollokalisierung der beiden Proteine im Cytoplasma (Gherzi et al. 2004a,b). Die Arbeitsgruppe konnte zwei weitere Proteine der AIDA-Familie identifizieren. Das Protein AIDA-1b, ein Protein, das aus 1250 Aminosäuren besteht und -zusätzlich zur C-terminalen PTB-Domäne und zwei SAM-Domänen- noch sechs N-terminale Ankyrin-Domänen (sogenannte *Ankyrin repeats*) enthält. *Ankyrin repeats* bestehen aus jeweils etwa 33 Aminosäuren und befähigen Proteine, miteinander zu interagieren (Li et al. 2006; Sedgwick und Smerdon 1999). Im Gegensatz zu AIDA-1a wurde AIDA-1b in immunocytochemischen Experimenten nicht im Zellkern, sondern ausschließlich im Cytosol exprimiert. Ein weiteres, dem AIDA-1b ähnliches Protein, wurde aufgrund der fehlenden *Ankyrin repeats* AIDA-1b Δ Ank genannt. Dieses Protein verteilte sich wiederum ähnlich wie AIDA-1a.

Xu und Hebert (2005) konnten eine Isoform von AIDA, das EB-1/AIDA-1c-Protein, charakterisieren. AIDA-1c wurde im Rahmen eines YTH-Experiments identifiziert, bei dem Coilin als Köder diente. Auch diese Isoform verfügt über eine PTB-Domäne sowie zwei SAM-Domänen. Es besteht aus 426 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 48kDa. In hoher Konzentration kommt es besonders in neuronalem Gewebe vor, und immunocytochemische Experimente zeigten eine diffuse Verteilung des Proteins hauptsächlich im Kern transfizierter Zellen.

Es zeigte sich im Rahmen der Klonierung verschiedener AIDA-1-Proteine die besondere Komplexität des AIDA-Gens, das sich im humanen Genom auf Chromosom 12 (12q21-23) befindet und sich über einen Bereich von mindestens einer Megabase erstreckt. In diesem Gen existiert lediglich eine Promotor-Region, was dafür sprechen könnte, dass die verschiedenen Isoformen durch alternatives Spleißen generiert werden. Die Proteine AIDA-1a und AT13 verfügen zusätzlich über ein PDZ-Bindungsmotiv im C-terminalen Bereich, welches sie zur Interaktion mit bestimmten Proteinen über deren PDZ-Domänen befähigen könnte (Gherzi et al. 2004b). PDZ-Domänen (P steht für das synaptische Protein PSD95, D steht für ein Protein in Septumverbindungen der *Drosophila*, Z steht für Zonula occludens. In diesen Proteinen wurden erstmals PDZ-Domänen gefunden) kommen meist in Gerüstproteinen, wie zum Beispiel dem synaptischen Protein PSD-95, vor. Sie interagieren mit PDZ-Bindungsmotiven anderer Proteine und dienen zur Organisation von größeren Proteinkomplexen (Ranganathan und Ross 1997; Cowburn 1997; Lee und Zheng 2010, Sheng et al. 2001). Abb. I.2 zeigt eine schematische Darstellung der erwähnten AIDA-Varianten und ihrer Domänen (vgl. Gherzi et al. 2004b).



I.6.2 Funktion der AIDA-Proteine

Die Funktion der AIDA-Proteine ist noch weitgehend unbekannt. Ghersi et al. (2004a,b) konnten die Interaktion einiger Isoformen mit AID, dem cytoplasmatischen Teil des A β PP, über die PTB-Domäne zeigen. Außerdem scheint die Spleißvariante AIDA-1a die γ -Secretase inhibieren zu können, was die Spaltung von A β PP zu A β verhindert. Somit könnte das AIDA-Protein eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit der Alzheimer-Krankheit spielen (Ghersi et al. 2004a, b)).

Eine neue Perspektive in der Forschung rund um das AIDA-Protein und seine Funktion gaben Jordan et al. (2004) mit der Untersuchung einer weiteren Variante von AIDA, AIDA-1d. Das Protein wurde im Rahmen von massenspektrometrischen Ana-

lysen charakterisiert, mithilfe derer die Arbeitsgruppe Proteine der PSD, die über nukleäre Lokalisierungssequenzen (NLS) verfügen, darstellten. Nukleäre Lokalisierungssequenzen sind Proteinsequenzen, die an Transportproteine der Kernmembran binden und das NLS-tragende Protein so befähigen, in den Zellkern zu gelangen (Dingwal et al. 1982; Kalderon et al. 1984). Die Experimente sollten neuen Aufschluss über die biochemischen Prozesse bringen, die während der Interaktion zwischen Synapse und Zellkern stattfinden. Das dabei identifizierte Protein AIDA-1d verfügt über eine putative NLS, zwei SAM-Domänen, eine PTB-Domäne, sowie an seinem C-Terminus über ein PDZ-Bindungsmotiv. Es scheint in der PSD mit dem Protein PSD-95 über dessen zwei PDZ-Domänen assoziiert zu sein. Im Western Blot weist das Protein eine Größe von 60kDa auf, und es ist in der PSD corticaler, striataler und hippocampaler Hirnlysate stark angereichert.

Die Arbeitsgruppe hat nicht nur das Protein AIDA-1d charakterisiert, sondern auch aktivitätsabhängige Prozessierung und Lokalisation darstellen können (Jordan et al. 2007). In immuncytochemischen Analysen wurde ein GFP (*green fluorescent protein*)-AIDA-1d-Fusionsprotein in der ruhenden Zelle in der PSD gezeigt. Nach Stimulation der Synapse mit Kaliumchlorid oder N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) wurde es jedoch proteolytisch prozessiert. Ein N-terminaler Teil, der die NLS beinhaltet, scheint daraufhin in nukleäre Cajal-Körper transportiert zu werden. Das C-terminale Fragment des Proteins scheint in der PSD zu verbleiben. Nach langfristiger neuronaler Stimulation kam es in den Experimenten zu einer Steigerung der lokalen Proteinbiosynthese (Jordan et al. 2007; Richter und Fallon 2007). AIDA-1c und AIDA-1a scheinen, passend hierzu, mit Coilin, dem Markerprotein der Cajal-Körper, zu interagieren (Xu und Hebert 2005). Cajal-Körper und Coilin sind eng mit snRNPs (*small nuclear ribonuclear proteins*) und mit prä-mRNA-Spleissvorgängen im Zellkern assoziiert (Ogg und Lamond 2002; Matera 2003; Gall 2003).

Die Distribution von AIDA-1 *in vivo* haben Jakob et al. (2010) mittels immuncytochemischer Analysen gezeigt. Hier war es besonders stark in Strukturen des Vorderhirns, i.e. Hippocampus, Cortex und Striatum, zu detektieren. In der Zelle war AIDA-1, passend zu den Daten von Jordan et al. (2007), sowohl punktuell im Zellkern als auch an der Synapse -assoziiert mit der PSD- lokalisiert.

Diese Daten deuten auf eine Beteiligung des AIDA-Proteins an der Kommunikation zwischen Synapse und Zellkern hin, wodurch es eine Bedeutung für die Regulation der neuronalen, aktivitätsabhängigen Proteinsynthese haben könnte.

I.7 FRAGESTELLUNG

Die gegenwärtige Datenlage deutet darauf hin, dass sowohl Synaptopodin als auch das AIDA-Protein an aktivitätsabhängigen Veränderungen der Synapse, und somit an synaptischer Plastizität, Lernen und Gedächtnis beteiligt sein könnte.

Björn Meyer-Hiemer (Institut für Neuroanatomie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, AG Mohr, Dissertation in Vorbereitung) identifizierte eine neue Isoform des AIDA-Proteins, AIDA-1 39.1, und zeigte eine Interaktion dieser Isoform mit Synaptopodin im YTH-System.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, AIDA-1-39.1 detailliert zu charakterisieren. Das Protein sollte in eukaryontischen Zelllinien, insbesondere in kultivierten hippocampalen Neuronen, exprimiert werden, um seine subzelluläre Lokalisation genauer analysieren zu können. Die Ko-Lokalisation von Synaptopodin und AIDA sollte mittels immunocytochemischer Experimente, Ko-Immunpräzipitation und über Western Blot-Analysen demonstriert werden. Die in der Hefekultur gezeigte Interaktion von AIDA und Synaptopodin sollte durch weitere Experimente ausführlicher untersucht und durch Ko-Immunpräzipitationen bestätigt werden.

In der Literatur herrschen zudem inkongruente Aussagen über die Verteilung der verschiedenen Synaptopodin-Formen und die Mechanismen des Transportes des Proteins in bestimmte Zellkompartimente. Im Rahmen immunocytochemischer Analysen sollten Sequenzen in der kurzen Form (*Synpo-short*) gesucht werden, die für die Lokalisation in Dendriten und dendritischen Dornen erforderlich sein könnten.

II. MATERIAL UND METHODEN

II.1 MATERIAL

Nicht näher bezeichnete Laborchemikalien wurden von der Firma Merck bezogen.

II.1.1 Produkte und Lösungen für Gele und Western Blots

Für Western Blots wurden Zubehöre von Bio-Rad verwendet.

II.1.1a) Lösungen

- **5xLaemmli-Probenpuffer (LPP):**
0,5 M DTT, 0,4 M Tris-HCl, pH 6,8, 10% SDS, 50% Glycerin
1 Spatelspitze Bromphenolblau

- **4xLaemmli-Laufpuffer (pH 8,3), 1000ml**
12 g Tris-Base, 57,6g Glycin, 0,4% SDS
H₂O ad 1000ml

- **10x TBE-Laufpuffer (pH 8,3)**
1 M Tris-Base, 1 M Borsäure, 20 mM EDTA

- **Semi-Dry-Transfer-Puffer (pH 8,3)**
25 mM Tris-Base, 150 mM Glycin, 10% Methanol p.A.

- **Lösung zum Entfernen gebundener Antikörper ("stripping"-Puffer, 100ml)**
20ml 10% SDS (Sodiumdodecylsulfat), 12,5ml 0,5M Tris-HCl (pH 6,8)
H₂O ad 100ml
Kurz vor dem Gebrauch wurden 80µl 2-Mercaptoethanol hinzugefügt

- **Blockierlösung, 100ml**
5g Magermilchpulver in 95ml PBS-T

- 10x PBS (pH 7,4), 1000ml
100mM Na-Phosphat, 1,5M NaCl
H₂O ad 1000ml

- PBS-T
10x PBS, 0,3% Tween-20

- ECL-Lösungen
Arbeitslösung pro Blot:
5ml Lösung A: 0,1M Tris-HCl (pH 8,6), 0,025% Luminol
0,5ml Lösung B: 0,11% p-Hydroxycoumarinsäure in DMSO
1,5µl 30% H₂O₂

- Laemmli Trenngel 10%, 10ml
4,85ml H₂O, 2,5ml 1,5M Tris-HCl (pH 8,8), 2,5ml 40% Acrylamid 29 :1
100µl 10% SDS, 100µl 10% Ammoniumpersulfat (APS), 10µl Tetramethylethy-
lendiamin (TMED)

- Sammelgel 5%, 10ml
6ml H₂O, 2,5ml Tris-HCl (pH 6,8), 1,25ml 40% Acrylamid 29 :1
100µl 10% SDS, 60µl 10% APS, 12µl TMED, 100µl Bromphenolblau in H₂O

- Agarosegel 1% (pH 8,3), 40ml
40ml 0,5x TBE, 0,4g Agarose, 2µl Ethidiumbromid (10mg/ml)

II.1.2b) Sonstige Produkte für Western Blots

- Protein Assay Reagent Bio-Rad
- Protran Nitrocellulose- Membranen Schleicher & Schuell
- Filmmaterial Agfa Cronex 5 Agfa

II.1.2 Produkte und Lösungen für Fixierung und Immuncytochemie

II.1.2a) Lösungen

- 4% Paraformaldehyd in PBS (pH 7,4), 100ml
4 g Paraformaldehyd, 2ml 2 M NaOH, 10 ml 10 x PBS
H₂O ad 100 ml, durch Faltenfilter filtriert.
- 10xPBS (pH 7,4, 100mM Phosphat), 1000ml
90g NaCl, 10,15g Na₂HPO₄ (wasserfrei, 71,5 mM), 3,93g NaH₂PO₄·H₂O (28,4 mM), H₂O ad 1000ml
- TBS (Tris-buffered saline), 500ml
150 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 7,5)
H₂O ad 500 ml
- Blockierlösung (TNB-1), 50ml
50 ml TBS, 0,5g Blocking Reagens (Du Pont)

II.1.2b) Sonstige Produkte für die Immunzytochemie

- Prolong Gold Antifade mit DAPI Invitrogen

II.1.3 Produkte und Lösungen für (Ko-) Immunpräzipitationen

II.1.3a) Lösungen

- Immunpräzipitations (IP)-Puffer
120 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40
Protease-Inhibitor Complete® + EDTA
- IP-Puffer \emptyset EDTA
120 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) 0,5 mM CaCl₂ oder 2 mM MgCl₂,
0,5% NP-40, Protease-Inhibitor Complete® \emptyset EDTA, 1mM DTT

II.1.5 Produkte, Lösungen und Medien für die Hefekultur

II.1.5a) Medien, 1000ml

- YPDA (pH 6,5)
15ml L-Adenin-Hemisulphat (2%), 50g YPD
H₂O ad 1000ml
- 2x YPDA (pH 6,5)
15ml L-Adenin-Hemisulphat (2%), 100g YPD
H₂O ad 1000ml
- SD/-Trp (pH 5,8)
26,7g Minimal SD Base, 0,74g -Trp DO Supplement
H₂O ad 1000ml
- SD/-Leu (pH 5,8)
26,7g Minimal SD Base, 0,69g -Leu DO Supplement
H₂O ad 1000ml
- SD/-Leu/-Trp (pH 5,8)
26,7g Minimal SD Base, 0,64g -Leu/-Trp DO Supplement
H₂O ad 1000ml
- SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp (pH 5,8)
26,7g Minimal SD Base 0,60g -Ade/-His/-Leu/-Trp DO Supplement
H₂O ad 1000ml

Zur Herstellung von Agar-Platten wurde Select Agar (Invitrogen) bis zu einer Endkonzentration von 1,5% hinzugefügt.

II.1.5b) Lösungen, 100ml

- 10 x TE (pH 7,5)
0,1 M Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM EDTA
H₂O ad 100 ml

- 10 x Lithium-Acetat (pH 7,5; Sigma)
1 M Lithium-Acetat
H₂O ad 100 ml, pH mit 1% Essigsäure adjustieren
- 50% PEG 3350 (Sigma)
50 g PEG 3350
H₂O ad 100 ml
- 0.9% NaCl
0.9 g NaCl
H₂O ad 100 ml

II.1.5c) Sonstige Produkte für die Hefekultur

- Minimal SD-Base Bio 101
- Drop-Out- Supplements Bio 101
- Herring Testes Carrier DNA Becton Dickinson GmbH
- 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- α -D-Galactopyranoside Calbiochem

II.1.6 Produkte, Lösungen und Medien für die Kultur etablierter Zelllinien

II.1.6a) Lösungen

- Versene-Puffer (pH 7,4), 1000ml
0,2g EDTA, 8g NaCl, 0,2g KCl, 1,17g Na₂HPO₄, 0,18g KH₂PO₄
H₂O ad 1000ml
- 1xPBS (pH 7,4), 1000ml
8g NaCl, 0,2g KCl, 1,44g Na₂HPO₄, 0,2g KH₂PO₄
H₂O ad 1000ml

II.1.6b) Medien

- Kulturmedium für HEK-293- und COS-7-Zellen

90% Dulbecco's modified eagle's serum (DMEM, Sigma), 10% fötales Kälberserum (FCS, Sigma), 100U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin.

II.1.6c) Sonstige Produkte für die Kultur etablierter Zelllinien

- | | |
|--|------------|
| ▪ Trypsin | Invitrogen |
| ▪ Transfektionsreagenz Fugene-6 | Roche |
| ▪ Transfektionsreagenz Fugene- HD | Roche |
| ▪ Opti-MEM (<i>minimal essential medium</i>) | Invitrogen |

II.1.7 Produkte, Lösungen und Medien für die Neuronenkultur

Transfizierte Hippocampus-Neurone wurden von Frau PD Dr. rer. nat. Evita Mohr, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Institut für Neuroanatomie, zur Verfügung gestellt.

II.1.8 Bakterienstämme

- | | |
|-------------|------------|
| ▪ XL-1 Blue | Stratagene |
|-------------|------------|

II.1.9 Hefestämme

- | | |
|----------|----------|
| ▪ Y 187 | Clontech |
| ▪ AH 109 | Clontech |

II.1.10 Eukaryontische Zelllinien und Gewebe

<u>ZELLINIE</u>	<u>ZELLTYP</u>	<u>REFERENZ</u>
HEK 293	Humane Embryonale Nierenzellen (Epithelzellen)	DMSZ
COS-7	Cercopithecus aethiops (grüne Meerkatze, Nierenzellen, Fibroblasten-ähnlich)	ATCC

Die in der Arbeit verwendeten Gewebe stammen von Ratten aus der Tierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, die nach den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes gehalten wurden.

II.1.11 Antibiotika

- | | |
|----------------|----------------|
| ▪ Kanamycin | MP Biomedicals |
| ▪ Ampicillin | Sigma |
| ▪ Streptomycin | Sigma |
| ▪ Penicillin | Sigma |

II.1.12 Enzyme

II.1.12a) Restriktionsendonukleasen

- | | |
|------------|----------------------|
| ▪ Bam-H I | Invitrogen |
| ▪ BgI II | New England Biolabs |
| ▪ Eco-R I | Invitrogen |
| ▪ Eco-R V | New England Biolabs |
| ▪ Hind III | Invitrogen |
| ▪ Nco I | New England Biolabs |
| ▪ Nhe I | Fermentas |
| ▪ Pst I | Amersham Biosciences |
| ▪ Sac I | Invitrogen |
| ▪ Xba I | Invitrogen |

II.1.12b) Sonstige Enzyme

- | | |
|----------------------|---------------------|
| ▪ Klenow-Polymerase | Fermentas |
| ▪ T4 DNA Ligase | Invitrogen |
| ▪ Phusion Polymerase | New England Biolabs |

Es wurden für die Enzyme die vom Hersteller empfohlenen Puffer verwendet.

II.1.13 Antikörper

II.1.13a) Tabelle II.1: Primäre Antikörper

Typ	Verdünnung	Hersteller
Kaninchen α GFP	1:5000	Rockland
Kaninchen α Synaptopodin	1:3000/1:5000	Sigma
Kaninchen α hs AIDA-1	1:1000	Invitrogen
Maus monoklon. α myc	1 :2500	Sigma
Maus monoklon. α GFP	1:9000	Sigma
Maus monoklon. α Synaptopodin	1:50	Progen
Maus monoklon. α T7	1:10000	Novagen
Maus monoklon. α Flag	1:5000	Stratagene
Maus α Synaptophysin	1:2000	Millipore
Maus α NMDAR UE 1	1:2000	Chemicon

Der Antikörper Kaninchen α mRFP wurde von Herrn PD Dr. H.-J. Kreienkamp, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Institut für Humangenetik, zur Verfügung gestellt und in der Verdünnung 1:1000 verwendet.

II.1.13b) Tabelle II.2: Sekundäre Antikörper

Typ	gelöst in/ Verdünnung	Hersteller
Ziege α Kaninchen HRP	1:10000	Jackson/Dianova
Ziege α Kaninchen Alexa® 488	1:500	Molecular Probes
Ziege α Maus Alexa® 488	1:500	Rockland
Ziege α Maus HRP	1:10000	Jackson/Dianova
Ziege α Maus Cy3	1:250	Jackson/Dianova
Ziege α Maus Alexa® 488	1:250	Molecular Probes

II.1.14 DNA-Konstrukte

II.1.14a) Tabelle II.3: Durch PCR generierte DNA-Konstrukte

Nähere Bezeichnung der dazugehörigen Primer-Paare (Vorwärts-Primer, *forward primer*, FP und Rückwärts-Primer, *reverse primer*, RP): siehe Tabelle „Oligonukleotide“.

Name des Konstrukts	Nukleotide (vor P)	GenBank acces- sion nr.	Primer-Paare FP/RP
Rat Synpo-short in pEGFP-C2	60-2135	NM_021695	447/446
Rat Synp-long in pEGFP-C2	4-2718	AM_980944	459/456
Rat Synpo-short in pGBKT7	1-2089	NM_021695	459/448
rnSynpo-short nt 4-1038 in pGBKT7	4-1038	NM_021695	461/462
rnSynpo-short nt 1039-2076in pGBKT7	1039-2076	NM_021695	463/464
rnSynpo-short nt 4-519 in pGBKT7	4-519	NM_021695	461/465
rnSynpo-short nt 520-1038 in pGBKT7	520-1038	NM_021695	466/462
rnSynpo-short nt 1039-1557 in pGBKT7	1039-1557	NM_021695	463/467
rnSynpo-short nt 1558-2076 in pGBKT7	1558-2076	NM_021695	468/464
rnSynpo-short nt 4-1038 in pEGFP-C2	4-1038	NM_021695	461/462
rnSynpo-short nt 1039-2076in pEGFP-C2	1039-2076	NM_021695	463/464
rnSynpo-short nt 4-519 in pEGFP-C2	4-519	NM_021695	461/465
rnSynpo-short nt 520-1038 in pEGFP-C2	520-1038	NM_021695	466/462
rnSynpo-short nt 1039-1557 in pEGFP-C2	1039-1557	NM_021695	463/467
rnSynpo-short nt 1558-2076 in pEGFP-C2	1558-2076	NM_021695	468/464
hsAIDA-1, clone 39.1 nt 1-486 in pACT2	1-486	AM_980945	470/471
hsAIDA-1, clone 39.1 nt 487-1197 in pACT2	487-1197	AM_980945	472/473
hsAIDA-1, clone 39.1 nt 1-123 in pACT2	1-123	AM_980945	470/482
hsAIDA-1, clone 39.1 nt 1-411 in pACT2	1-411	AM_980945	470/483
hsAIDA-1, clone 39.1 1-1197 in pmRFP-N1	1-1197	AM_980945	474/475
hsAIDA-1, clone 39.1 nt 1-486 in pEGFP-C2	1-486	AM_980945	476/477
hsAIDA-1, clone 39.1 nt 487-1197 in pEGFP-C2	487-1197	AM_980945	478/479

Der Klon Myc-tagged SAP90 in pCMVneo PSD95 wurde von Herrn Dr. rer. nat. Stephan Kindler, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Institut für Humangenetik, zur Verfügung gestellt.

Der Klon rPABP in pGBKT7 (Miroci et al. 2012) wurde von PD Dr. rer. nat. Evita Mohr, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Institut für Neuroanatomie, zur Verfügung gestellt.

II.1.14b) Tabelle II.4: Durch Umklonieren generierte DNA-Konstrukte

Als Template wurde das Konstrukt hs AIDA-1, clone 39.1 in pACT2, GenBank accession nr. AM_980945 verwendet.

Name des Konstruktes	Nukleotide (vor P)	GenBank acces- sion nr.	Primer-Paare FP/RP
hsCajalin2/AIDA-1 in pcDNA3-T7-tag	1559	AM_980945	397/398

II.1.15 Tabelle II.5: Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von MWG-Eurofins bezogen.

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Anz. Nukl.	Nr.
pACT 2 5102-5122 FP	CTATTCGATGATGAAGATACC	21	399
pACT2 4919-4939 RP	GAGATGGTGCACGATGCACAG	21	400
pGBKT7 1506-1487 RP	GTCACITTTAAATTTGTATAC	21	402
pEGFP-C1 1270-1285 FP	GTCCTGCTGGAGITTCG	16	405
pEGFP-C1 1482-1468 RP	CAGGGGGAGGTGTGG	15	406
rnSynpo-long (Bam H1) RP	GCATGGATCCCTTAGGTGGTGCAAGAGGCC	29	456
rn Synpo-short ORF 4-1038 (Eco R1) FP	GCATGAATTCGAGGGGTACTCAGAGGAAG	29	461
rn Synpo-short ORF 4-1038 (BamH1) RP	CGATGGATCCGGGAGGCTTGGGGTCAG	27	462
rn Synpo-short ORF 1039-2076 (EcoR1) FP	GCATGAATTCATTTGAAGGGCCAGGTAG	29	463
rn Synpo-short ORF 1039-2076 (BamH1) RP	GCATGGATCCCTTGAAGCAGAAGGAAGG	28	464
rn Synpo-short ORF 4-519 (Bam H1) RP	GCATGGATCCGCTGGAGAGGGGAGTAGC	28	465
rn Synpo-short ORF 520-1038 (EcoR1) FP	GCATGAATTCCTCTGGGCCACCAGCTGCAG	29	466
rn Synpo-short ORF1039-1557 (BamH1) RP	CGATGGATCCAGGGGCATTAGTGGTGTAC	29	467
rn Synpo-short ORF 1558-2076 (EcoR1) FP	GCATGAATTCGGGGGCTTCCGAGTGGCG	28	468

hs AIDA-1 1-486 (Nco1+AG) FP für pACT2	<u>CGATCCATGGAGCAGAAAGATGCACAGAG</u>	29	470
hs AIDA-1 1-486 RP (Sst) für pACT2	<u>GCATGAGCTCATTATGAACCTGATGGATC</u>	29	471
hs AIDA-1 487-1197 (Nco1+AG) FP	<u>GCATCCATGGAGACAGGAGACTGGGGAG</u>	28	472
hs AIDA-1 487-1197 (Sst1) RP für pACT2	<u>GCATGAGCTCGAAAATCGTGGTTTCATAC</u>	29	473
hs AIDA-1 1-1197 (EcoR1-Kozak-atg gct) FP für pmRFP-N1	<u>GCATGAATTCACCATGGCTCAGAAA-</u> <u>GATGCACAGAG</u>	36	474
hs AIDA-1 1-1197 (Sal1+CC) RP für pmRFP-N1 CC in codierender Region=GG	<u>GCATGTCGACCCGAAAATCGTGGTTTCATAC</u>	31	475
hs AIDA-1 1-486 (EcoR1) FP für pEGFP-C2	<u>GCATGAATTCAGAAAGATGCACAGAG</u>	27	476
hs AIDA-1 1-486 (Sal 1) RP für pEGFP-C2	<u>CGATGTCGACATTATGAACCTGATGGATC</u>	29	477
hs AIDA-1 487-1197 (EcoR1) FP für pEGFP-C2	<u>GCATGAATTCACAGGAGACTGGGGAG</u>	26	478
hs AIDA-1 487-1197 (Sal 1) RP für pEGFP-C2	<u>GCATGTCGACGAAAATCGTGGTTTCATAC</u>	29	479
hsAIDA-1 1-123 (Sst1) RP für pACT2	<u>GCATGAGCTCCCGAGCCGCTCGGGCTG</u>	27	482
hsAIDA-1 1-411 (Sst1) RP für pACT2	<u>GCATGAGCTCCTGAGCCATCTGCCTCTC</u>	28	483

Sequenzierprimer T7*	TAATACGACTCACTATAGGG	20	*
Sequenzierprimer FP für pmRFP-N1	ATGTCGTAACAACCTCCGC	18	480
Sequenzierprimer RP für pmRFP-N1	GCCCTCGCCCTCGATCTC	18	481
rn Synpo Sequenzierprimer 1	GACACAGTGTCCCCGAAT	19	449
rn Synpo Sequenzierprimer 2	ACAGGACCGCCAGGCCAT	18	450
rn Synpo Sequenzierprimer 4	CCAGAATCTCTCAGAGGC	18	452
rn Synpo Sequenzierprimer 5	CCTCGTCACGCGCTTCGT	18	453
Cajalin Sequenzierprimer 1 FP	CGGTCCATCACCCCTCAG	17	460
hs AIDA Sequenzierprimer 2 FP	GGAGTCAAATTTATTGAT	18	469

*Der Sequenzierprimer T7 wurde vom Sequenzierservice des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf zur Verfügung gestellt.

II.1.16 Plasmide

pGBKT7, Konz. 1,2 ng/µl

Clontech

pACT2

Clontech

pEGFP-C2	Clontech
pCMV-Flag 2B	Stratagene
pcDNA3	Invitrogen
pGEX 6-C2	GE Healthcare

Das Plasmid pmRFP (Campbell et al. 2002) wurde von Herrn PD Dr. H.-J. Kreienkamp, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Institut für Humangenetik, für Experimente zur Verfügung gestellt und nach Genehmigung von Dr. R. Tsien eingesetzt.

II.1.17 Längenstandards

ΦX-174-RF-DNA-Marker	Fermentas
Hae III Fragment	Fermentas
Lambda-DNA Längenstandard 3	Fermentas
Lambda-DNA, Hind III/Eco RI geschnitten	Fermentas
Full Range Rainbow molecular weight marker	Amersham
Benchmark prestained protein ladder	Invitrogen
Benchmark protein ladder	Invitrogen
Page Ruler Plus prestained protein ladder	Fermentas

II.1.18 Fertigsysteme

QIAquick PCR Purification Kit (250)	QIAGEN
QIAquick Gel Extraction Kit (50)	QIAGEN
High Speed Plasmid Midi Prep Kit	QIAGEN
QIAprep Spin Miniprep-Kit	QIAGEN

II.1.19 Geräte

Eppendorf Bio Photometer	Eppendorf
DC 120 Camera	Agfa
Gene Amp PCR System 2400	Perkin Elmer
Konfokales Mikroskop SP2	Leica
Mikroskop Axiovert S135	Zeiss

Kamera	Hamamatsu
Sterile Werkbank Hera Safe	Heraeus
Spannungsquellen	Amersham

II.1.19a) Elektrophoresekammern

GNA 100	Amersham
Mini Protean 3	Bio-Rad
Semi-Dry Transfer-Cell Trans Blot SD	Bio-Rad

II.1.19b) Zentrifugen

Biofuge 13	Heraeus
Minifuge GL	Heraeus
Centrifuge 5417R	Eppendorf
Centrifuge 5415C	Eppendorf

II.1.20 Software

Es wurden zur Aufnahme und Bildbearbeitung die Leica SP2 Software und die Programme Open Lab (Improvision), Power Point (Microsoft) und Photoshop (Adobe) verwendet. Die Bilder wurden im TIFF- Format exportiert.

II.1.21 Sonstiges

10mM dNTP-Mix	Invitrogen
DNA-Template	Eigene Herstellung

II.2 METHODEN

II.2.1 DNA

II.2.1a) Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Amplifikationen von DNA-Sequenzen wurden mit dem *GeneAmp PCR-System 2400* (Perkin-Elmer) unter Verwendung von *Phusion Hot Start DNA-Polymerase* (Finnzymes) durchgeführt. Es wurden 50µl-Ansätze verwendet, die je 2ng DNA-Template, 1U Phusion Polymerase, 10µl 5xPolymerase-Puffer, je 200µM Desoxyribonukleosidtriphosphate, 0,5µM Vorwärts- und 0,5µM Rückwärtsprimer enthielten. Das Programm wurde in der Regel wie in der nachfolgenden Tabelle dargestellt gewählt und bei Bedarf abgewandelt.

Tabelle II.6: PCR

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
1. Denaturierung	98°C	1min	1
Denaturierung	98°C	10sec	30
Primer-Anlagerung	72°C	30sec	
Primer-Extension	72°C	2min	
Finale Extension	72°C	10min	1
	4°C	hold	

II.2.1b) Reinigung von PCR-Produkten

Die Reinigung der PCR-Produkte erfolgte mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* der Firma QIAGEN nach Herstellerangaben. Zur Elution der DNA wurde 1mM Tris-HCl, pH 7,4, verwendet.

II.2.1c) DNA-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung und Analyse von DNA-Fragmenten wurden 0,8-1,2%ige Agarosegele in 0,5x TBE-Puffer (pH 8,3), verwendet, denen 2µl Ethidiumbromid (10mg/ml) zur späteren Detektion im UV-Licht zugesetzt waren. Die DNA wurde vor dem Auftragen mit 5xDNA-Beladungspuffer (Fermentas) im Verhältnis 1:5 versetzt. Die Gelelektro-

phorese erfolgte horizontal in Elektrophoresekammern der Firma Pharmacia Biotech. Als Laufpuffer wurde 0,5xTBE-Puffer (pH 8,3) eingesetzt. Als Längenstandards wurden in der Regel der *ϕX-174-RF-DNA-Marker* und der *Lambda-DNA Längenstandard 3* (Fermentas) verwendet.

II.2.1d) Restriktion von DNA

Der Verdau von DNA-Fragmenten erfolgte mithilfe von entsprechenden Restriktionsendonukleasen. Sie wurden nach Herstellerempfehlungen und mit den vom Hersteller mitgelieferten Puffern eingesetzt. Es wurde in der Regel eine Stunde bei 37°C verdaut, die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 5xDNA-Beladungspuffer gestoppt.

II.2.1e) Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationen wurden über Nacht bei 16°C mit 10µl T4-DNA-Ligase (Invitrogen) durchgeführt. Es wurden insgesamt jeweils 10ng/10µl-Ansatz DNA verwendet, wobei das mit Restriktionsenzymen verdaute *Insert* im dreifachen molaren Überschuss zum Vektor eingesetzt wurde. Es wurde der mitgelieferte Puffer verwendet.

II.2.1f) Transformation von Bakterien

Zur Transformation wurden in der Regel XL-1 Blue-Zellen (Stratagene) verwendet. 1ng Plasmid-DNA oder 1µl des 1:10 verdünnten Ligationsansatzes wurden mit 50µl der Bakterienzellen 20min auf Eis inkubiert. Es erfolgte dann ein Hitzeschock (42°C) von 45sec, ein Abkühlen auf Eis und eine weitere 45minütige Inkubation nach Zugabe von SOC-Medium bei 37°C unter Schütteln (250rpm). Nach Zentrifugation wurde ein Teil des Überstandes abgenommen, die Zellen resuspendiert und in zwei verschiedenen Konzentrationen auf LB-Agarplatten mit dem jeweiligen Antibiotikum ausplattiert.

II.2.1g) DNA-Isolierung

Zur DNA-Isolierung aus prokaryontischen Zellen wurden je nach Mengenbedarf entweder das *QIAprep Spin Miniprep Kit* für Minipräparationen oder das *High Speed Plasmid Midi Kit* für Großpräparationen (QIAGEN) verwendet. Die Bakterienkulturen wurden in 3ml bzw. 40ml LB-Medium über Nacht bei 37°C und 250rpm geschüttelt. Dem Medium wurde das der Resistenz des jeweiligen Plasmides entsprechende Antibiotikum zugesetzt. Die Konzentration betrug 50µg/ml bei der Verwendung von Kanamycin und 100µg/ml bei der Verwendung von Ampicillin. Die Isolierung der DNA wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Elution erfolgte in H₂O.

II.2.1h) DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden vom Sequenzierservice des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Es wurden jeweils 500ng Plasmid-DNA und 15pmol des entsprechenden Primers eingesetzt.

II.2.2 Protein

II.2.2a) Herstellung von Proteinextrakten aus eukaryontischen Zelllinien

Zur Zellernte wurden konfluent bewachsene 6cm-Petrischalen verarbeitet. Die Zellen wurden zunächst mit 5ml PBS gewaschen, dann in 1ml PBS mit dem Zellschaber gelöst und in ein 15ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Zentrifugation von 5min bei 1500rpm und 4°C (Zentrifuge 5417R, Eppendorf) wurden der Überstand abgenommen und die Zellen nochmals mit 10ml PBS gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde erneut der Überstand abgenommen und die Zellen in jeweils 500µl IP-Puffer, der je nach Bedarf in der Zusammensetzung variierte, resuspendiert, in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt und mit Spritze und Kanüle homogenisiert. Nach einer 5minütigen Inkubation wurde die Lyse mikroskopisch überprüft. Anschließend erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 20min bei 1500rpm und 4°C. Der Überstand wurde sodann abgenommen, in ein sauberes 1,5ml-Gefäß überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Bei der Verwendung von RIPA-Puffer wurden die Zellen bereits in der Petrischale für 15-20min mit 1ml des Puffers inkubiert.

II.2.2b) Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem *Protein Assay Reagent* (Bio-Rad), das auf der Methode von Lowry et al. (1951) basiert. Es wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. Es wurde eine fünfwertige Eichgerade mit einem Protein bekannter, verschiedener Konzentrationen erstellt, um anhand dieser die Konzentration des isolierten Proteins ablesen zu können. Hierzu wurde BSA (0,5mg/ml) in Konzentrationen von 0,5µg-10µg (ad 20µl H₂O) unter Zugabe von je 1ml des 1:5 mit H₂O verdünnten Reagenz verwendet. Zur Proteinbestimmung wurden 2µl der Proteinlösung ad 20µl H₂O ebenfalls zu jeweils 1ml Reagenz gegeben. Nach einer Inkubation von 5min erfolgte die photometrische Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 575 nm.

II.2.2c) Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mithilfe der Technik der SDS-PAGE lassen sich Proteine ihrer Größe nach auftrennen. Die Proteinextrakte wurden mit 5x Laemmli-Probenpuffer versetzt, 5min bei 60°C inkubiert und auf 8-10%-Polyacrylamidgele aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 200V und maximal 150mA für 50-60min in der *Mini-Protean3*-Elektrophoresekammer (Bio-Rad) unter Verwendung von 1x Laemmli-Laufpuffer. Zur Ermittlung der Größe der aufgetrennten Proteine wurde zusätzlich ein Protein-Größen-Standard aufgetragen.

II.2.2d) Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen

Der Transfer der in Polyacrylamidgelen aufgetrennten Proteine auf Protran-Nitrocellulose-Membranen erfolgte elektrophoretisch in Semi-Dry-Transfer-Puffer mit der *Semi-Dry Transfer-Cell Trans Blot SD* (Bio-Rad) für 60min bei 150mA und maximal 30V. Die Effizienz des Transfers wurde durch Färben der Membranen mit 0,1% Ponceau S in 5% Essigsäure und zweimaliges Entfärben mit H₂O kontrolliert.

II.2.2e) Detektion von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen mit Hilfe von Antikörpern („Western Blot“)

Mithilfe des Western Blots können ihrer Größe nach aufgetrennte Proteine immunologisch durch spezifische Primär- und Sekundärantikörper detektiert und z.B. durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht werden.

Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrocellulose-Membran wurde diese mindestens 60min in Blockierlösung inkubiert. Sodann wurde der gewünschte Erstantikörper in einer geeigneten Verdünnung mit Blockierlösung ad 10ml (vgl. Tab. II.1) auf die Membran gegeben und für 3Std unter moderatem Schütteln inkubiert. Es folgten mehrere Waschschrte mit PBS-T (nach zweimalig kurzem Abspülen einmal 15min unter Schütteln, dann noch zweimal 5min unter Schütteln). Nun konnte der ebenfalls in 10ml Blockierlösung verdünnte Peroxidase-gekoppelte Zweitantikörper (vgl. Tab. II.2) auf die Membran gegeben und für 1 Std auf dem Schüttler inkubiert werden. Im Anschluss wurde die Membran wie nach Inkubation mit dem Erstantikörper gewaschen. Die Detektion des Proteins erfolgte über den Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper, der durch Zugabe eines H₂O₂-enthaltenden Detektionsreagens auf dem Röntgenfilm sichtbar wird. Hierzu erfolgte zunächst die Entfernung von Resten der Waschlösung durch kurzes Auflegen der Membran auf Zellstoff. Sie wurde sodann auf eine hydrophobe Oberfläche (Parafilm) gebracht und mit 4ml Detektionsreagens (ECL-Arbeitslösung, eigene Herstellung) für 5min inkubiert. Nach Entfernung der Detektionslösung wurde die Membran luftblasenfrei zwischen zwei Plastikfolien in eine Filmkassette gegeben. In der Dunkelkammer wurde dann der Röntgenfilm aufgelegt und zunächst für etwa 1-2min exponiert. Abhängig von der Signalstärke nach der ersten Exposition erfolgte die folgende Exposition mit einem neuen Film für bis zu 60min, so dass die gewünschte Signalstärke erreicht wurde.

II.2.2f) Immunpräzipitation

Die Methode der Immunpräzipitation eignet sich zur Isolation eines bestimmten Proteins aus einer Lösung und zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen. Das Prinzip basiert auf der Antigen-Antikörperbindung. Ein Proteingemisch wird mit bestimmten Trägermolekülen (Agarose) inkubiert, an die ein für das zu isolierende Protein spezifischer Antikörper gebunden ist. Bei Verwendung

von Protein G-/ A- oder A/G-Agarose ist dies nicht der Fall, und es wird ein Antikörper zugegeben. Dieser bindet über seinen Fc-Teil an das immobilisierte Protein G-/A- oder A/G.

Befindet sich das gesuchte Protein in der Lösung, kommt es zur Bindung durch den Antikörper, und es entsteht ein an die Agarose gebundener Antigen-Antikörper-Komplex. Durch mehrere Waschschrte werden aus dem Extrakt alle nicht an die Agarose gebundenen Proteine entfernt. Im Anschluss können die gebundenen Proteine in der Western-Blot-Analyse mithilfe von Primär- und Sekundärantikörpern sichtbar gemacht werden.

- Immunpräzipitation mit Protein G-, Protein A- oder Protein A/G- Agarose

Pro Ansatz wurden 50µl der Agarose („beads“) verwendet. Zunächst wurden die *beads* 5x mit je 50µl IP-Puffer gewaschen, die Zentrifugation (Zentrifuge 5417R, Eppendorf) erfolgte jeweils für 30sec bei 10000rpm und 4°C. Im letzten Waschpuffer wurden die *beads* auf die den später verwendeten Ansätzen entsprechende Anzahl Reagenzgefäße verteilt und bis zur Verwendung im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Kurz vor der Verwendung wurden sie nochmals zentrifugiert und die Überstände abgenommen. Nun erfolgte eine Vorinkubation mit dem Proteinextrakt für 2Std bei 4°C rotierend. Währenddessen wurden weitere *beads* vorbereitet und auf Reagenzgefäße verteilt.

Nach Abschluss der Inkubationszeit erfolgte die Abnahme eines Aliquots (50µl) vom vorgereinigten Proteinlysate („*Input*“; dies wurde mit 12,5µl 5xLPP 7min bei 99°C inkubiert und bis zur Verwendung in der SDS-PAGE bei -20°C gelagert). Das restliche Proteinlysate wurde nun auf die zwei Reagenzgefäße mit den vorbereiteten *beads* verteilt. Sodann wurde eines der beiden Lysate mit dem Antikörper (vgl. Tab. II.1), das zweite mit 2µg Kontroll-IgG aus der dem Antikörper gleichenden Spezies für 3Std bei 4°C rotierend inkubiert.

Nach Abschluss der Inkubationszeit wurden die vorbereiteten *beads* hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C rotierend. Am Folgetag wurden die Ansätze mit den *beads* erneut für 2min bei 3000rpm und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen, ein 100µl-Aliquot in ein frisches Gefäß überführt („*Überstand nach Bindung*“; dies wurde mit 12,5µl 5xLPP 7min bei 99°C inkubiert und bis zur Verwendung in der SDS-PAGE bei -20°C gelagert), der Rest verworfen. Die Ansätze

wurden im Anschluss 5x mit je 1ml IP-Puffer gewaschen. Zur Elution wurden sie mit je 40µl 2xLPP für 7min bei 99°C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Dann erfolgte eine 5minütige Zentrifugation bei 16400rpm und 4°C. Die Überstände wurden in saubere Reagenzgefäße gebracht („*Eluat*“) und die Sedimente verworfen. Nun konnten die Immunpräzipitate direkt zur SDS-PAGE eingesetzt oder bei -20°C gelagert werden.

- Immunpräzipitation mit T7-tag-Agarose

Die T7-tag-Agarose beinhaltet einen Maus-α-T7-tag-Antikörper, der kovalent an die die Agarose gekoppelt ist. Dieser bindet ein Protein mit T7-tag, weshalb die Zugabe eines Antikörpers bei der Immunpräzipitation mit T7-tag-Agarose nicht notwendig war. Somit erübrigte sich auch die Durchführung einer Kontrolle mit dem zum verwendeten Antikörper passenden Immunglobulin G. Ferner war eine Vorinkubation des Proteinlysates mit den *beads* nicht notwendig. Ansonsten war das Vorgehen das Gleiche wie mit der Protein G-/ Protein A- oder Protein G-/A-Agarose.

II.2.3 Eukaryontische Zellkultur

Molekularbiologische und biochemische Methoden

II.2.3a) Kultivierung von Zellen

Es wurden zunächst 1×10^6 Zellen in einer 10cm-Petrischale in 10ml Medium (90% DMEM + 10% FCS, 100U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin) ausplattiert. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Alle 2 Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Einmal wöchentlich wurden die Zellen subkultiviert. Die Kultur wurde zu diesem Zweck nach einmaligem Waschen mithilfe von 1ml 0,2% Trypsin in Versene-Puffer von der Schale abgelöst und nach Trituration und Transfer in ein 50ml-Falcon-Reagenzgefäß mit frischem Medium überführt. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden sie in der gewünschten Verdünnung auf frischen Schalen ausplattiert.

Die Kultivierung von COS-7-Zellen erfolgte in ähnlicher Weise. Es wurde jedoch grundsätzlich 2 x in Versene-Puffer gewaschen, die Zellen wurden nach Trituration

außerdem 5min bei 1500rpm zentrifugiert (Zentrifuge Eppendorf 5415C) und erst dann in 10ml frischem Medium resuspendiert.

II.2.3b) Transfektion von HEK 293-Zellen mit *Fugene HD*

24 Stunden vor einer Transfektion wurden die HEK 293-Zellen in einer Dichte von 1×10^6 Zellen auf 6cm-Petrischalen ausplattiert. Für die Transfektion auf 12-Loch-Platten wurden pro Napf $1,5 \times 10^5$ Zellen plattiert. Die Zählung geschah nach Trituration in Kulturmedium mit einer Zählkammer. Es wurde Antibiotika-freies Medium verwendet. Die Transfektion erfolgte mithilfe des Transfektionsreagenzes *Fugene HD* (Roche) nach Herstellerangaben. Hierzu wurden je 4µg DNA, 6µl *Fugene HD* und *Opti-MEM* (Invitrogen) ad 200µl verwendet und nach einer 15minütigen Inkubation auf die vorbereiteten Zellen gegeben. Die Zellen wurden nach der Transfektion für etwa 48Std inkubiert.

II.2.3c) Transfektion von COS 7- Zellen mit *Fugene 6*

24 Stunden vor einer Transfektion wurden die COS-7 Zellen in einer Zelldichte von 9×10^5 ausplattiert. Die Zählung geschah nach Trituration in Kulturmedium mit einer Zählkammer. Es wurde Antibiotika-freies Medium verwendet. Die Transfektion erfolgte mithilfe des Transfektionsreagenzes *Fugene 6* (Roche) nach Herstellerangaben. Hierzu wurden je 5µg DNA, 8µl *Fugene 6* und *Opti-MEM* ad 250µl verwendet und nach einer 15minütigen Inkubation auf die vorbereiteten Zellen gegeben. Die Zellen wurden nach der Transfektion für etwa 48Std inkubiert.

II.2.3d) Kultivierung und Transfektion von Hippocampus-Neuronen

Transfizierte Hippocampus-Neuronen wurden freundlicherweise von Frau PD Dr. rer. nat. Evita Mohr, Institut für Neuroanatomie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, zur Verfügung gestellt.

II.2.3e) Fixierung und Permeabilisierung von Zellen auf Deckgläschen

Alle Schritte wurden in 30mm Petrischalen oder 12-Loch-Platten durchgeführt. Zur Fixierung der Zellen wurden die Zellen nach Absaugen des Mediums zunächst 1x in PBS gewaschen. Dann erfolgte die Zugabe von je 1ml Fixans (4% Paraformaldehyd in PBS) und 15minütige Inkubation. Im Anschluss wurde 2x 5min in PBS gewaschen,

sodann wurden die Deckgläschen zum Permeabilisieren 5min in 0,3% Triton X-100 in PBS inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen in der Waschlösung für bis zu 7 Tage bei 4°C gelagert oder direkt für immuncytochemische Analysen eingesetzt.

II.2.3f) Immuncytochemie

Die Technik der Immuncytochemie basiert auf der Antigen-Antikörper-Reaktion. Sie macht es möglich, Proteine in verschiedenen kultivierten Zelllinien zu detektieren und sie einzelnen Kompartimenten zuzuordnen. Unter bestimmten Umständen ist es möglich, eine Aussage zur eventuellen Ko-Lokalisation mit anderen Proteinen zu treffen.

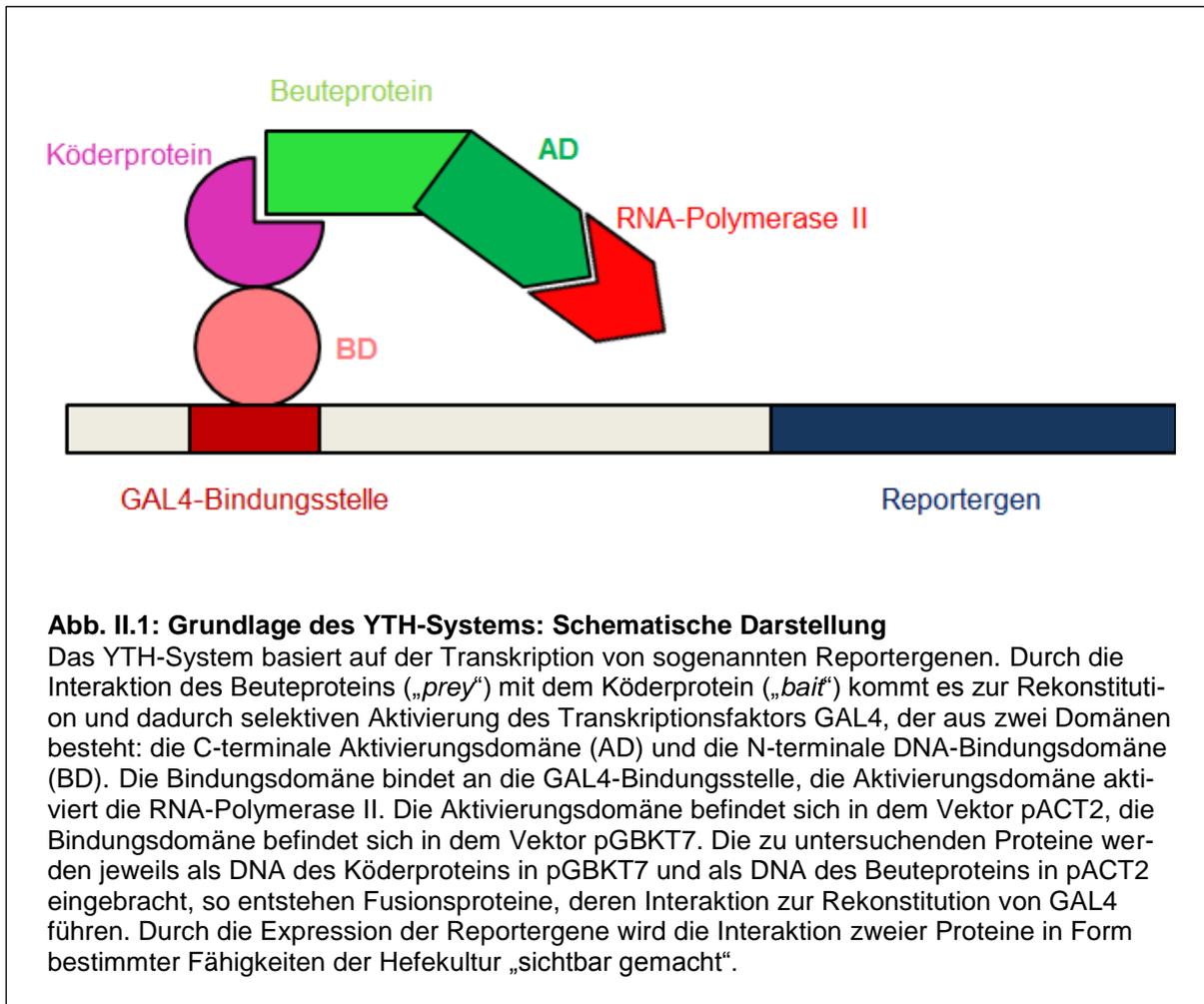
Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden zunächst Objektträger mit Parafilm belegt und mit ca. 50µl Blockierlösung versehen. Die Deckgläschen mit den fixierten Zellen wurden luftblasenfrei aufgelegt und ca. 60min bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert.

Anschließend wurden die Deckgläschen vom Objektträger genommen. Dieser wurde vor dem Auftragen des in 50µl Blockierlösung verdünnten Primärantikörpers (vgl. Tab. II.1) mit Zellstoff gereinigt. Das Deckgläschen wurde nun wieder aufgelegt und über Nacht bei 4°C in der feuchten Kammer inkubiert. Nach einem Waschschrift von 2 x 5min und 1 x 15min in TBS wurden die Objektträger mit frischem Parafilm belegt und mit 50µl des ebenfalls in Blockierlösung verdünnten Zweitantikörpers (vgl. Tab. II.2) versehen. Es folgte eine weitere Inkubation von 60min, bei Verwendung eines mit Fluorochrom gekoppelten Zweitantikörpers im Dunkeln. Anschließend wurde erneut 2 x 5min und 2 x 10min in TBS gewaschen. Zum Eindeckeln wurden etwa 10µl Antifade-Gold + DAPI auf frische Objektträger pipettiert und die Deckgläschen aufgelegt. 24Std später konnten die Präparate gereinigt und unter dem Mikroskop betrachtet werden. Die Lagerung erfolgte kühl und dunkel.

II.2.4 Detektion von Protein-Protein-Interaktionen mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid-Systems (*yeast-two-hybrid*, YTH)

Das YTH-System wird angewandt, um mögliche Interaktionspartner eines bestimmten Proteins zu finden bzw. Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vivo* zu untersu-

chen (Fields und Song 1989). Dieses Experiment wird in der Regel in Kulturen der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt. Grundlage ist die selektive Aktivierung des Transkriptionsfaktors GAL4, der aus zwei Domänen besteht: die C-terminale Aktivierungsdomäne (GAL4-AD) und die N-terminale DNA-Bindungsdomäne (GAL4-BD). Die beiden Domänen sind auch dann wirksam, wenn sie von zwei unterschiedlichen Proteinen über nicht-kovalente Protein-Protein-Interaktionen zusammengebracht werden. Die DNA-Sequenzen der zwei zu untersuchenden Proteine werden also in jeweils einen in der Hefe kompatiblen Vektor gebracht, der die kodierende Sequenz für die GAL4-DNA-Bindungsdomäne (Vektor pGBKT7) bzw. die Sequenz für die GAL4-Aktivierungsdomäne (Vektor pACT2) enthält. Nach Transkription und Translation entstehen zwei Fusionsproteine: In diesem Fall das Köderprotein („*bait*“) Synaptopodin und die GAL4-DNA-Bindungsdomäne, sowie das Beuteprotein AIDA-1 („*prey*“) und die GAL4-Aktivierungsdomäne. Im Falle einer Interaktion der beiden Proteine kommt es zur Rekonstitution des Transkriptionsfaktors GAL4 und darauf hin zur Expression eines oder mehrerer Reporter-gene (vgl. Abb. II.1). Diese können der Kultur zum Beispiel die Fähigkeit geben, bestimmte Substanzen (in diesem System Adenin und Histidin) selbst zu synthetisieren, so dass sie auf einem Mangelnährboden wachsen kann, die eben diese Substanzen nicht enthält (auxotrophes Reporter-gen). Ein weiteres Reporter-gen ist das sogenannte lacZ-Gen, dessen Expression die Zelle befähigt, β -Galaktosidase zu synthetisieren, die das Substrat X-Gal zu 5-Brom-4Chlorindol umsetzt, dass nach Oxidation einen blauen Indigo- Komplex bildet. Nach Ausstreichen der Hefekultur auf einem 5-Brom-4Chlorindol-haltigen Nährboden färbt diese sich im Falle einer Genexpression blau (chromogenes Reporter-gen).



II.2.4a) Kultivierung von Hefezellen

Ein kleiner Tropfen des bei -80°C in 25% Glycerin gelagerten Hefestammes wurde auf einer YPD-Agarplatte ausgestrichen. Nach 3-5tägiger Inkubation bei 30°C wurde die gut bewachsene Platte (in der Mehrzahl Kolonien mit einem Durchmesser von etwa 2mm) bis zu vier Wochen im Kühlschrank gelagert. Alle vier Wochen wurde eine große Kolonie auf einer frischen YPD-Agarplatte ausgestrichen und erneut 3-5 Tage bei 30°C inkubiert.

II.2.4b) Transformation von Hefezellen

Die Transformation von Hefezellen wurde nach der Lithium-Acetat-Methode (*Yeast Protocols Handbook*, Clontech) durchgeführt.

Es wurde zunächst eine 3ml-Flüssigkultur (YPDA-Vollmedium) mit einer Kolonie des Hefestammes AH109 angeimpft und 8Std bei 30°C , 150rpm geschüttelt. Anschließend wurden 5 μl der Kultur in 50ml YPDA-Medium überführt und weitere 16-20Std in gleicher Weise inkubiert. Nach Erreichen einer OD_{600} (*optical density*) von 0.15-0.3 und Zentrifugation (Zentrifuge Minifuge GL, Heraeus, 5min, 700g bei Raumtemperatur) wurden die Zellen in 100ml YPDA-Medium resuspendiert. und erneut 3-5Std inkubiert, um die logarithmische Wachstumsphase ($\text{OD}_{600} = 0.4-0.5$) zu erreichen.

Mit dem Hefestamm Y187 wurde leicht abgewandelt verfahren. Auch hier wurde eine 3ml-Flüssigkultur (YPDA-Vollmedium) mit einer Kolonie des Hefestammes angeimpft und 8Std bei 30°C , 150rpm geschüttelt. Anschließend wurden 5 μl der Kultur in 50ml YPDA-Medium überführt und ca. 23Std in gleicher Weise inkubiert, bis die logarithmische Wachstumsphase ($\text{OD}_{600} = 0.4-0.5$) erreicht war.

Das weitere Vorgehen war für beide Stämme gleich.

Nach erneuter Zentrifugation bei 700g für 5min bei Raumtemperatur wurden die Kulturen auf je 250ml-Falcon-Reagenzgefäße verteilt und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in je 30ml H_2O resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (15sec, Raumtemperatur) wurde wieder der Überstand abgenommen, die Zellen in je 1,5ml 1.1xTE/LiAc resuspendiert und in 1,5ml-Reagenzgefäße überführt. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt, nach der zweiten Wiederholung wurden die Zellen in frische 1,5ml-Reagenzgefäßen auf Eis in je 600 μl 1.1xTE/LiAc resuspendiert.

Für die Transformation der Hefezellen wurde zunächst die *herring testes carrier* DNA (10µg/µl, Clontech) zur Denaturierung bei 95-100°C für 5min inkubiert und bis zur Benutzung auf Eis gelegt. Es wurden sodann 50µl der Hefezellen mit je 100ng Plasmid-DNA und 5µl der *herring testes carrier* DNA in ein vorgekühltes Reagenzgefäß gebracht und vorsichtig vermischt. Dann wurden 0,5ml PEG/LiAc hinzugefügt und für 30min bei 30°C inkubiert. Im Anschluss wurden 20µl DMSO hinzugefügt und der Ansatz 15min bei 42°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 15sec bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde abgenommen, die Zellen in 1ml YPD resuspendiert und erneut 15sec zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes erfolgte die Resuspension in ml 0,9%NaCl. Die transformierten Zellen konnten nun in verschiedenen Verdünnungen (unverdünnt, 1:10, 1:100) auf YPD-Agarplatten ausgestrichen werden.

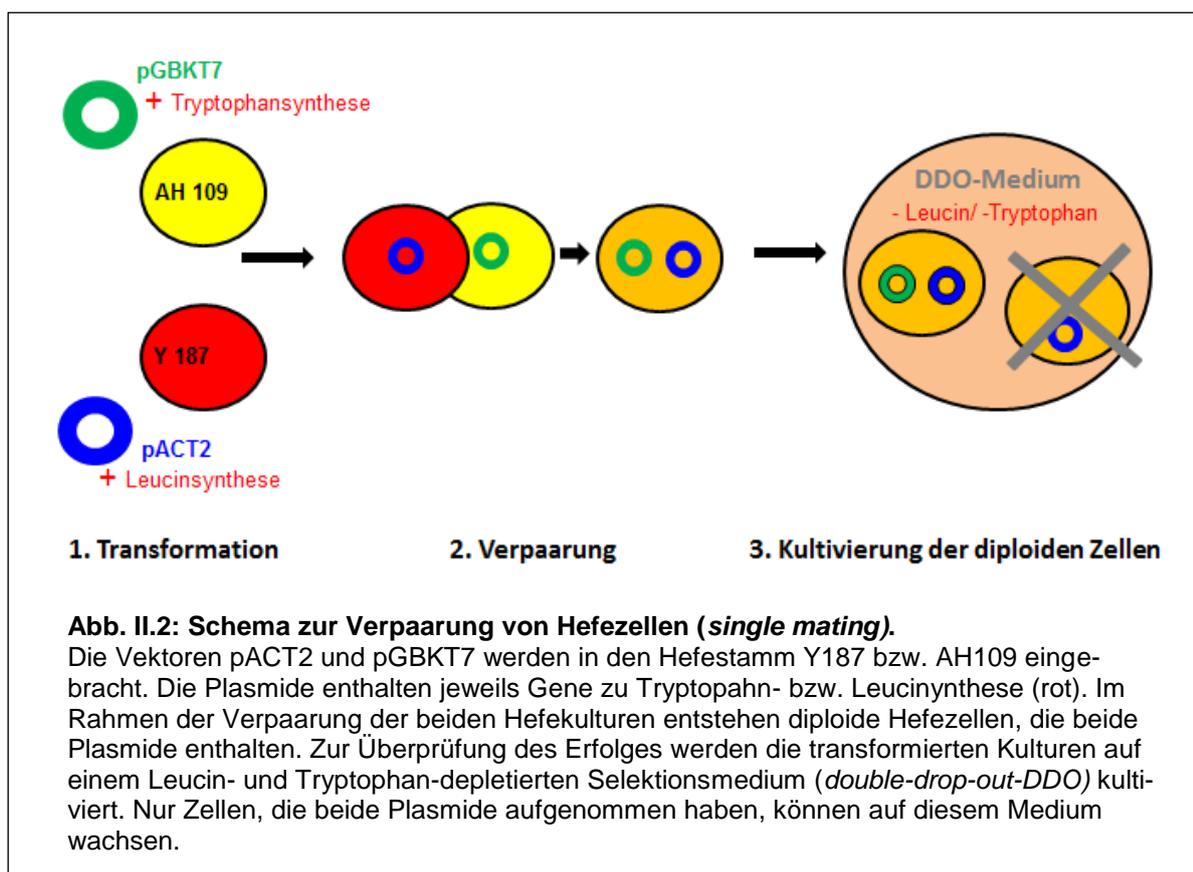
II.2.4c) Verpaarung von Hefezellen

Die Fähigkeit der Hefen, sich sexuell durch Paarung zu vermehren, macht man sich in diesem Experiment zu Nutze, um Protein-Protein-Interaktionen zu untersuchen. Diese Methode funktionierte effizienter als die Ko-Transformation und war somit vorzuziehen. Die DNA-Sequenzen der zu untersuchenden Proteine wurden zunächst in die Vektoren pGBKT7 bzw. pACT2 inseriert. Der Hefestamm AH 109 wurde mit pGBKT7 und der Hefestamm Y187 mit pACT2 transformiert. Sodann wurde die Verpaarung (*single mating*) durchgeführt. Hierbei entstanden diploide Hefezellen, die beide Plasmide enthielten.

Zur Verpaarung wurde ein 1,5ml-Reagenzgefäß mit 500µl YPDA befüllt und mit einer etwa 2-3mm große Kolonie von jeder der zwei transformierten Hefestämme beimpft. Es folgte eine Inkubation bei 150rpm und 30°C für 20-24Std.

100µl der verpaarten Kultur wurden in zwei Verdünnungen (1:10 und 1:100) auf den jeweiligen Selektionsmedien ausgestrichen. Nach 3-5 Tagen Inkubation bei 30°C wurde das Ergebnis abgelesen. Auf dem Leucin- und Tryptophan-depletierten Medium (*double-drop-out-/* DDO-Medium) konnten nun nur jene Zellen wachsen, bei denen eine Verpaarung stattgefunden hatte und die somit beide Vektoren beinhalteten. Die verwendeten Vektoren besitzen nämlich Gene, die als Selektionsmarker dienen. pGBKT7 enthält ein Gen, das für ein Enzym zur Leucinsynthese kodiert, pACT2 enthält ein Gen, das für ein Enzym zur Tryptophansynthese kodiert. Somit sind nur He-

fezellen, die beide Plasmide enthalten, in der Lage, auf dem Selektionsmedium zu wachsen. Eine schematische Darstellung zeigt die Abbildung II.1. Im Falle einer Interaktion der beiden Proteine zeigt sich ein Wachstum auch auf dem *quadrouple-drop-out* (QDO)-Medium. Ihm fehlen Adenin, Histidin, Leucin und Tryptophan (SD-Ade-/His-/Leu/-Trp). Ein Wachstum auf dem Leucin-/ Tryptophan-/ Adenin-/ Histidin-depletierten Medium (*quadrouple-drop-out-medium*, QDO-Medium) zeigte eine Interaktion der zwei untersuchten Proteine an. Diese Kolonien wurden nochmals auf einem SD-/Leu/-Trp/-Ade-/His/X-alpha Gal-depletierten Medium (QDO-X-Alpha Gal-Medium) ausgestrichen. Eine Blaufärbung der Kolonien war ein weiterer Indikator für die Interaktion.



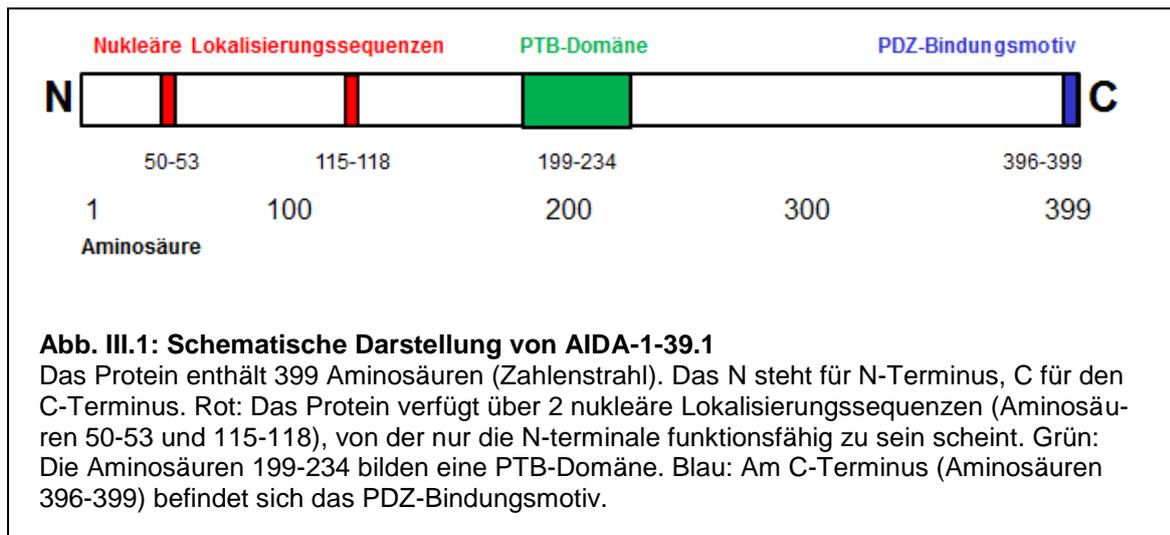
III. ERGEBNISSE

Die durch die Arbeitsgruppe Mohr (Dissertation Björn Meyer-Hiemer, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Institut für Neuroanatomie, in Vorbereitung) durchgeführten Experimente im YTH-System zeigten eine Interaktion von Synaptopodin mit einer bisher nicht beschriebenen Form des AIDA-1-Proteins. Die identifizierte Sequenz kodiert für eine am N-terminalen Ende unvollständige Isoform und wird AIDA-1-39.1 genannt. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, AIDA-39.1 näher zu charakterisieren.

III.1 CHARAKTERISIERUNG VON AIDA-1-39.1

Die identifizierte, bisher nicht beschriebene AIDA-Isoform, AIDA-1-39.1, kodiert für ein Protein mit 399 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 44,8 kDa. Es beinhaltet zwei putative nukleäre Lokalisierungssequenzen (NLS), eine PTB-Domäne und am C-Terminus eine Bindungsstelle für Proteine mit PDZ-Domänen. Es enthält im Gegensatz zu anderen in der Literatur beschriebenen (vgl. Ghersi et al. 2004b, Abb. 1a; Jordan et al. 2004, 2007) keine Ankyrin-*repeats* und keine SAM-Domänen (schematische Darstellung von AIDA 1-39.1 in Abb. III.1). In dieser AIDA-Isoform scheint nur eine der zwei NLS, nämlich die N-terminale (Aminosäure 50-53, HRKR), funktionell zu sein (Jordan et al. 2007).

Dieses Protein weist einen unvollständigen N-Terminus mit fehlendem ATG-Startcodon auf und repräsentiert vermutlich eine neue Spleißvariante der bereits beschriebenen AIDA-Isoformen (vgl. Ghersi et al. 2004a, b; Jordan et al. 2007). Am ähnlichsten ist diese Variante dem AIDA-1d (Ratte) und dem Cajalin-2b (Mensch). In der Datenbank befindet sich ein weiteres Protein, das AIDA-1-39.1 ähnlich ist und einen Teil der N-terminalen Sequenz enthält. Hierbei handelt es sich um eine Cajalin-2- Teilsequenz, der die Aminosäuren 128-162 fehlen. Zur Veranschaulichung zeigt Abb. III.2 einen Vergleich der genannten Proteinsequenzen mit AIDA-1-39.1 (vgl. Jordan et al. 2007, Abb. 1).



AIDA 1d (Ratte)	112	PTSVAEWLDSIELGDYTKAFLINGYTSMDLLKKIWELELVNVLKISLIG
Cajalin-2b (Mensch)	112	PTSVAEWLDSIELGDYTKAFLINGYTSMDLLKKIWEYELINVLKINLIG
Cajalin 2 (Mensch)	1	QKDAQRQLGERRFKPHVCVLGGQSPALADPGSRPARAARVLKINLIG
AIDA-1.39.1 (Mensch)	1	QKDAQRQLGERRFKPHVCVLGGQSPALADPGSRPARAARVLKINLIG
AIDA 1d (Ratte)	161	HRKRILASLGDR LHDDPPQKPPRSITLLREPSGNHTPPQLSPSLSQSTY
Cajalin-2b (Mensch)	161	HRKRILASLGDR LHDDPPQKPPRSITLLREPSGNHTPPQLSPSLSQSTY
Cajalin 2 (Mensch)	50	HRKRILASLGDR LHDDPPQKPPRSITLLREPSGNHTPPQLSPSLSQSTY
AIDA-1.39.1 (Mensch)	50	HRKRILASLGDR LHDDPPQKPPRSITLLREPSGNHTPPQLSPSLSQSTY
AIDA 1d (Ratte)	210	TTGGSLDVPHIIMQGDARRRRNENYFDDIPRSKLERQMAQQSSVCEIWT
Cajalin-2b (Mensch)	210	TTGGSLDVPHIIMQGDARRRRNENYFDDIPRSKLERQMAQ-SSVCEIWT
Cajalin 2 (Mensch)	100	TTGGSLDVPHIIMQGDARRRRNENYFDDIPRSKLERQMAQ-----
AIDA-1.39.1 (Mensch)	100	TTGGSLDVPHIIMQGDARRRRNENYFDDIPRSKLERQMAQQSSVCEIWT
AIDA 1d (Ratte)	259	NQNAGFPFSAIHQVHNTGDWGEPSITLRPPNEATASTPVQYWQHHPKEL
Cajalin-2b (Mensch)	259	NQNAGFPFSAIHQVHNTGDWGEPSITLRPPNEATASTPVQYWQHHPKEL
Cajalin 2 (Mensch)	150	-----TGDWGEPSITLRPPNEATASTPVQYWQHHPKEL
AIDA-1.39.1 (Mensch)	150	NQNAGFPFSAIHQVHNTGDWGEPSITLRPPNEATASTPVQYWQHHPKEL
AIDA 1d (Ratte)	308	IFQSCDYKAFYLGSMLIKELRGTESTQDACA KMRANCQKSTEQMKKVPT
Cajalin-2b (Mensch)	308	IFQSCDYKAFYLGSMLIKELRGTESTQDACA KMRANCQKSTEQMKKVPT

ERGEBNISSE

Cajalin 2 (Mensch) 200 IFQ**SCDYKAF**YLGSMLIKELRGTESTQDACAKMRANCQKSTEQMKKVPT
AIDA-1.39.1 (Mensch) 200 IFQ**FSCDYKA**YLGSMLIKELRGTESTQDACAKMRANCQKSTEQMKKVPT

AIDA 1d (Ratte) 357 IILSVSYKGVKFIDATNKNI**IAEHEIRNISCAAQDPEDLSTFAYITKDL**
Cajalin-2b (Mensch) 357 IILSVSYKGVKFIDATNKNI**IAEHEIRNISCAAQDPEDLSTFAYITKDL**
Cajalin 2 (Mensch) 250 IILSVSYKGVKFIDATNKNI**IAEHEIRNISCAAQDPEDLSTFAYITKDL**
AIDA-1.39.1 (Mensch) 250 IILSVSYKGVKFIDATNKNI**IAEHEIRNISCAAQDPEDLSTFAYITKDL**

AIDA 1d (Ratte) 406 **KSNHHYCHVFTAFDVLNLAYEII**LLTLGQAFEVAYQLALQARKGGHSSTLP
Cajalin-2b (Mensch) 406 **KSNHHYCHVFTAFDVLNLAYEII**LLTLGQAFEVAYQLALQARKGGHSSTLP
Cajalin 2 (Mensch) 300 **KSNHHYCHVFTAFDVLNLAYEII**LLTLGQAFEVAYQLALQARKGGHSSTLP
AIDA-1.39.1 (Mensch) 300 **KSNHHYCHVFTAFDVLNLAYEII**LLTLGQAFEVAYQLALQARKGGHSSTLP

AIDA 1d (Ratte) 455 **EGFENKPSKPIPKPRVSIRKSVQ**IDPSEQKTLANLPWIVEPGQEAKRGI
Cajalin-2b (Mensch) 455 **ESFENKPSKPIPKPRVSIRKSVQ**IDPSEQKTLANLPWIVEPGQEAKRGI
Cajalin 2 (Mensch) 350 **ESFENKPSKPIPKPRVSIRKSVQ**IDPSEQKTLANLPWIVEPGQEAKRGI
AIDA-1.39.1 (Mensch) 350 **ESFENKPSKPIPKPRVSIRKSV**-IDPSEQKTLANLPWIVEPGQEAKRGI

AIDA 1d (Ratte) 504 NTKY**ETTIF**
Cajalin-2b (Mensch) 504 NTKY**ETTIF**
Cajalin 2 (Mensch) 390 NTKY**ETTIF**
AIDA-1.39.1 (Mensch) 390 NTKY**ETTIF**

Abb. III.2: Vergleich der AIDA-Isoform 1d (Ratte) und der Cajalin-Isoformen 2b (Mensch) und 2 (Mensch) mit der neu beschriebenen AIDA-Isoform 1-39.1 (Mensch), vgl. Jordan et al. 2007.

Genbank Accession-Nummern:

AIDA-1d(Ratte): AM_980945

Cajalin-2b (Mensch): AY 356353.1

Cajalin-2 (Mensch): AY 356353.1

AIDA-1.39.1 (Mensch): AM_980945

Magenta: AIDA-1-39.1 und Cajalin-2 verfügen über eine identische N-terminale Sequenz, diese kommt in keiner der bisher beschriebenen AIDA-Varianten vor.

Rot: Unterschiede einzelner Aminosäuren zwischen den gezeigten Proteinen.

Hellblau: Putative nukleäre Lokalisierungssequenzen (NLS).

Unterstrichen: Immunisierungspeptid (α -AIDA-Antikörper; Zymed/Invitrogen, vgl. Jacob et al. 2010)

Gelb: Fehlende Sequenz im Cajalin-2

Grün: PTB-Domäne

Dunkelblau: Bindungsstelle für Proteine mit PDZ-Domänen

III.2 IMMUNCYTOCHEMISCHE ANALYSEN ZUR SUBZELLULÄREN LOKALISATION VON AIDA-1-39.1

Die Technik der Immuncytochemie basiert auf der Antigen-Antikörper-Reaktion. Sie macht es möglich, Proteine in verschiedenen kultivierten Zelllinien zu detektieren und sie einzelnen Kompartimenten zuzuordnen. Unter bestimmten Umständen ist es möglich, eine Aussage zur eventuellen Ko-Lokalisation mit anderen Proteinen zu treffen. Hierzu werden kultivierte Zellen mit der für das zu untersuchende Protein kodierenden cDNA transfiziert. Ein spezifischer Antikörper erkennt einen Teil des Proteinproduktes und bindet kovalent an das Protein. Durch Zugabe eines an ein Fluorochrom gebundenen Zweitantikörpers, der den Erstantikörper detektiert, wird das Protein in der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht. Es ist außerdem möglich, eine cDNA in ein Plasmid einzubringen, das bereits ein Fluorochrom enthält oder das Proteinprodukt mit einem bereits fluoreszierenden Erstantikörper sichtbar zu machen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Immuncytochemie genutzt, um die Lokalisation von AIDA-1-39.1 in der humanen Zelllinie HEK 293 sowie in hippocampalen Neuronen der Ratte darzustellen. Zudem wurden die Targetingsequenzen von AIDA-1-39.1, die für die subzelluläre Lokalisation des Proteins erforderlich sein könnten, charakterisiert.

III.2.1 Expression von AIDA-1-39.1 in der eukaryontischen Zelllinie HEK 293

Zur Untersuchung der Expression von AIDA-1-39.1 in eukaryontischen Zelllinien wurde die cDNA in das Plasmid pcDNA3-T7-*tag* inkloniert. Sodann wurden kultivierte HEK 293-Zellen mit dem beschriebenen Plasmid transfiziert. Es wurde ein Primärantikörper aus der Maus verwendet, der das T7-*tag* erkennt. Die Inkubation mit einem Cy3-markierten monoklonalen Ziege-anti-Maus-Sekundärantikörper machte den Protein-Antikörper-Komplex in der Fluoreszenzmikroskopie anhand der roten Fluoreszenz sichtbar. Die Kernmarkierung erfolgte mit DAPI (4',6-Diamidin-2-Phenylindol). Wie die Abbildung III.3 zeigt, ist AIDA-1-39.1 in diesem Experiment überwiegend im Kern, schwach auch im Cytosol lokalisiert.

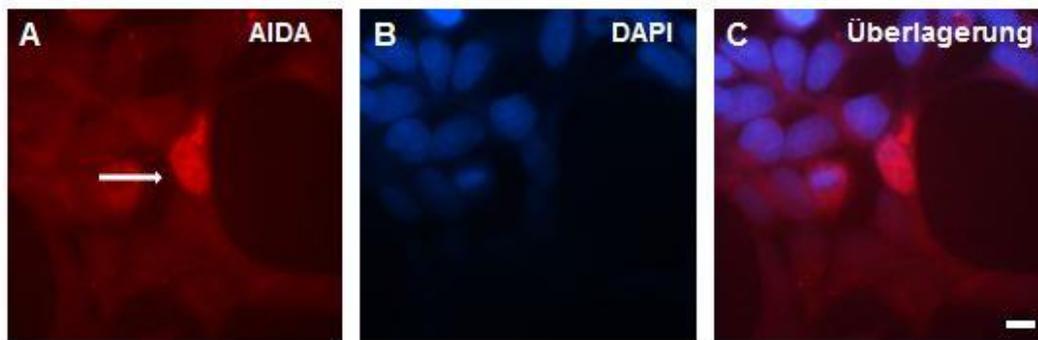


Abb. III.3: AIDA-1-39.1 ist in HEK 293-Zellen überwiegend im Zellkern lokalisiert.

Die cDNA von AIDA-1-39.1 wurde in das Plasmid pcDNA3-T7-tag einkloniert. Sodann wurde die Transfektion von HEK 293 mit dem genannten Plasmid durchgeführt. Die immunocytochemische Analyse erfolgte mit einem Primärantikörper aus der Maus, der das T7-tag erkennt, als Sekundärantikörper wurde ein monoklonaler, Cy3-markierter Ziege-anti-Maus-Antikörper verwendet. Die Zellkernmarkierung erfolgte mit DAPI.

A: AIDA-39.1 ist hauptsächlich im Zellkern (Pfeil), weniger auch im Cytosol, lokalisiert.

B: Markierung der Zellkerne mit DAPI.

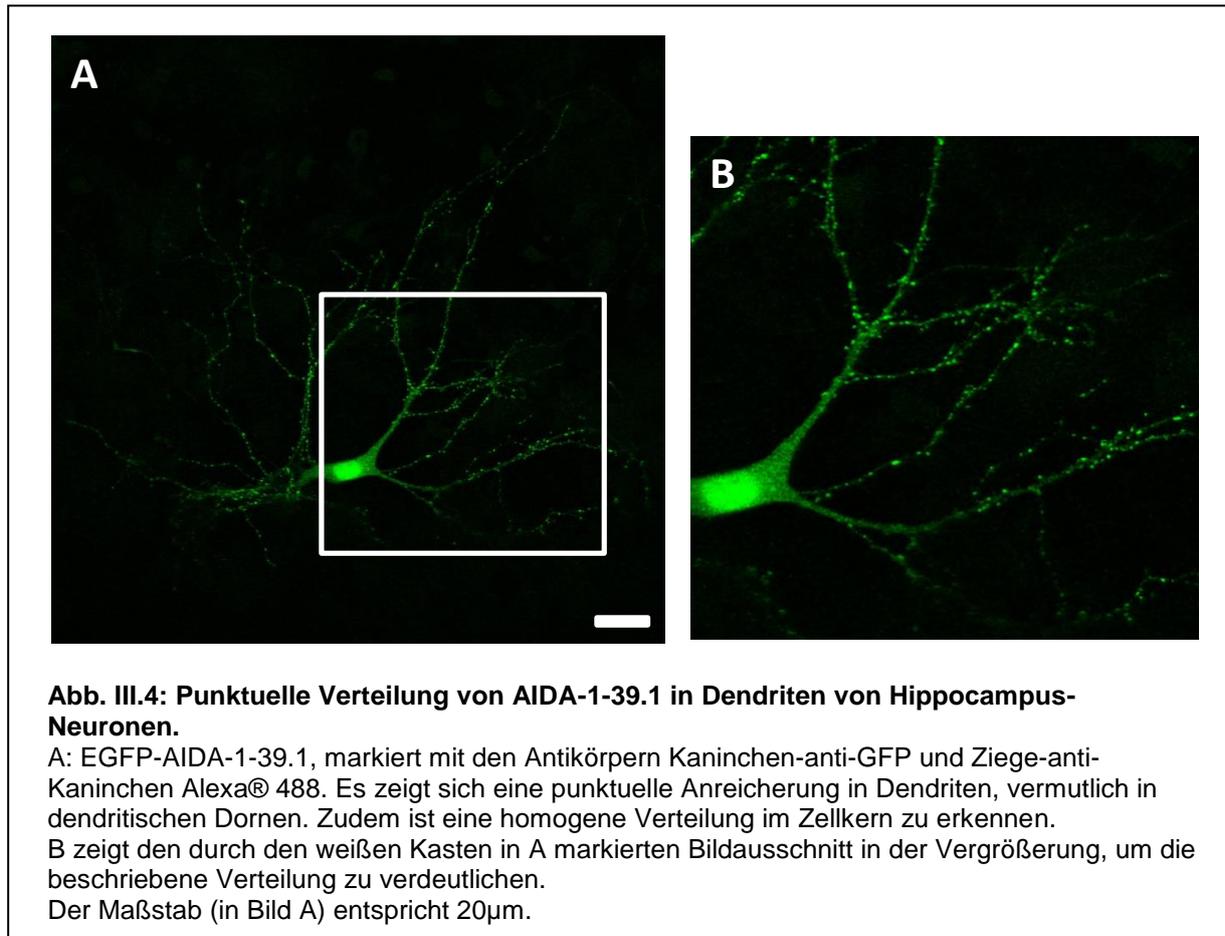
C: Überlagerung.

Der Maßstab (Bild C) entspricht 20µm.

III.2.2 Expression von AIDA-1-39.1 in kultivierten Hippocampus-Neuronen der Ratte

Analog zum Experiment in der eukaryontischen Zelllinie wurde für die Expression von AIDA-1-39.1 in kultivierten Hippocampus-Neuronen von neugeborenen Ratten ein EGFP-AIDA-1-39.1 Konstrukt hergestellt. EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) zeigt in der Fluoreszenzmikroskopie eine grüne Färbung. Es wurden der primäre Kaninchen-anti-GFP- und ein Alexa® 488-markierter Ziege anti-Kaninchen-Sekundärantikörper verwendet.

Wie die Abbildung III.4 zeigt, konnte in diesen Hippocampus-Neuronen eine punktuelle Verteilung von AIDA-1-39.1 in den Dendriten, vermutlich in den dendritischen Dornen, gezeigt werden. Es akkumulierte zudem im Zellkern. Hier zeigte sich eine homogene Verteilung.

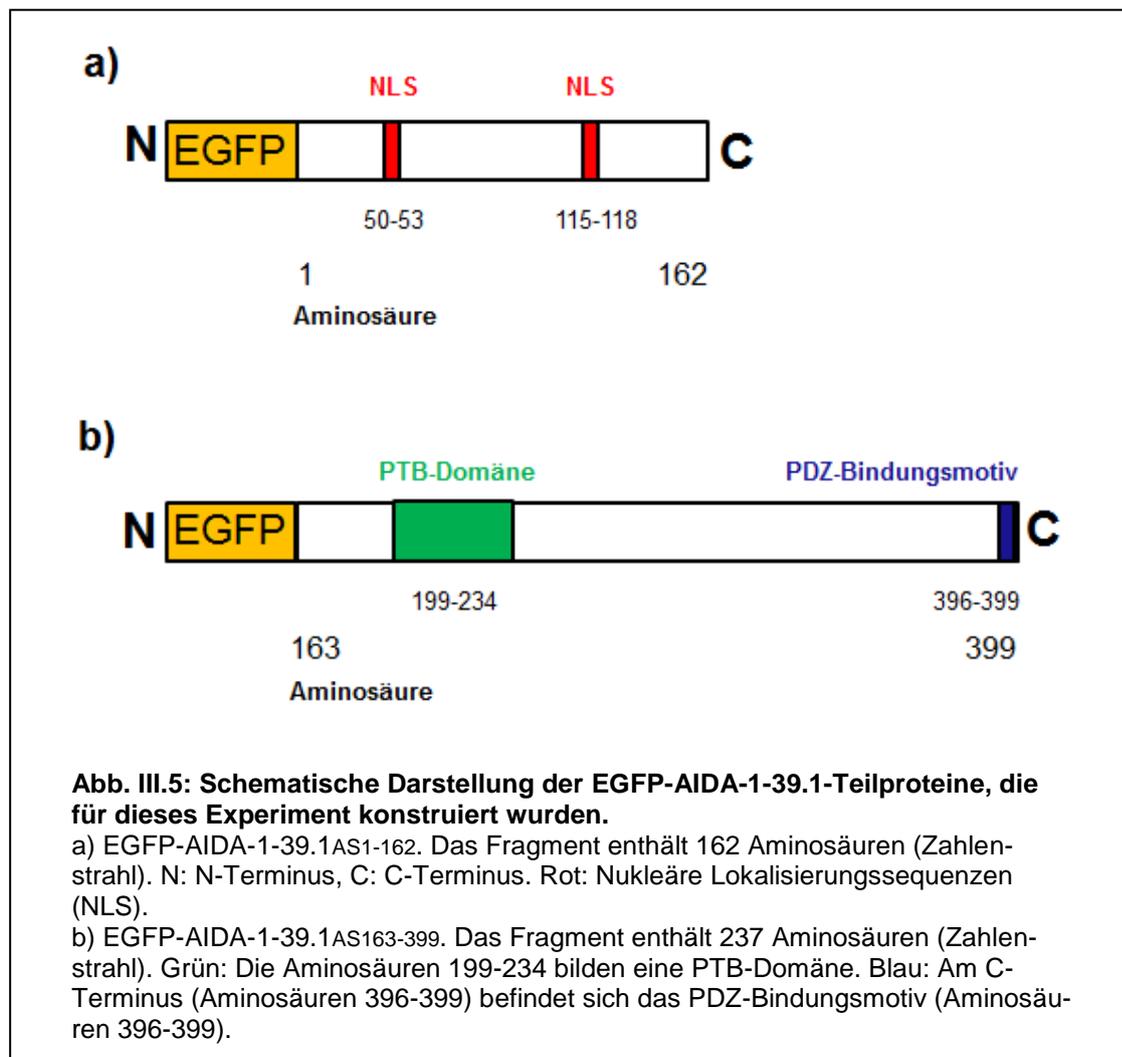


III.2.3 Charakterisierung der Targetingsequenzen von AIDA-1-39.1, die für die subzelluläre Lokalisation des Proteins erforderlich sein könnten

In Hippocampus-Neuronen konnte sowohl eine Expression von AIDA-1-39.1 in Dendriten und dendritischen Dornen als auch eine homogene Verteilung des Proteins im Zellkern gezeigt werden. Um die Targetingsequenzen innerhalb des Proteins, die für den Transport in diese Regionen notwendig sind, näher zu charakterisieren, wurden zwei verschiedene DNA-Konstrukte, die Teilsequenzen des Proteins kodieren, hergestellt. Das erste Konstrukt kodierte den N-terminalen Teil von AIDA-1-39.1 mit den Aminosäuren 1-162, das zweite Konstrukt kodierte den C-terminalen Teil mit den Aminosäuren 163-399, einschließlich des PDZ-Bindungsmotivs und der PTB-Domäne. Es wurde für diese Konstrukte der Vektor pEGFP-C2 gewählt, so dass beide Proteine als EGFP-Fusionsproteine vorlagen (Abb. III.5). Wieder wurden Hippocampus-Neurone von neugeborenen Ratten mit den Konstrukten transfiziert und so-

dann immuncytochemische Analysen durchgeführt. Zur Detektion wurden ein Kaninchen-anti-GFP Primärantikörper und ein Alexa® 488-markierter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper verwendet. Für das N-terminale Fragment von AIDA-1-39.1 zeigte sich eine homogene Verteilung in der Zelle (Abb. III.6 A, B).

In Zellen, die das C-terminale Fragment von AIDA-1-39.1 exprimierten, zeigte sich ein Verteilungsmuster, das dem des gesamten Proteins (vgl. Abb. III.4) ähnelte. Hier war es punktuell in Dendriten und dendritischen Dornen lokalisiert (Abb. III.6 C, D). Dieses Fragment enthält das PDZ-Bindungsmotiv. Das Ergebnis könnte ein Hinweis darauf sein, dass das PDZ-Bindungsmotiv möglicherweise notwendig sein könnte, um das Protein in dendritischen Dornen an Proteinen mit PDZ-Domänen zu fixieren.



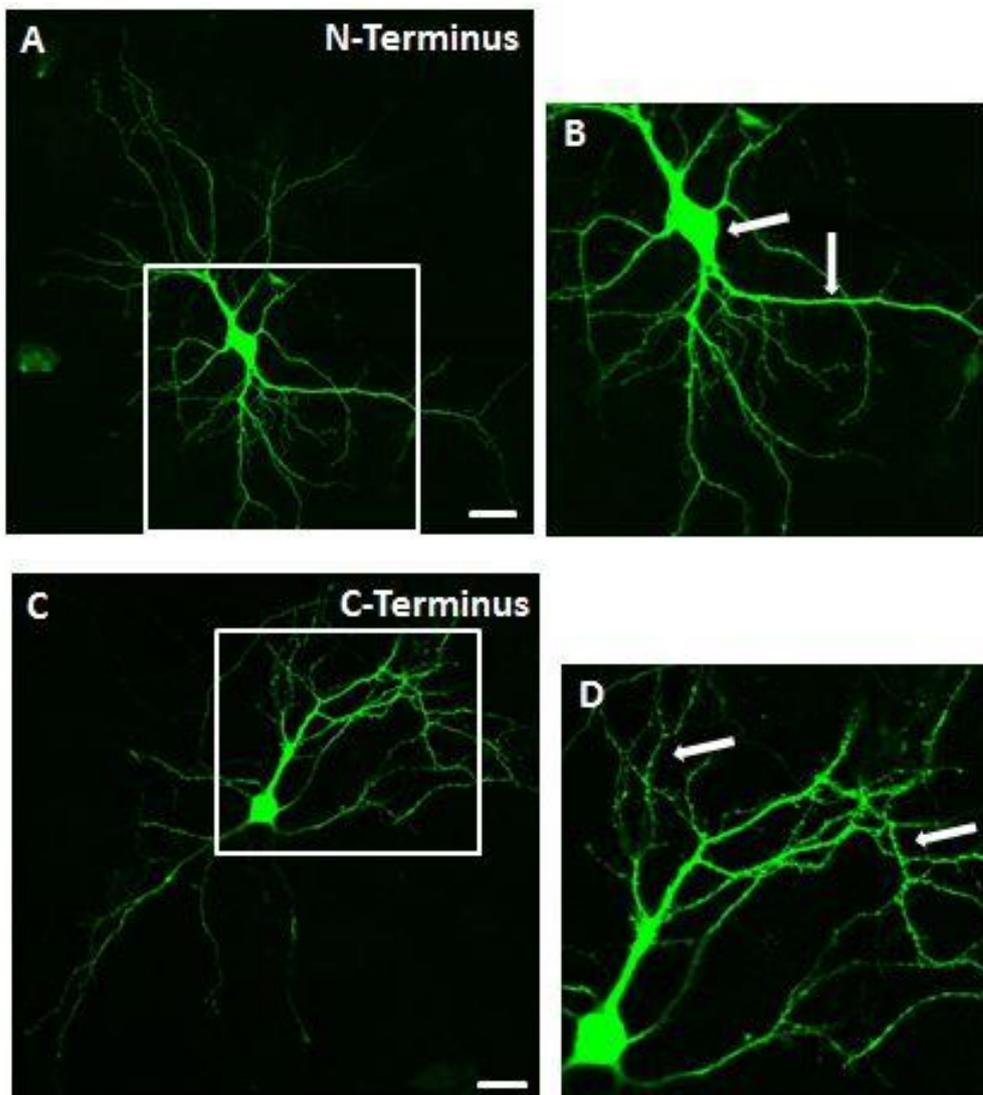


Abb. III.6: Subzelluläre Verteilung von EGFP-AIDA-1-39.1AS1-162 und EGFP-AIDA-1-39.1AS163-399

A: Das N-terminale Fragment (EGFP-AIDA-1.39.1AS1-162) zeigt eine homogene Verteilung in der Zelle. Das in den Vektor pEGFP-C2 klonierte Konstrukt kodiert für den N-terminalen Teil von AIDA-1-39.1 mit den Aminosäuren 1-162. Die Markierung erfolgte mit den Antikörpern Kaninchen-anti-GFP und Ziege-anti-Kaninchen-Alexa® 488.

B: Im Bildausschnitt aus A zeigen die Pfeile die homogene Verteilung.

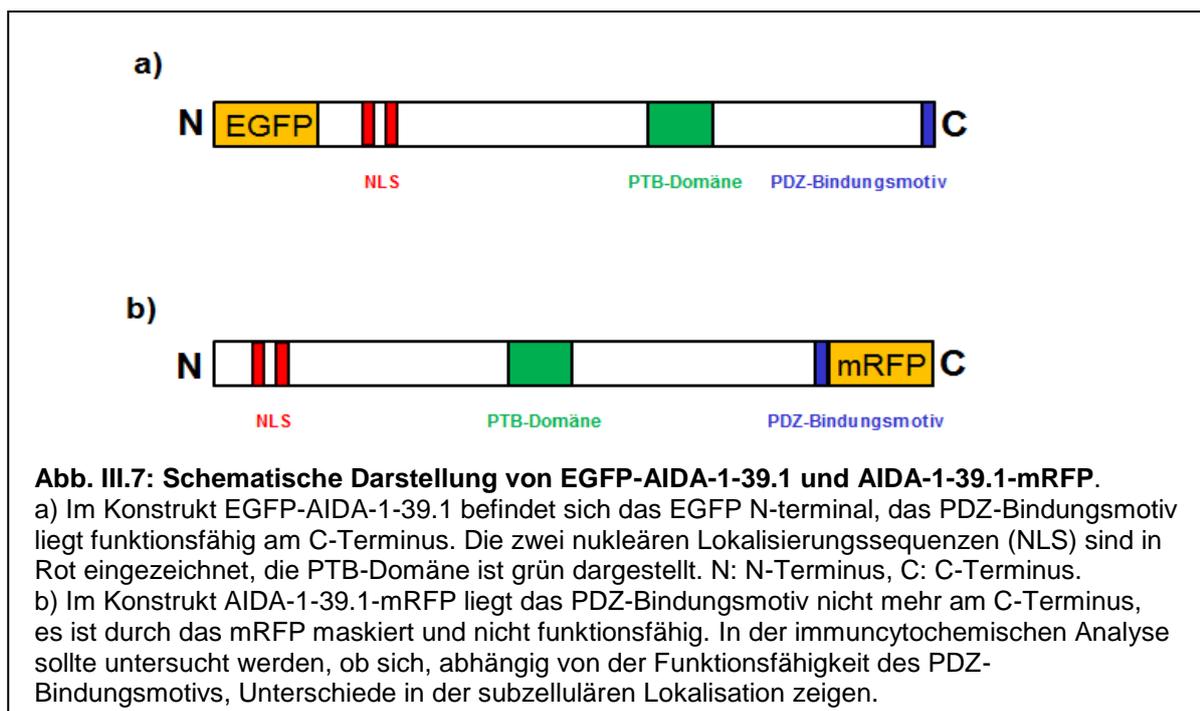
C: Das C-terminale Fragment (EGFP-AIDA-1.39.1AS163-399) ist punktuell in Dendriten und homogen im Zellkern verteilt. Das in den Vektor pEGFP-C2 klonierte Konstrukt kodiert für den C-terminalen Teil von AIDA-1-39.1 mit den Aminosäuren 163-399. Dies enthält das PDZ-Bindungsmotiv. Die Markierung erfolgte mit den Antikörpern Kaninchen-anti-GFP und Ziege-anti-Kaninchen-Alexa® 488.

D: Der Bildausschnitt verdeutlicht die punktuelle dendritische Verteilung (Pfeile). Der Maßstab (Bild A und C) entspricht 20µm.

Ein weiteres Experiment mit hippocampalen Neuronen deutete ebenso darauf hin, dass das PDZ-Bindungsmotiv am C-Terminus von AIDA-1-39.1 im Zusammenhang mit der in der Immunocytochemie beobachteten punktuellen Verteilung im Bereich der Dendriten stehen könnte.

Erneut wurden Neurone mit zwei verschiedenen AIDA-1-39.1 Konstrukten transfiziert. Es wurde erstens das Konstrukt EGFP-AIDA-1-39.1_{AS 1-399} und zweitens das Konstrukt AIDA-1-39.1-mRFP_{AS 1-399} (*monomeric red fluorescent protein*) hergestellt, indem die für das vollständige Protein kodierende cDNA in das jeweilige Plasmid inkloniert wurde. Im Konstrukt AIDA-1-39.1-mRFP_{AS 1-399} lag das mRFP C-terminal, das PDZ-Bindungsmotiv war somit durch mRFP maskiert und nicht mehr funktionsfähig. Im Konstrukt EGFP-AIDA-1-39.1_{AS 1-399} lag das EGFP N-terminal, das PDZ-Bindungsmotiv war hier funktionsfähig. Eine schematische Darstellung der Konstrukte zeigt Abb. III.7. Die Proteine wurden in den Zellen ko-exprimiert.

AIDA-1-39.1-mRFP_{AS 1-399} zeigte sich homogen verteilt (Abb. III.8 A, B). Zur Markierung wurden ein Kaninchen-anti-mRFP-Primärantikörper und ein Cy3- markierter Ziege-anti-Kaninchen- Sekundärantikörper verwendet. Das Protein mit funktionsfähigem PDZ-Bindungsmotiv, EGFP-AIDA-1-39.1_{AS 1-399}, war erneut punktuell in Dendriten, vermutlich in dendritischen Dornen, und homogen im Zellkern zu detektieren (Abb. III.8 C, D). Diese Daten legen nahe, dass das PDZ-Bindungsmotiv für die Verankerung in dendritischen Dornen verantwortlich ist.



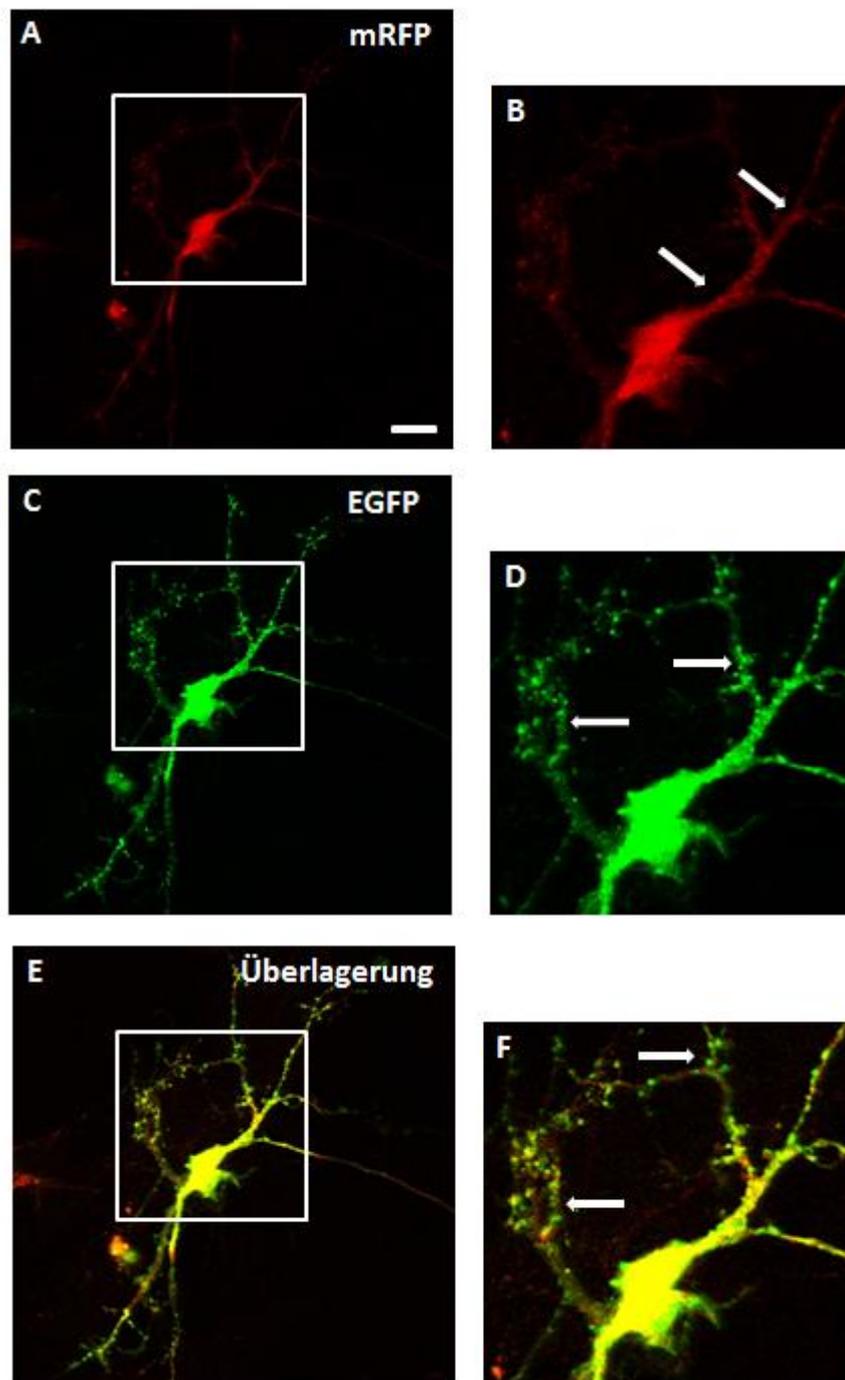


Abb. III.8: Ko-Expression von zwei verschiedenen AIDA-1-39.1-Konstrukten in Hippocampus-Neuronen

A: AIDA-1.39.1-mRFP mit maskiertem PDZ-Bindungsmotiv: Die Verteilung in der Zelle ist homogen. Die Markierung erfolgte mit den Antikörpern Kaninchen-anti-mRFP und Ziege-anti-Kaninchen-Cy3.

B: Der Ausschnitt aus A verdeutlicht die homogene Verteilung (Pfeile).

C: EGFP-AIDA-1-39.1 mit funktionsfähigem PDZ-Bindungsmotiv. Es zeigt sich eine punktuelle Verteilung in den Dendriten und eine homogene Verteilung im Zellkern. Dargestellt ist die EGFP-Autofluoreszenz.

D: Der Ausschnitt aus C verdeutlicht die dendritische Verteilung (Pfeile).

E: Die Überlagerung aus A+C macht die unterschiedliche Verteilung deutlich.

F: Überlagerung aus B und D. Die Pfeile deuten auf die dendritische Lokalisation von EGFP-1-39.1(grün). Hier findet sich kein AIDA-1-39.1mRFP.

Der Maßstab (Bild A) entspricht 20µm.

III.3 UNTERSUCHUNGEN ZUR INTERAKTION VON SYNAPTOPODIN MIT AIDA 1-39.1

III.3.1 Interaktion von Synaptopodin und AIDA-1-39.1. in Hefezellen

III.3.1a) Bestätigung der Interaktion durch Verpaarung

Um potentielle Interaktionspartner für Synaptopodin zu finden, wurde von Björn Meyer-Hiemer (Institut für Neuroanatomie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, AG Mohr, Dissertation in Vorbereitung) das YTH-System verwendet. Es wird genutzt, um mögliche Interaktionspartner für ein Protein zu identifizieren bzw. Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vivo* näher zu untersuchen. Im Zuge dieser Experimente wurde die neue AIDA-Isoform AIDA 1-39.1 als Interaktionspartner für die kurze Isoform des Synaptopodins identifiziert. Diese Interaktion sollte nun ausführlicher charakterisiert werden. Die Fähigkeit von Hefezellen, sich sexuell durch Paarung zu vermehren, wird im YTH-System genutzt, um die Interaktion zweier bestimmter Proteine zu untersuchen. Die Interaktion zwischen Synaptopodin und AIDA-1-39.1 in der Hefekultur wurde durch eine derartige, experimentelle Verpaarung (*single mating*) verifiziert. Die Methode ist im Abschnitt II.2.4 detailliert beschrieben. Die DNA-Sequenz des als Köderprotein dienenden Synaptopodin (*Synpo-short*, kodiert Aminosäuresequenz 2-692), wurde in den Vektor pGBKT7 inseriert. Dieser enthielt die GAL4-Bindungsdomäne. Als Beuteprotein diente AIDA-1-39.1 (kodiert Aminosäuresequenz 1-399), das in den Vektor pACT2 inseriert wurde. pACT2 enthielt die GAL4-Aktivierungsdomäne. So entstanden durch Transkription und Translation zwei Fusionsproteine. Die beiden Konstrukte wurden durch Transformation in die Hefestämme AH 109 (*Synpo-short* in pGBKT7) bzw. Y187 (AIDA-1-39.1 in pACT2) eingebracht. Durch Kultivierung im selben Medium für einen definierten Zeitraum, entstanden diploide Hefezellen, die beide Plasmide enthielten und somit beide Fusionsproteine exprimierten. Das Gelingen der Verpaarung wurde geprüft, indem die Zellen auf *double-drop-out* (DDO-) Medium kultiviert wurden. Diesem Nährboden fehlen die essenziellen Aminosäuren Leucin und Tryptophan. Nur eine Hefezelle, die beide Plasmide, pACT2 und pGBKT7, aufgenommen hat, vermag hier zu wachsen, da die beiden Plasmide Gene besitzen, die für Enzyme zur Leucin- (pGBKT7) und Tryptophan- (pACT2) Synthese kodieren.

Zur Prüfung der Interaktion der beiden Proteine wurden die Zellen auf *quadrouple-drop-out* (QDO)-Medium kultiviert. Diesem Nährboden fehlen die für den Hefestoffwechsel notwendigen Verbindungen Leucin, Tryptophan, Histidin und Adenin. Findet eine Interaktion der beiden Proteine, jeweils als Fusionsprotein mit Aktivierungs- bzw. Bindungsdomäne im jeweiligen Vektor vorliegend, statt, kommt es zur Rekonstitution des GAL4-Transkriptionsfaktors und zur Transkription der Reportergene. Diese kodieren für Enzyme, die die Zelle befähigen, Histidin und Adenin zu synthetisieren. Die Interaktion wird somit als Koloniewachstum „sichtbar gemacht“. Diese Kolonien wurden zusätzlich auf einem QDO-x- α -GAL-Nährboden kultiviert. Dies ist ein mit X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-Galactopyranosid) bestrichener QDO-Nährboden. Hier wird die Interaktion durch Rekonstitution des Reportergens lacZ zur Aktivierung der β -Galaktosidase sichtbar gemacht. Diese katalysiert die Umsetzung des Substrates XGal zu Galactose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl (5-Brom-4-chlor-3-hydroxyindol), das durch Kontakt mit Sauerstoff einen blauen Indigo-Komplex bildet, den Kolonien also eine blaue Färbung geben.

In der Verpaarung konnte die zuvor durch das *YTH-Screening* gezeigte Interaktion von Synaptopodin und AIDA-1-39.1 so bestätigt werden (Tab. III.1).

III.3.1b) Charakterisierung der Interaktion zwischen Synaptopodin und AIDA-1-39.1

Im nächsten Schritt sollten die miteinander interagierenden Domänen der beiden Proteine näher eingegrenzt werden. Hierzu wurden verschiedene Synaptopodin-kodierende Teilsequenzen durch PCR erzeugt, die in das Plasmid pGBKT7 inkloniert wurden. Die DNA-Sequenz der zuvor verwendeten kurzen Form des Synaptopodin (*Synpo-short*, kodiert Aminosäuren 2-692) wurde zunächst in zwei etwa gleich große Hälften geteilt, die jeweils für ein N-terminales Synaptopodin-Teilprotein (Aminosäuren 2-346) und für ein C-terminales Synaptopodin-Teilprotein (Aminosäuren 347-692) kodierten. Diese zwei Teilsequenzen wurden in weiteren Experimenten erneut geteilt, so dass vier weitere DNA-Sequenzen entstanden, die jeweils für ein kurzes Protein-Teilstück von Synaptopodin (*Synpo-short*) kodierten. Für die Experimente wurden also sechs DNA-Sequenzen generiert und in den Vektor pGBKT7 inkloniert (vgl. auch Abb. III.9):

- *Synpo-short*_{AS 2-346} in pGBKT7
- *Synpo-short*_{AS 347-692} in pGBKT7

- Synpo-*short*_{AS 2-173} in pGBKT7
- Synpo-*short*_{AS 174-346} in pGBKT7
- Synpo-*short*_{AS 347-519} in pGBKT7
- Synpo-*short*_{AS 520-692} in pGBKT7

Hefezellen des Stamms AH109 wurden sodann mit den Synaptopodin-Teilsequenzen in pGBKT7 transformiert, Zellen des Stamms Y187 wurden mit AIDA-1.39.1 in pACT2 transformiert. Anschließend folgte die jeweilige Verpaarung der transformierten Hefestämme.

Zunächst wurden die Zellen die Synpo-*short*_{AS 2-346} und Synpo-*short*_{AS 347-692} in pGBKT7 enthielten, mit Zellen, die AIDA-1-39.1 in pACT erhielten, verpaart. Bei beiden Verpaarungen zeigte sich ein positives Ergebnis, das heißt, beide Synaptopodin-Proteinfragmente interagierten in der Hefekultur mit AIDA-1-39.1. Um die Bindungsstellen innerhalb dieser beiden Teile des Proteins noch weiter einzugrenzen, wurde mit den vier weiteren Konstrukten auf gleiche Weise verfahren. In der Verpaarung der vier Konstrukte mit AIDA-1-39.1 zeigten sich positive Ergebnisse für das Teilkonstrukt rnSynpo-*short*_{AS 174-346} in pGBKT7, sowie für das Teilkonstrukt Synpo-*short*_{AS 520-692} in pGBKT7. Eine schematische Darstellung der Ergebnisse zeigt Abb. III.9, eine detaillierte Ergebnis-übersicht zeigt Tabelle III.1. Zur Negativkontrolle wurden in jeder Versuchsreihe Hefekulturen, die das Plasmid pACT2 exprimierten, mit Hefekulturen gepaart, die das Plasmid pGBKT7 exprimierten. Sodann wurden Hefekulturen, die pACT2 exprimierten, mit Hefekulturen gepaart, die eine Synaptopodin-Sequenz in pGBKT7 exprimierten. *Vice versa* wurden Hefekulturen, die pGBKT7 exprimierten mit Hefekulturen gepaart, die eine AIDA-1-39.1-Sequenz in pACT2 exprimierten (Tab. III.2). Diese Ergebnisse lassen die Vorstellung zu, dass es im Protein Synaptopodin-*short* zwei Bindungsstellen für AIDA-1-39.1 geben könnte, die unabhängig voneinander mit AIDA-1-39.1 interagieren können: Eine im Bereich der Aminosäuren 174-346 und eine im Bereich der Aminosäuren 520-692.

Tabelle III.1: Detaillierte Ergebnisse der Verpaarungen der einzelnen Synaptodin-Konstrukte mit AIDA-1-39.1 (vgl. auch schematische Abb. III.9).

Verdünnung	AIDA-1-39.1 in pACT2, gepaart mit Synpo-short in pGBKT7	Durchschnittl. Koloniezahl auf DDO-Medium	Durchschnittl. Koloniezahl auf QDO-Medium	Stärke der Färbung auf x- α -Gal (QDO)
1:10	AS 1-692	246	250	+++
1:100	AS1-692	106	75	+++
1:10	AS 2-346	247	183	++
1:100	AS 2-346	66	53	++
1:10	AS 347-692	273	159	++
1:100	AS 347-692	87	21	++
1:10	AS 2-173	343	-	-
1:100	AS 2-173	111	-	-
1:10	AS 174-346	232	49	++
1:100	AS 174-346	57	10	++

Tabelle III.1; Fortsetzung

Verdünnung	AIDA-1-39.1 in pACT2, gepaart mit Synpo-short in pGBKT7	Durchschnittl. Koloniezahl auf DDO-Medium	Durchschnittl. Koloniezahl auf QDO-Medium	Stärke der Färbung auf x-α-Gal (QDO)
1:10	AS 347-519	259	-	-
1:100	AS 347-519	54	-	-
1:10	AS 520-692	329	135	++
1:100	AS 520-692	117	38	++

Jedes Experiment wurde mindestens viermal durchgeführt, die Kolonien wurden jeweils gezählt, die angegebenen Zahlen sind aus erhobenen Daten errechnete Durchschnittswerte.

1. Spalte: Verdünnung: Die Hefekulturen wurden in einer Verdünnung von 1:10 bzw. 1:100 auf den jeweiligen Nährböden ausgestrichen.
2. Spalte: Zur Verpaarung wurde immer AIDA-1-39.1 1-399 in pACT2 verwendet. Dieser Klon wurde mit den verschiedenen, vorbeschriebenen Synaptopodin-Konstrukten in pGBKT 7 verpaart. AS= Aminosäuresequenz.
3. Spalte: DDO-Medium bedeutet *double-drop-out*-Medium, es fehlen die essenziellen Aminosäuren Leucin und Tryptophan. Nur eine Hefezelle, die beide Plasmide, pACT2 und pGBKT7, aufgenommen hat, vermag hier zu wachsen.
4. Spalte: QDO-Medium bedeutet *quadrouple-drop-out*-Medium, hier fehlen die für den Hefestoffwechsel notwendigen Verbindungen Leucin, Tryptophan, Histidin und Adenin. Findet eine Interaktion der beiden Proteine, und somit Rekonstitution des GAL4-Transkriptionsfaktors statt, kommt es zur Transkription der Reportergene. Histidin und Adenin können von der synthetisiert werden und es kommt zum Koloniewachstum.
5. Spalte: x-α-GAL ist ein mit X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-Galactopyranosid) bestrichener QDO-Nährboden. Im Falle einer Interaktion der untersuchten Proteine kommt es durch Rekonstitution des Reportergens lacZ zur Aktivierung der β-Galaktosidase, so dass sich ein blauer Indigo-Komplex bildet. Die Hefekultur färbt sich also bei Interaktion blau. Die Markierung + entspricht einem deutlichen Hellblau, ++ einer mittelblau gefärbten Kultur und +++ entspricht einem satten Indigo-Farbtönen.

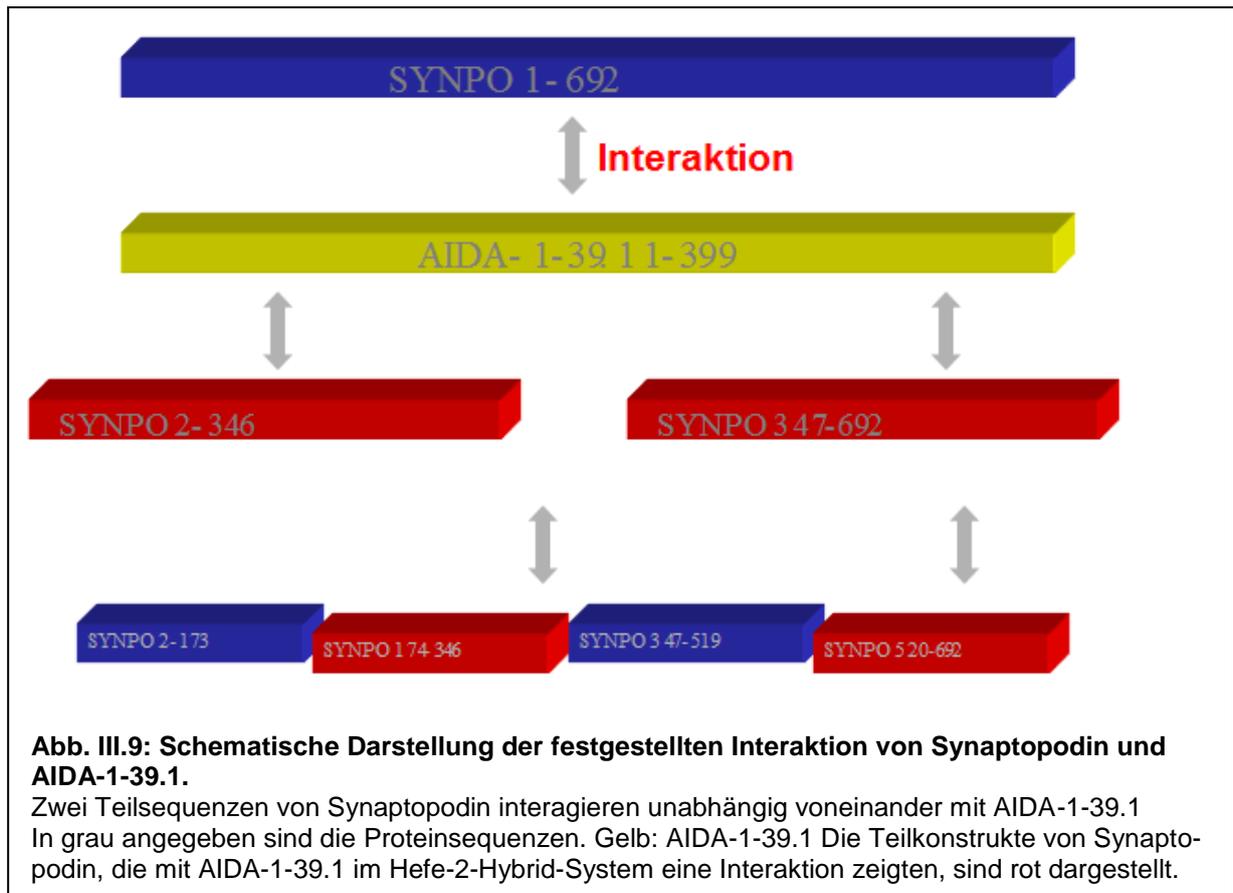


Tabelle III.2: Kontrollen

Verdü- nung	In diploiden Hefezellen exprimierte Konstrukte	Durchschnittl. Koloniezahl auf DDO-Medium	Durchschnittl. Koloniezahl auf QDO-Medium	Stärke der Färbung auf x- α -Gal (QDO)
1:10	Kontrolle 1: Plasmide pACT2 und pGBKT7	>400	-	-
1:100	Kontrolle 1: Plasmide pACT2 und pGBKT7	>200	-	-
1:10	Kontrolle 2: AIDA-1-39.1 in pACT2 und Plasmid pGBKT7	>200	-	-
1:100	Kontrolle 2: AIDA-1-39.1 in pACT2 und Plasmid pGBKT7	158	-	-
1:10	Kontrolle 3: Syn- <i>po-short</i> in pGBKT7 und Plasmid pACT2	400	-	-
1:100	Kontrolle 3: Syn- <i>po-short</i> in pGBKT7 und Plasmid pACT2	220	-	-

Zur Negativkontrolle wurden Hefekulturen, die das Plasmid pACT2 exprimierten, mit Hefekulturen gepaart, die das Plasmid pGBKT7 exprimierten. Sodann wurden Hefekulturen, die pACT2 exprimierten, mit Hefekulturen gepaart, die eine Synaptopodin-Sequenz in pGBKT7 exprimierten. *Vice versa* wurden Hefekulturen, die pGBKT7 exprimierten mit Hefekulturen gepaart, die eine AIDA-1-39.1-Sequenz in pACT2 exprimierten. Diese Kontrolle wurde im Rahmen jeder Versuchsreihe durchgeführt. Die angegebenen Zahlen sind Durchschnittswerte der erhobenen Daten.

Das Symbol – bedeutet kein Wachstum. Es findet in jeder Kontrolle ein Wachstum auf dem DDO-Medium statt, da die Hefekultur immer mit beiden Plasmiden transformiert wurde.

III.3.2 Lokalisation von Synaptopodin und AIDA-39.1 in der postsynaptischen Dichte von hippocampalen Neuronen der Ratte (Western Blot-Analyse)

An der postsynaptischen Membran der Synapse befindet sich die elektronendichte postsynaptische Dichte (PSD). Die PSD ist ein zisternenartiger Proteinkomplex, der für die Lokalisation der Neurotransmitter-Rezeptoren und die korrekte Signalweiterleitung erforderlich ist. Auch AIDA-1-Isoformen wurden immuncytochemisch in der PSD detektiert (Jordan et al. 2007; Jacob et al. 2010). Synaptopodin, ein Protein, das eigentlich mit dem Spine-Apparat assoziiert ist, konnte, zumindest immunhistochemisch, ebenso in der PSD nachgewiesen werden (Mundel et al. 1997; Deller et al. 2000).

Die subzelluläre Verteilung von Synaptopodin und AIDA-1 sollte mithilfe der SDS-PAGE und des Western Blots verifiziert werden. Es wurde Protein-Homogenat aus dem Hippocampus der Ratte sowie biochemisch gereinigte Fraktionen von Synaptosom und PSD aus demselben Gewebe verwendet. Die Proteinextrakte wurden freundlicherweise von Frau Christiane Schröder-Birkner (Institut für Neuroanatomie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) zur Verfügung gestellt. Sodann wurden Synaptopodin und AIDA-1 in den einzelnen Fraktionen detektiert.

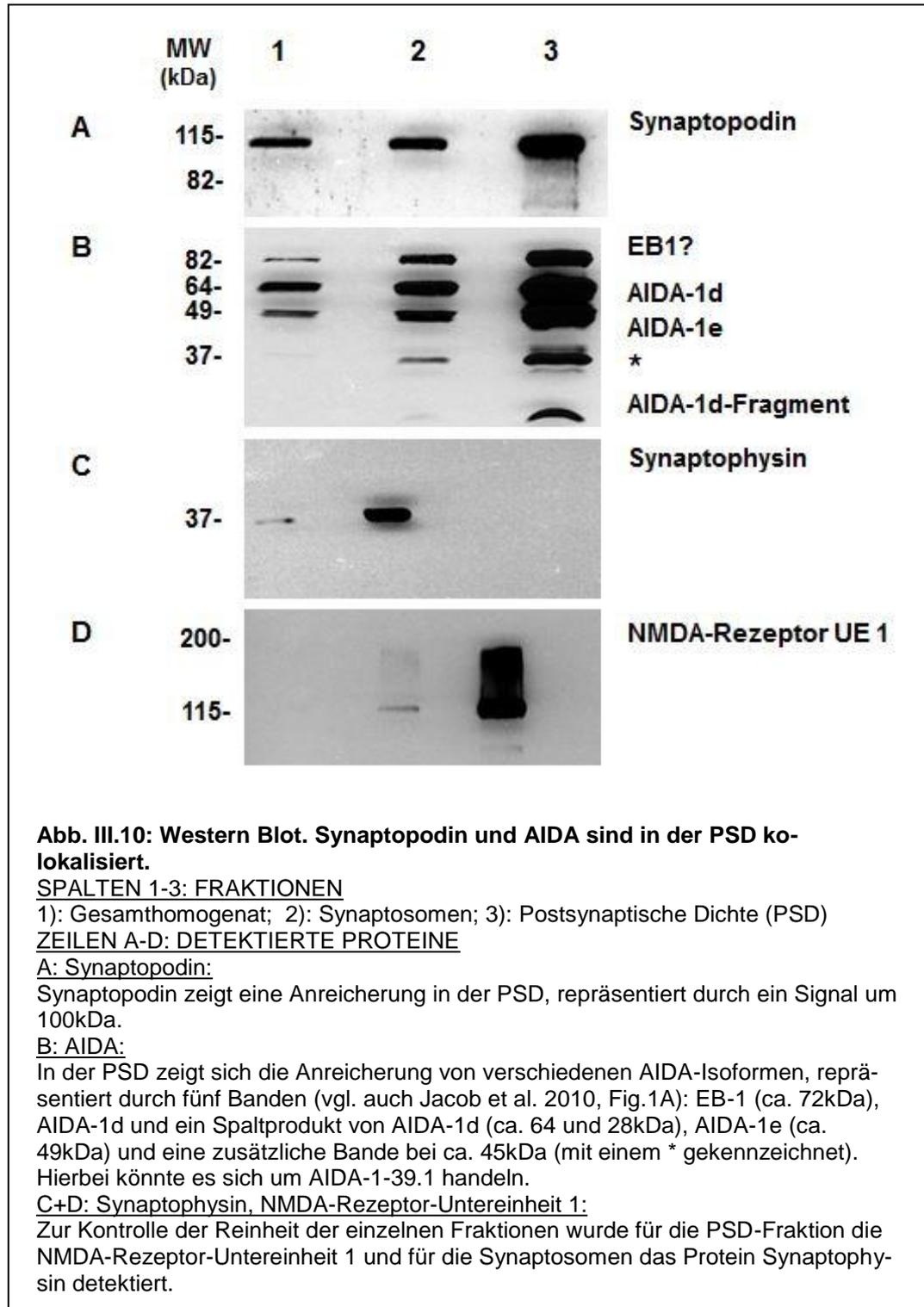
Synaptopodin zeigte eine Anreicherung in der PSD-Fraktion, repräsentiert durch eine Bande zwischen 82 und 115 kDa (Abb. III.10 A).

Das AIDA-1-Protein zeigte erwartungsgemäß ebenfalls eine deutliche Anreicherung in der PSD-Fraktion (Abb. III.10 B). Es waren fünf Banden in der Western Blot-Analyse sichtbar, die verschiedene AIDA-Isoformen repräsentieren. Diese durch alternatives Spleißen generierten Proteine wurden alle durch den verwendeten Anti-AIDA-Antikörper detektiert (dieser erkennt die Sequenz RLHDDPPQKPPRSITL, vgl. Abb. III.2 und Jordan et al. 2010). Die 82 kDa-Bande könnte das Protein EB-1 repräsentieren. Für AIDA-1e wird durch die Bande bei 49 kDa dargestellt. Die 64 kDa-Bande repräsentiert AIDA-1d, ein Fragment dieser Isoform zeigte sich außerdem durch ein Signal im Bereich von etwa 28 kDa. Jakob et al. (2010) haben inzwischen ebenfalls Western Blot-Analysen mit Hirnlysaten durchgeführt, diese ergaben eine Verteilung in ähnlicher Weise. Anders jedoch als bei Jacob et al., zeigte sich hier noch eine zusätzliche Bande zwischen 37 und 49 kDa (Abb. III.10 B, durch einen Stern (*) markiert). Die neue Isoform AIDA-1-39.1 hat ein Molekulargewicht von

44,8kDa. Somit könnte die zusätzliche Bande dieser Isoform entsprechen. Es würde in diesem Fall nur ein kleiner Bereich am N-Terminus fehlen.

Zur Kontrolle der Reinheit der einzelnen Fraktionen wurden zusätzlich für die PSD-Fraktion die NMDA-Rezeptor-Untereinheit 1 (NMDA-R1) und für die Synaptosomen das präsynaptische Protein Synaptophysin detektiert. kommt als charakteristischer Bestandteil von synaptischen Vesikeln in nahezu allen Nervenzellen des ZNS vor. Es dient als Marker für die Quantifizierung von Synapsen. Im Western Blot zeigt Synaptophysin eine besondere Anreicherung in Synaptosomen, das aus Proteinen der gesamten Synapse besteht. Der NMDA-Rezeptor befindet sich an der postsynaptischen Membran. Die Untereinheit 1 wird als Marker für die postsynaptische Membran sichtbar gemacht.

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl Synaptopodin als auch das AIDA-Protein Bestandteile der PSD sind. Gemeinsam mit den im Hefe-2-Hybrid-System dargestellten (Kap. III.3.1) Ergebnissen wäre es denkbar, dass die Proteine in Nervenzellen miteinander interagieren.



III.3.3 Ko-Lokalisation von Synaptopodin und AIDA-1-39.1 in eukaryontischen Zelllinien

III.3.3a) Subzelluläre Verteilung von Synaptopodin und AIDA-1-39.1 in HEK- und COS-Zellen

Die Demonstration der Ko-Lokalisation von Synaptopodin und AIDA erfolgte in eukaryontischen Zelllinien mittels immunocytochemischer Analysen.

Die Zelllinien HEK 293- und COS-7 wurden in 12-Loch-Platten kultiviert und zunächst einzeln mit den Konstrukten pEGFP-Synpo-*short* und pT7-AIDA-1-39.1 transfiziert. Die Detektion der Proteine erfolgte mit einem Primärantikörper Kaninchen-anti-GFP bzw. Maus-anti-T7. Als Sekundärantikörper wurden ein Alexa® 488-markierter Ziege-Anti-Kaninchen- und ein Cy3-markierter Ziege-anti-Maus-Antikörper eingesetzt. In der Fluoreszenzmikroskopie konnte man eine Verteilung von EGFP-Synaptopodin-*short* fast ausschließlich im Zytoplasma beobachten (Abb. III.11 A und B). T7-AIDA-1-39.1 wurde zum größten Teil im Kern, zu kleineren Teilen aber auch im Zytoplasma sichtbar (Abb. III.11 C und D).

III.3.3b) Ko-Expression von Synaptopodin und AIDA-1-39.1 in HEK- und COS-Zellen

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob AIDA-1-39.1 und Synaptopodin bei Ko-Expression in eukaryontischen Zelllinien ko-lokalisiert vorliegen. Hierzu wurden die Zelllinien mit pEGFP-Synpo-*short* und pT7-AIDA ko-transfiziert und die rekombinanten Proteine mit vorgenannten Antikörpern detektiert. Es zeigte sich in etwa 20% der Zellen beider Zelltypen eine Ko-Lokalisation von T7-AIDA-1-39.1 und EGFP-Synaptopodin-*short* im Zytoplasma (Abb. III.12 D und H, weiße Pfeile), in 80% konnte keine Ko-Lokalisation gesehen werden. Auffallend war jedoch die eher klumpige Struktur, in der die Proteine im Zytoplasma vorlagen (Abb. III.12 A und B, gelbe Pfeile). Es könnte sich bei dieser vermeintlichen Ko-Lokalisation um Aggregatansammlungen gehandelt haben, die nicht physiologisch waren. Dennoch weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die beiden Proteine in der eukaryontischen Zelle zumindest im engen räumlichen Kontakt zueinander stehen könnten und, wie die Experimente in der Hefekultur (Kap. III.3.1) suggerierten, unter Umständen miteinander interagieren können.

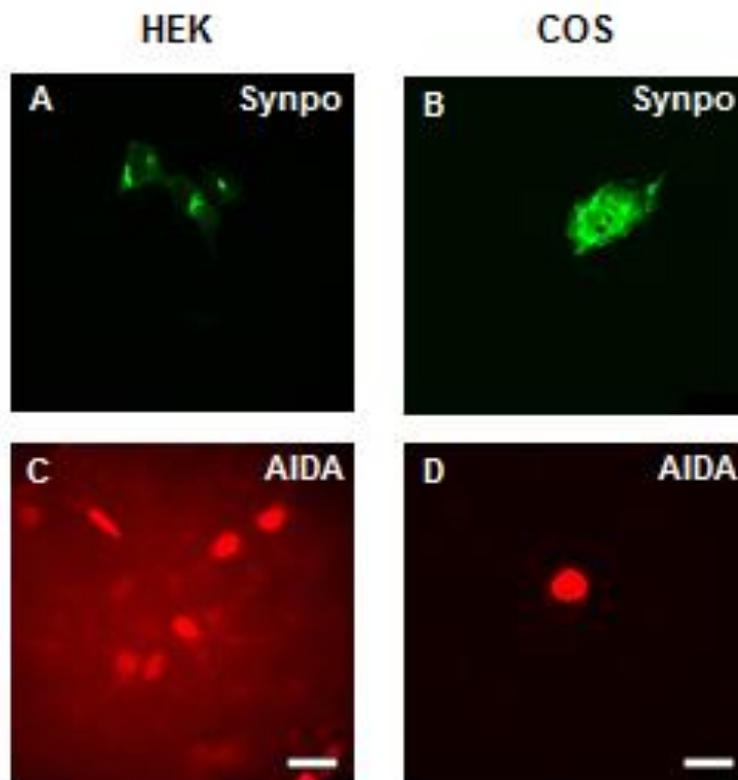


Abb. III.11: Subzelluläre Verteilung von Synaptopodin und AIDA-1-39.1 in HEK- und COS- Zellen.

Links: HEK-Zellen; Rechts: COS-Zellen.

A und B: HEK- bzw. COS-Zellen wurden mit pEGFP-Synp-short transfiziert, die Markierung des Proteins erfolgte mit den Antikörpern Kaninchen-anti-GFP und Ziege-anti-Kaninchen-Alexa 488. Das Protein ist hauptsächlich im Cytoplasma lokalisiert.

C und D: HEK bzw. COS-Zellen wurden mit pT7-AIDA transfiziert und mit den Antikörpern Maus-anti-T7 und Ziege-anti-Maus-Cy3 markiert. Das Protein wird fast ausschließlich im Zellkern sichtbar. Der Maßstab beträgt 20µm.

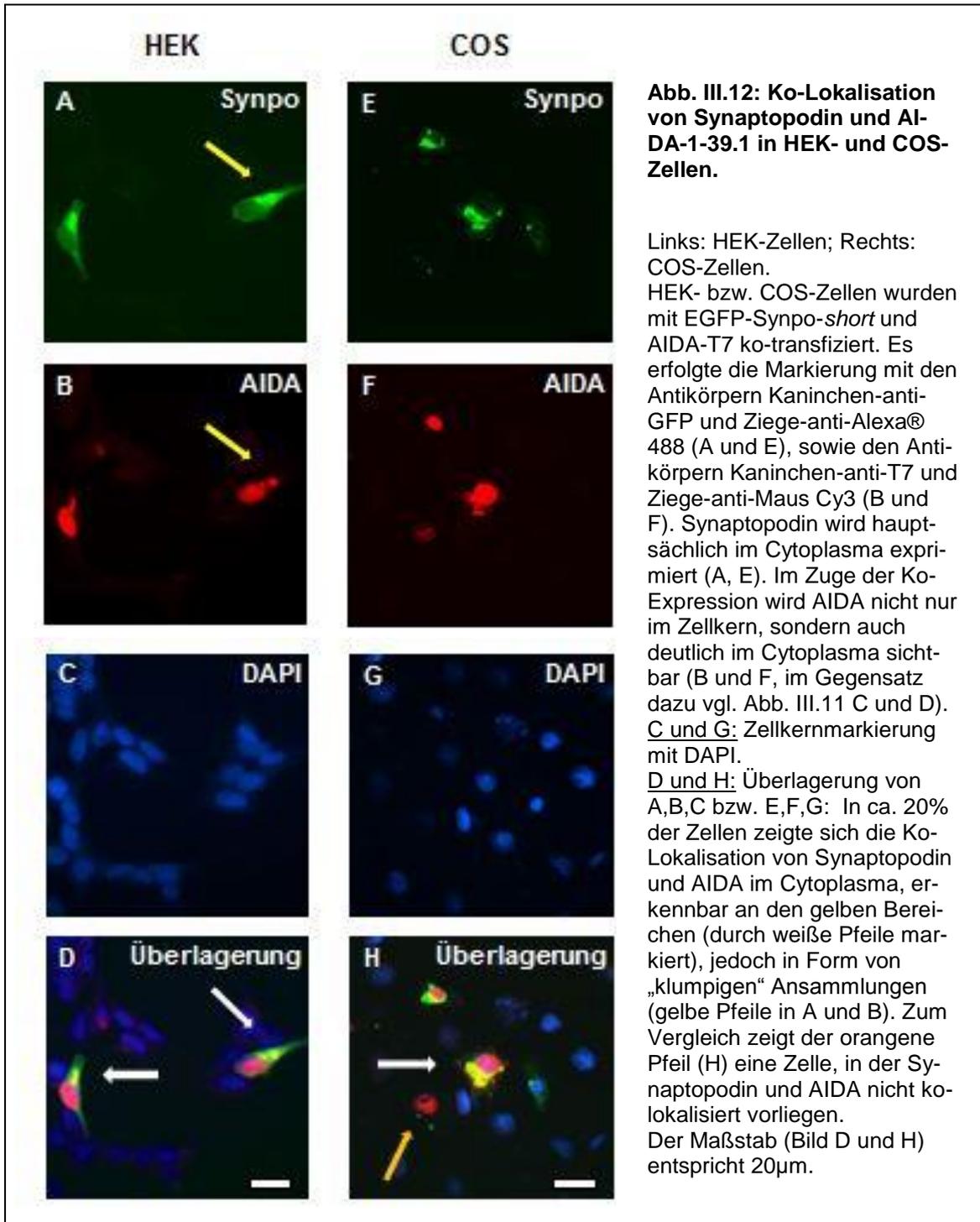


Abb. III.12: Ko-Lokalisation von Synaptopodin und AIDA-1-39.1 in HEK- und COS-Zellen.

Links: HEK-Zellen; Rechts: COS-Zellen.
 HEK- bzw. COS-Zellen wurden mit EGFP-Synpo-short und AIDA-T7 ko-transfiziert. Es erfolgte die Markierung mit den Antikörpern Kaninchen-anti-GFP und Ziege-anti-Alexa® 488 (A und E), sowie den Antikörpern Kaninchen-anti-T7 und Ziege-anti-Maus Cy3 (B und F). Synaptopodin wird hauptsächlich im Cytoplasma exprimiert (A, E). Im Zuge der Ko-Expression wird AIDA nicht nur im Zellkern, sondern auch deutlich im Cytoplasma sichtbar (B und F, im Gegensatz dazu vgl. Abb. III.11 C und D). C und G: Zellkernmarkierung mit DAPI.
 D und H: Überlagerung von A,B,C bzw. E,F,G: In ca. 20% der Zellen zeigte sich die Ko-Lokalisation von Synaptopodin und AIDA im Cytoplasma, erkennbar an den gelben Bereichen (durch weiße Pfeile markiert), jedoch in Form von „klumpigen“ Ansammlungen (gelbe Pfeile in A und B). Zum Vergleich zeigt der orangene Pfeil (H) eine Zelle, in der Synaptopodin und AIDA nicht ko-lokalisiert vorliegen.
 Der Maßstab (Bild D und H) entspricht 20µm.

III.3.4 Ko-Lokalisation von Synaptopodin und AIDA-1-39.1 in Hippocampus-Neuronen

Zur Untersuchung der Ko-Lokalisation von Synaptopodin und AIDA-1-39.1 in neuronalen Zellen wurden, analog zu den vorausgegangenen Experimenten in den eukaryontischen Zelllinien, wurden Synaptopodin- und AIDA-1-39.1-Konstrukte in den hippocampalen Neuronen von neugeborenen Ratten exprimiert und die Lokalisation der Proteine immunocytochemisch analysiert.

Es wurden hierzu Neurone mit den DNA-Konstrukten pFlag-Synpo-*short* und pEGFP-AIDA ko-transfiziert. Zur Detektion der rekombinanten Proteine wurden die Primärantikörper Maus-anti-Flag sowie Kaninchen-anti-GFP sowie die Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus-Cy3 und Ziege-anti-Kaninchen-Alexa® 488 verwendet. Flag-Synaptopodin wurde in der Nervenzelle stark exprimiert, und zwar hauptsächlich in den Dendriten (Abb. III. C, D). Auch EGFP- AIDA-1-39.1 war im Zellkern und in den Dendriten zu sehen (Abb. III.13 A, B). Es zeigte sich in etwa 10% der Zellen eine Ko-Lokalisation der beiden Proteine im Bereich der Dendriten, hier zum Teil lokal angereichert, vermutlich in den dendritischen Dornen (Abb. III. 13 E, F). Diese Ergebnisse könnten auf eine Interaktion der beiden Proteine im Bereich der Dendriten hinweisen.

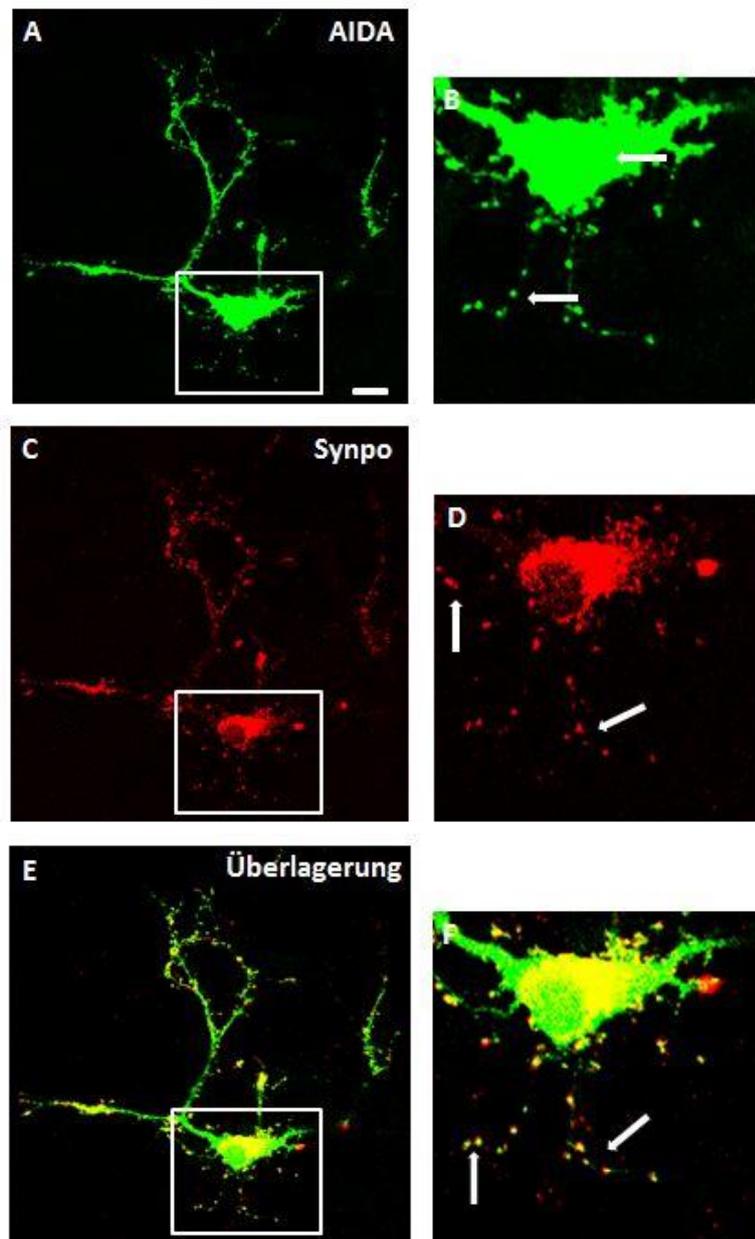


Abb. III.13: Ko-Lokalisation von Synaptopodin und AIDA-1-39.1 in Hippocampus-Neuronen.

A: AIDA (EGFP-AIDA 1-39.1) ist besonders stark im Zellkern, aber auch dendritisch lokalisiert. Zur Markierung wurden die Antikörper Kaninchen-anti-GFP und Ziege-anti-Kaninchen-Alexa® 488 verwendet. B zeigt den markierten Abschnitt in A in der Vergrößerung, um die Verteilung deutlich zu machen (weiße Pfeile). C: Synaptopodin (Flag-Synpo-short) zeigt eine Verteilung im Cytoplasma, vor allem in Dendriten. Zur Markierung wurden die Antikörper Maus-anti-Flag und Ziege-anti-Maus-Cy3 verwendet. D zeigt den markierten Abschnitt in C in der Vergrößerung, um die Verteilung deutlich zu machen (weiße Pfeile). E und F: In der Überlagerung zeigt sich eine deutliche Ko-Lokalisation von Synaptopodin und AIDA-1-39.1 an den Dendriten, vermutlich im Bereich der dendritischen Dornen (gelbe Bezirke, in F durch Pfeile markiert). Der Maßstab (Bild A) entspricht 20µm.

III.3.5 Ko-Immünpräzipitationen zur Untersuchung der Interaktion zwischen Synaptopodin und AIDA-1-39.1

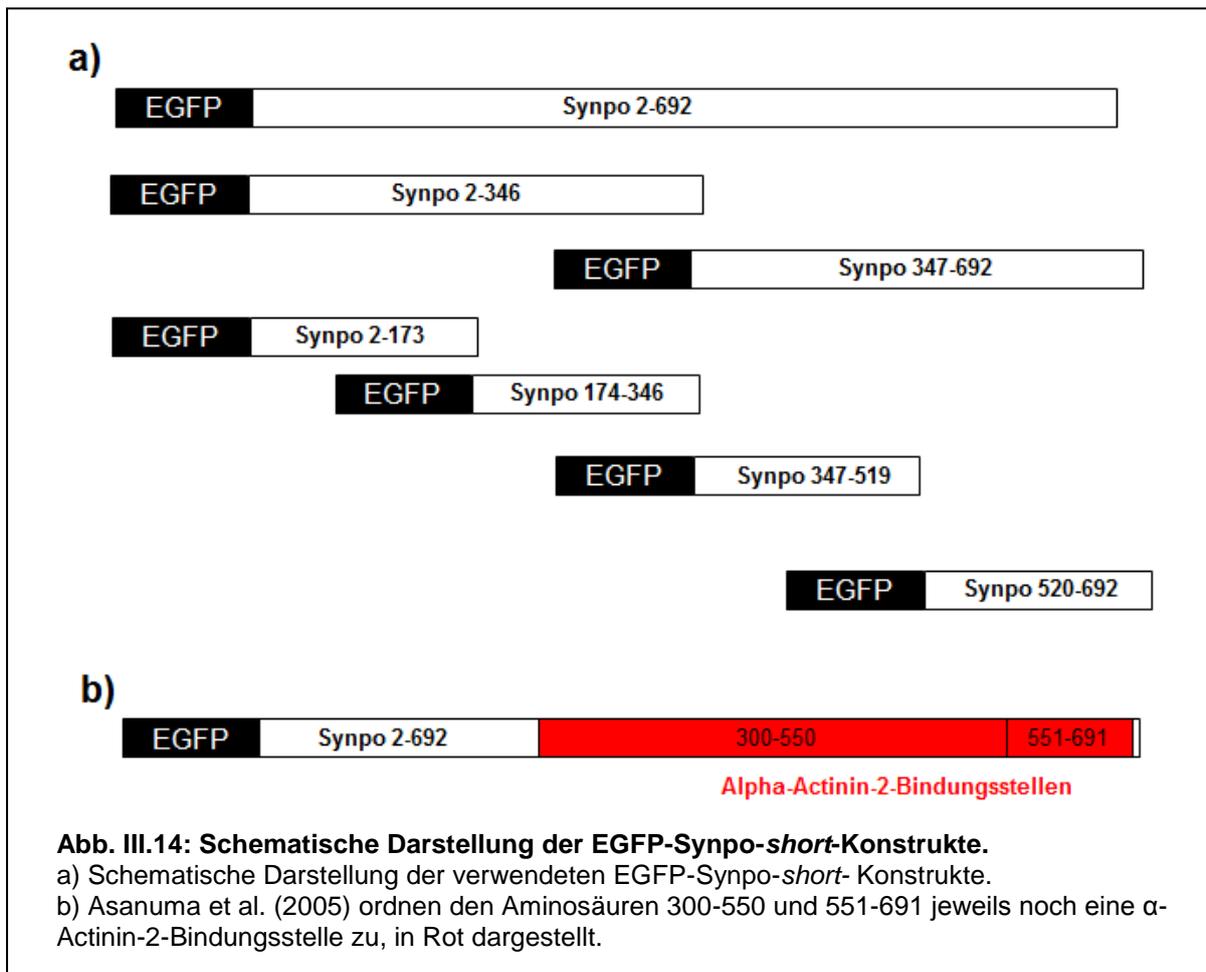
Die Methode der Immünpräzipitation eignet sich zur Isolation eines bestimmten Proteins aus einer Lösung, zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen ist die Ko-Immünpräzipitation geeignet. Die Ko-Immünpräzipitation wurde genutzt, um die im YTH-System beobachtete Interaktion von Synaptopodin und AIDA-1-39.1 in eukaryontischen Zellen zu untersuchen. Hierzu wurden mit verschiedenen Synaptopodin- und AIDA-39.1 DNA-Konstrukten transient transfizierte Zellen der eukaryontischen Zelllinien HEK-293 und COS-7 verwendet. Die rekombinanten Proteine wurden im Anschluss durch Western Blot-Analysen immunologisch detektiert. Trotz guter Expression beider Proteine in den Zellen konnte keine Interaktion gezeigt werden. Dies könnte bedeuten, dass die beiden Proteine in diesen Zellen nicht interagieren. Auch in Ko-Immünpräzipitationen aus Proteinlysaten des Hippocampus der Ratte zeigte sich keine Interaktion von Synaptopodin mit Isoformen von AIDA (persönliche Mitteilung von PD Dr. rer. nat. E. Mohr, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Institut für Neuroanatomie, unveröffentlichte Daten). Es ist auch möglich, dass die Interaktion sehr schwach bzw. transient und deshalb mittels dieser Methode nicht detektierbar ist.

III.4. CHARAKTERISIERUNG DER SEQUENZEN VON SYNAPTOPODIN-SHORT, DIE FÜR DIE LOKALISATION IN DENDRITISCHEN DORNEN ERFORDERLICH SIND

Mit Hilfe detaillierter immunhistochemischer Analysen ist gezeigt worden, dass Synaptopodin *in vivo*, in hippocampalen Neuronen des Nagerhirns, sehr selektiv und fast ausschließlich im Hals dendritischer Dornen lokalisiert ist (Deller et al. 2007). Dieses subzelluläre Verteilungsmuster setzt präzise Lokalisierungsmechanismen voraus, die den Transport des Proteins zum Zielort gewährleisten. Die dafür verantwortlichen Abschnitte im Synaptopodin-Molekül werden in der Literatur jedoch kontrovers diskutiert (Asanuma et al. 2005; Kremerskothen et al. 2005). So berichteten Kremerskothen et al. (2005), dass eine einzige α -Actinin 2-Bindungsstelle im Synaptopodin-Molekül den Transport in dendritische Dornen vermittelt. Dieser Bereich um-

fasst die Aminosäuren 753-903 in der langen Form des Synaptopodins, die der kürzeren Isoform, die lediglich 692 Aminosäuren umfasst (vergl. Abb. III.14) und die hauptsächlich in Neuronen exprimiert ist, vollkommen fehlen. Im Gegensatz dazu wurden in der kurzen Variante des Synaptopodins der Maus zwei nicht überlappende α -Actinin 2-Bindungsstellen gefunden. Sie umfassen die Aminosäuren 300-550 bzw. 551-691 (Asanuma et al. 2005). Ob sämtliche Aminosäuren dieser beiden Bereiche für die Assoziation mit α -Actinin 2 erforderlich sind, wurde nicht näher charakterisiert.

Daher wurden im letzten Teil dieser Arbeit die bereits für die Analysen im YTH-System erzeugten DNA-Fragmente, die für Teilsequenzen von Synaptopodin der Ratte kodieren, herangezogen, um diesen Punkt näher zu untersuchen. Die Fragmente wurden in einen EGFP-Vektor kloniert, um Synaptopodin oder Teilsequenzen des Proteins als EGFP-Fusionsproteine in hippocampalen Dispersionskulturen der Ratte zu exprimieren. Die verwendeten Konstrukte sind schematisch in der Abb. III.14 dargestellt. Während das rekombinante Protein, das die N-terminalen Aminosäuren 2-346 umfasst, homogen in Dendriten verteilt ist (Abb. III.15 B), ist der C-terminale Abschnitt (Aminosäuren 347-692) in dendritischen Dornen lokalisiert (Abb. III.15 C) und zeigt damit ein Verteilungsmuster, das auch das gesamte Protein aufweist (Abb. III.17 A). Entsprechende Ergebnisse wurden erhalten, wenn das N-terminale Segment erneut die zwei Teilsequenzen unterteilt und wie oben beschrieben als EGFP-Fusionsproteine zur Expression gebracht wurden (Abb. III.15 D, E). Beide Subfragmente aus dem C-terminalen Bereich des Synaptopodins, die Aminosäuren 347-519 bzw. 520-692 umfassend, wiesen ebenfalls eine Lokalisation in dendritischen Dornen auf (Abb. III.15 F, G). Tendenziell schien diese Lokalisierung durch das C-terminale Fragment (Aminosäuren 520-692) besser vermittelt zu werden (Abb. III.15 G). Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass die zum Transport erforderlichen Sequenzen im C-terminalen Abschnitt der kurzen Isoform des Synaptopodins lokalisiert sind.



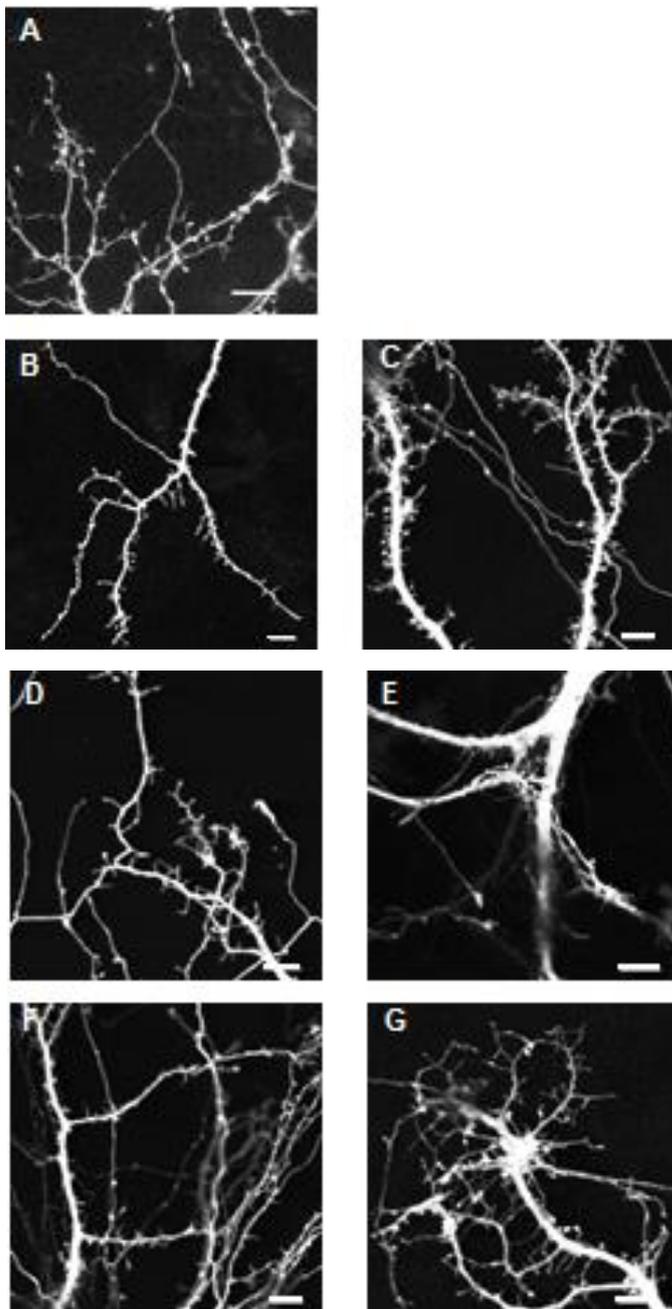


Abb. III.15: Verteilung verschiedener Synpo-*short*-Konstrukte in Hippocampus-Neuronen: Die Targetingsequenz zur Lokalisation in Dendriten und dendritischen Dornen liegt im C-terminalen Bereich.

A: EGFP Synpo-*short*AS2-692; B: EGFP Synpo-*short*AS2-346; C: EGFP Synpo-*short*AS347-692; D: EGFP Synpo-*short*AS2-173; E: EGFP Synpo-*short*AS174-346; F: EGFP Synpo-*short*AS347-519; G: EGFP Synpo-*short*AS520-692.

Die Verteilung des Proteins unterscheidet sich deutlich je nach Sequenz. Die C-terminalen Konstrukte C, F und G zeigen eine starke Expression in dendritischen Dornen. Die anderen Konstrukte sind homogen verteilt. C und F verfügen, wie die schematische Darstellung (Abb. III.14) zeigt, über eine Actin-Bindungsstelle (Kremerskothen et al. 2005). C, F und G beinhalten lt. Asanuma et al. (2005) eine der zwei α -Actinin-Bindungsstellen. Der Maßstab entspricht 20 μ m.

IV. DISKUSSION

Das Protein Synaptopodin ist in dendritischen Dornen von Nervenzellen des Vorderhirns lokalisiert. Es ist mit dem Spine-Apparat assoziiert und darüber hinaus in der PSD detektiert worden (Mundel et al. 1997; Deller et al. 2000 a,b). Vermutlich ist es an aktivitätsabhängigen Veränderungen an der Synapse und somit synaptischer Plastizität beteiligt (Deller et al. 2003; Jedlicka et al 2009). Auf welche Art und Weise Synaptopodin in diese Vorgänge eingebunden ist, ist weitgehend unbekannt.

Um die Funktion des Proteins näher zu untersuchen, wurden von Björn Meyer-Hiemer (Institut für Neuroanatomie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, AG Mohr, Dissertation in Vorbereitung) mit Hilfe des YTH-Systems Interaktionspartner für Synaptopodin gesucht. Dabei wurde eine bisher unbekannte Isoform von AIDA-1, als AIDA-1-39.1 bezeichnet, als mit Synaptopodin interagierendes Protein identifiziert.

IV.1 CHARAKTERISIERUNG VON AIDA-1-39.1

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation erfolgte zunächst die Charakterisierung von AIDA-1-39.1. Das Protein weist einen einzigartigen, aber unvollständigen N-Terminus auf und repräsentiert vermutlich eine neue Spleißvariante der bereits beschriebenen AIDA-1-Proteine (Gherzi et al. 2004a,b; Xu und Hebert 2005). Die Datenbank enthält drei Proteine, die der hier charakterisierten Variante sehr ähnlich sind: AIDA-1d (Ratte), Cajalin-2b (Mensch) und eine Cajalin-2-Teilsequenz.

In den durchgeführten immunocytochemischen Analysen war AIDA-1-39.1 in HEK- und COS-Zellen hauptsächlich im Zellkern lokalisiert (vgl. Abb. III.3). In Hippocampus-Neuronen war die Verteilung interessanterweise ganz anders – das Protein war, neben einer homogenen Verteilung im Zellkern, punktuell in Dendriten und dendritischen Dornen lokalisiert (vgl. Abb. III.4). Die Arbeitsgruppe Jordan et al. (2007) beschrieb die Lokalisation von AIDA-1d ebenfalls im Zellkern, assoziiert mit Cajal-Körperchen, sowie in dendritischen Dornen im Bereich der PSD. Die Gruppe geht davon aus, dass AIDA-1 aktivitätsabhängig an der PSD prozessiert wird. Während der C-terminale Teil an der Synapse verbleibt, gelangt der N-terminale Bereich in den Zellkern. Die Autoren vermuten, dass AIDA-1 an der Kommunikation zwischen

Synapse und Zellkern beteiligt sein könnte. Passend zu diesen Beobachtungen haben Xu und Hebert (2005) die Interaktion von AIDA-1c und AIDA-1a mit Coilin, dem Markerprotein der Cajal-Körper, gezeigt. Auch Jakob et al. (2010) haben die Verteilung von AIDA-1 untersucht und das Protein im Vorderhirn sowohl punktuell im Zellkern als auch an der Synapse – assoziiert mit der PSD – nachgewiesen. Die vorliegenden Experimente zeigen, dass AIDA-1-39.1 ebenfalls in diesen beiden Zellkompartimenten lokalisiert ist, was die von Jordan et al. (2007) aufgestellte These stützen könnte. Allerdings konnte keine punktuelle Verteilung in Kompartimenten des Zellkerns, wie zum Beispiel in den von Jordan et al. (2007) gezeigten Cajal-Körpern, beobachtet werden. Cajal-Körper spielen vermutlich eine Rolle bei der posttranskriptionellen Modifikation von mRNA-Molekülen (Nizami et al. 2010), AIDA-1-39.1 hingegen war homogen im Zellkern verteilt und hat daher wahrscheinlich eine andere Funktion als die von Jordan et al. (2007) beschriebene AIDA-1-Isoform. Mittlerweile ist eine ganze Reihe von AIDA-1-Spleißvarianten identifiziert worden, die in unterschiedlichen Zelltypen des ZNS vorkommen und auch eine verschiedenartige subzelluläre Verteilung zeigen. Dies deutet darauf hin, dass die unterschiedlichen Spleißvarianten individuelle Funktionen haben könnten (Jakob et al. 2010). Hierfür spricht auch die häufig zufällige Identifikation einer neuen Spleißvariante über die Suche nach Interaktionspartnern verschiedenster Proteine: Ghersi et al. (2004a,b) identifizierten das AIDA-1-Protein als Interaktionspartner des A β PP, Xu und Hebert (2005) entdeckten AIDA-1c über die Interaktion mit Coilin und Björn Meyer-Hiemer (Institut für Neuroanatomie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, AG Mohr, Dissertation in Vorbereitung) konnte AIDA-1-39.1 über die Interaktion mit Synaptopodin identifizieren.

Zur Charakterisierung der Sequenzabschnitte innerhalb von AIDA-1-39.1, die für die Lokalisation des Proteins in Dendriten und dendritische Dornen notwendig sind, wurden Neurone mit DNA-Konstrukten, die für ein C-terminales bzw. ein N-terminales AIDA-1-39.1-Fragment kodierten, transfiziert. Das N-terminale Fragment zeigte eine homogene Verteilung in der Zelle, während das C-terminale Fragment, das über ein PDZ-Bindungsmotiv verfügt, punktuell in Dendriten und dendritischen Dornen lokalisiert war (vgl. Abb. III.6). Das Ergebnis spricht dafür, dass das PDZ-Bindungsmotiv möglicherweise notwendig sein könnte, um das Protein in dendritische Dornen zu

bringen oder es dort über die Interaktion mit Proteinen, die PDZ-Domänen enthalten, zu verankern. Auch ein Experiment mit zwei AIDA-1.39.1-Konstrukten, von denen eines so verändert war, dass das PDZ-Bindungsmotiv durch ein C-terminales mRFP-*tag* maskiert war, bestätigte die These: Nur das rekombinante Protein mit funktionfähigem PDZ-Bindungsmotiv zeigte eine punktuelle Verteilung in Dendriten und dendritischen Dornen. Die Arbeitsgruppe Jordan postuliert, dass das Protein über sein PDZ-Bindungsmotiv in der PSD mit dem Protein PSD-95 assoziiert sein könnte (Jordan et al. 2007), was zu den vorliegenden Beobachtungen passt. Mulholland et al. (2012) haben jedoch in Experimenten mit AIDA-1 gezeigt, dass die Interaktion des Proteins mit PSD-95 nicht notwendig für seine Lokalisation in der PSD zu sein scheint. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis könnte sein, dass AIDA-1 über sein PDZ-Bindungsmotiv mit einem anderen Protein der PSD interagiert und so hier fixiert wird. Zudem ist es möglich, dass die verschiedenen AIDA-1-Isoformen durch unterschiedliche Protein-Protein-Wechselwirkungen in unterschiedliche Zellkompartimente gelangen oder dort fixiert werden. Mullholland et al. (2012) haben zusätzlich eine durch NMDA-Rezeptor-Stimulation verstärkte Ko-Lokalisation von AIDA-1 mit p80-Coilin beschrieben, was die These stützt, dass das Protein unter verschiedenen zellulären Bedingungen mit unterschiedlichen Proteinen ko-lokalisiert vorliegt oder sogar interagiert. Wie bereits beschrieben, konnten die bisher bekannten AIDA-1-Spleißvarianten über eine Vielzahl unterschiedlicher Interaktionspartner identifiziert werden (Gherzi et al. 2004a,b; Xu und Hebert 2005; Björn Meyer-Hiemer, Institut für Neuroanatomie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, AG Mohr, Dissertation in Vorbereitung).

Der derzeitige Stand der Literatur zeigt, dass die Umstände, unter denen die unterschiedlichen Varianten von AIDA-1 in der Zelle vorkommen und mit anderen Proteinen interagieren, noch nicht ausreichend verstanden sind.

IV.2 UNTERSUCHUNGEN ZUR INTERAKTION VON AIDA-1-39.1 MIT SYNAPTOPODIN

Durch ein *screening* im YTH-System wurde AIDA-1-39.1 als Interaktionspartner von Synaptopodin identifiziert (Björn Meyer-Hiemer, Institut für Neuroanatomie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, AG Mohr, Dissertation in Vorbereitung). Die Interaktion konnte durch die vorliegenden Ergebnisse im Rahmen der Verpaarung im YTH-System nicht nur bestätigt werden, sondern es wurden auch zwei Abschnitte innerhalb des Synaptopodin-*short* Proteins als Interaktionsdomänen näher eingegrenzt. Diese in Hefezellen erzielten Ergebnisse ließen sich jedoch in Säugerzellen nicht bestätigen. Nach transienter Transfektion von HEK-293-Zellen mit Synaptopodin- und AIDA-1-39.1-kodierenden Plasmiden konnte durch anschließend durchgeführte Ko-Immunpräzipitationen die Interaktion der beiden Proteine in Western Blot-Analysen nicht gezeigt werden. Mögliche Gründe für diese Diskrepanz sollen im Folgenden erörtert werden.

Ein Vorteil des YTH-Systems ist, dass auch sehr schwache Interaktionen zwischen Proteinen detektiert werden können. Es besteht die Möglichkeit, dass die im YTH-System deutlich gezeigte Interaktion *in vivo* transient und nur unter bestimmten Bedingungen stattfindet oder sehr schwach ist, so dass sie in der Ko-Immunpräzipitation nicht zu detektieren war. Unter der Vorstellung, dass die Interaktion der beiden Proteine ein bestimmtes, z.B. calciumreiches, Milieu erfordern könnte, wurden die Experimente in Lösungen verschiedener Zusammensetzung durchgeführt, was aber ebenfalls nicht zum erwarteten Ergebnis führte.

So vorteilhaft das YTH-System ist, auch bezüglich der Möglichkeiten der Identifikation einer Vielzahl von Protein-Protein-Interaktionen, so anfällig ist es für falsch-positive wie falsch-negative Ergebnisse. Falsch-positive Ergebnisse können aus verschiedenen Gründen entstehen. Zum einen kann es zur Autoaktivierung der Reporter gene durch nur eines der beiden eingesetzten Fusionsproteine kommen. Hierdurch ergibt sich ein positives Ergebnis, das jedoch von einem der beiden vermeintlichen Interaktionspartner allein hervorgerufen wird. Dies wurde in den vorliegenden Experimenten jedoch ausgeschlossen, indem Kontrollen durchgeführt wurden, in denen die Hefezellen jeweils mit einem der beiden Fusionsproteine in seinen Plasmid und dem „leeren“ Plasmid des anderen Fusionsproteins transformiert und verpaart

wurden. Es kam in keinem Fall zu einem Wachstum auf dem jeweiligen Selektionsmedium (vgl. Tab. III.2).

Zum anderen findet die Interaktion der untersuchten Proteine im YTH-System im Zellkern statt. Dies könnte dazu führen, dass das Protein hier in einer anderen Form vorliegt als in dem Organismus, in dem es physiologisch vorkommt. Dieser Umstand kann sowohl zu falsch-positiven als auch zu falsch-negativen Ergebnissen führen, und die Fehlerquelle lässt sich durch Kontrollen nicht aufdecken. Des Weiteren muss eine im YTH-System gezeigte Interaktion unter physiologischen Bedingungen nicht stattfinden, z.B. wenn die Proteine in unterschiedlichen Geweben, subzellulären Kompartimenten oder Phasen des Zellzyklus vorkommen.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Synaptopodin-*short* und AIDA-1-39.1 in Dendriten und dendritischen Dornen, zumindest partiell, ko-lokalisiert sind. Zudem sind beide Proteine Bestandteil biochemisch gereinigter Fraktionen der PSD. Obwohl dies keineswegs beweisend für eine *in-vivo*-Interaktion beider Proteine ist, wäre es vorstellbar, dass es sich um eine transiente oder sehr schwache Interaktion handelt, die mit Hilfe der hier durchgeführten Analysen nicht zu detektieren war. Andererseits ist nicht auszuschließen, dass die Proteine unter keinen physiologischen Bedingungen miteinander assoziiert sind.

IV.3 CHARAKTERISIERUNG DER SEQUENZEN VON SYNAPTOPODIN-SHORT, DIE FÜR DIE LOKALISATION IN DENDRITEN UND DENDRITISCHE DORNEN ERFORDERLICH SIND

Um die Targetingsequenz zur dendritischen Lokalisation für Synaptopodin-*short* zu identifizieren, wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene EGFP-Synaptopodin-*short*-Teilkonstrukte in Hippocampus-Neuronen der Ratte exprimiert. Während das rekombinante Protein, das die N-terminalen Aminosäuren 2-346 umfasst, homogen in Dendriten verteilt war, zeigte der C-terminale Abschnitt (Aminosäuren 347-692) eine punktuelle Verteilung in dendritischen Dornen, was dem Verteilungsmuster des endogenen Proteins (Deller et al. 2007) entspricht. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Lokalisierung des Proteins in dendritischen Dornen durch Bereiche im C-terminalen Teil vermittelt wird.

Die vorliegenden Daten stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen von Kremerskothen et al. (2005). Zum einen postulierte die Gruppe, dass nur die lange Form, Synaptopodin-*long*, in neuronalen Strukturen vorkommt. Im Gegensatz hierzu haben andere Arbeitsgruppen die Existenz von Synaptopodin-*short* im Gehirn nachgewiesen (Mundel et al. 1997, Asanuma et al. 2005). Björn Meyer-Hiemer konnte mittels Western Blot-Analysen eine Existenz von sowohl Synaptopodin-*short* als auch Synaptopodin-*long* ebenfalls in Neuronen des ZNS zeigen (Björn Meyer-Hiemer, Institut für Neuroanatomie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, AG Mohr, Dissertation in Vorbereitung).

Nach Kremerskothen et al. (2005) interagiert Synaptopodin-*long* *in vivo* mit F-Actin und α -Actinin. Eine Actin-Bindungsstelle wird den Aminosäuren 391-485 zugeordnet, die α -Actinin-Bindungsdomäne identifizierte die Arbeitsgruppe im C-terminalen Abschnitt von Synaptopodin-*long*, nämlich im Bereich der Aminosäuren 792-903. Zusätzlich sei dies auch die Targetingsequenz, die das Protein in Dendriten und dendritische Dornen lokalisiert.

In den hier dargestellten Experimenten zeigte Synaptopodin-*short* eine Expression in dendritischen Dornen von Neuronen des Hippocampus. Die Sequenz, die Kremerskothen et al. (2005) als Targetingsequenz zur Lokalisation in dendritische Dornen identifiziert haben, fehlen jedoch der kurzen Variante.

Asanuma et al. (2005) fanden in der kurzen Variante zwei nicht überlappende α -Actinin-Bindungsstellen, die die Aminosäuren 300-550 bzw. 551-691 umfassen. In Zusammenschau mit den vorliegenden Ergebnissen liegt die Vermutung nahe, dass diese Bindungsstellen die Lokalisation von Synaptopodin-*short* in dendritische Dornen vermitteln könnten – analog zu der als Targetingsequenz für Synaptopodin-*long* von Kremerskothen et al. (2005) postulierten α -Actinin-Bindungsstelle.

Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass ein ganz anderes, unbekanntes Protein die postsynaptische Lokalisation von Synaptopodin vermittelt, und dass die Bindungsstellen für dieses Protein rein zufällig im gleichen Abschnitt wie die Actin- und α -Actinin-Bindungsstellen liegen.

IV.4 AUSBLICK

Synaptopodin spielt in Neuronen des Säugerhirns eine Rolle bei Vorgängen, die zu synaptischer Plastizität führen. Es ist essentiell für die Ausbildung des Spine-Apparates in dendritischen Dornen sowie im Initialsegment von Axonen, und das Fehlen von Synaptopodin führt zu Lerndefiziten, was in Experimenten mit Synaptopodin-defizienten Mäusen demonstriert wurde (Deller et al. 2003; Jedlicka et al. 2009). Die exakte Funktion des Proteins in Neuronen bleibt jedoch bis heute eher spekulativ. Es ist daher wünschenswert zu wissen, in welches Netzwerk von Proteinen Synaptopodin eingebunden ist, um erste Hinweise auf die Funktion zu erhalten. Die mit Hilfe des YTH-Systems gefundene Interaktion von Synaptopodin mit einer bisher unbekanntem Isoform des AIDA-1 Proteins ist zwar potentiell sehr interessant, konnte in Säugerzellen jedoch nicht bestätigt werden. Da das YTH-System anfällig für falsch-positive Ergebnisse ist, müssten andere Methoden zur Identifizierung von Synaptopodin-interagierenden Proteinen zur Anwendung kommen. Denkbar wären hier sogenannte Protein-*Pulldown*-Experimente in Kombination mit massenspektrometrischen Analysen, mit deren Hilfe Protein/Protein-Wechselwirkungen ebenfalls analysiert werden können. Ansätze dieser Art haben dem YTH-System gegenüber den Vorteil, dass die Proteine in Säugerzellen exprimiert werden und sich zudem im korrekten zellulären Kompartiment befinden.

Auch über die Funktionsweise von AIDA-1 und die Bedeutung der großen Zahl an identifizierten Spleißvarianten, darunter auch AIDA-1.39.1, das in der vorliegenden Arbeit charakterisiert wurde, ist noch wenig bekannt. Jordan et al. (2007) beschreiben einen Signaltransduktionsweg, bei dem AIDA-1 durch noch ungeklärte Umstände an der PSD prozessiert und dann mit seinem N-terminalen Fragment in den Zellkern transloziert wird. Die Evidenz für eine tatsächliche Interaktion von Synaptopodin und AIDA-1 im Bereich der PSD und damit Bedeutung von Synaptopodin für den von Jordan et al. beschriebenen Vorgängen ist jedoch in Anbetracht der vorliegenden Ergebnisse gering. In der Zukunft wäre es sinnvoll, weitere Interaktionspartner für AIDA-1 zu identifizieren, die in diese Signalkaskade eingebunden sein könnten. Hierzu würde sich in Form eines *screenings* erneut das YTH-System eignen. Gegebenenfalls wäre es über die Charakterisierung weiterer Interaktionspartner auch mög-

lich, die Funktion des PDZ-Bindungsmotivs zur Lokalisation des Proteins in dendritischen Dornen bzw. in der PSD besser zu verstehen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Das Protein Synaptopodin ist in Podocyten der Niere sowie in Neuronen des Neocortex, Hippocampus, Striatum und Bulbus olfactorius zu finden. In Nervenzellen ist es nahezu ausschließlich in dendritischen Dornen und im Initialsegment der Axone lokalisiert, und es ist maßgeblich an der Ausbildung des Spine-Apparates, einer spezialisierten Form des glatten endoplasmatischen Retikulums, beteiligt. Seine Funktion in Nervenzellen ist jedoch bis heute unzureichend verstanden. Die Kenntnis der Integration von Synaptopodin in ein Netzwerk von Proteinen bietet die Möglichkeit, über seine Funktion zu spekulieren und mit Hilfe geeigneter experimenteller Ansätze zu charakterisieren. Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit war die mit Hilfe der YTH-Technik gefundene Interaktion von Synaptopodin mit einer bisher nicht beschriebenen Spleißvariante des Proteins AIDA-1, die die Arbeitsgruppe als AIDA-1-39.1 bezeichnete (B. Meyer-Hiemer, Institut für Neuroanatomie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, AG Mohr, Dissertation in Vorbereitung). AIDA-1, von dem zahlreiche Spleißvarianten beschrieben sind, wird in Neuronen exprimiert und ist unter anderem möglicherweise an der Signalweiterleitung von der Synapse in den Zellkern beteiligt. In dieser Arbeit konnte die Interaktion von Synaptopodin mit AIDA-1-39.1 in Hefezellen bestätigt werden. Darüber hinaus wurden innerhalb des Synaptopodin-Moleküls die mit AIDA-1-39.1 interagierenden Bereiche durch umfangreiche Experimente unter Verwendung des YTH-Systems näher eingegrenzt. Anschließende immunocytochemische Analysen mit HEK-293- und COS-7 Zellen zeigten, zumindest in einigen Fällen, eine Kollokalisierung der beiden Proteine im Cytoplasma. Auch in primär kultivierten hippocampalen Neuronen der Ratte wiesen einige der dendritischen Dornen sowohl AIDA-1-39.1- als auch Synaptopodin-Immunreaktivität auf. Durch Western Blot-Analysen konnte zudem gezeigt werden, dass beide Proteine Bestandteil biochemisch gereinigter Präparationen der PSD waren. Zur weiteren Analyse der Interaktion wurden Ko-Immunpräzipitationen mit Proteinlysaten von HEK-293 Zellen nach Transfektion mit Synaptopodin- und AIDA-1-39.1 Expressionsvektoren durchgeführt. In Western Blot-Analysen konnte die Interaktion beider Proteine nicht nachgewiesen werden. Dies lässt darauf schließen, dass die Interaktion entweder sehr schwacher oder transientser Natur ist. Es ist ebenfalls nicht auszuschließen, dass die in Hefezellen bestätigte Assoziation beider Proteine in Säugerzellen nicht stattfindet. Die Fra-

ge, ob Synaptopodin gemeinsam mit AIDA-1 an Signalvorgängen von der Synapse zum Zellkern beteiligt ist, bleibt daher offen.

Da über die subzelluläre Verteilung der neuen Isoform AIDA-1-39.1 in Nervenzellen keinerlei Daten vorlagen, wurde dies anschließend mit Hilfe immunocytochemischer Verfahren näher untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass AIDA-1-39.1 sowohl im Zellkern sowie punktuell in Dendriten und dendritischen Dornen hippocampaler Neurone lokalisiert ist. Als maßgeblich für die Lokalisierung des Proteins in dendritischen Dornen erwies sich ein PDZ-Bindungsmotiv am C-terminalen Ende des Proteins.

Abschließend wurde in kultivierten hippocampalen Neuronen untersucht, welche Bereiche der kurzen Variante von Synaptopodin, die vorwiegend im Zentralnervensystem exprimiert wird, für den Transport in dendritische Dornen (oder die Verankerung am Ort der Funktion) verantwortlich sind. Dazu wurden Vektoren, die für Teilsequenzen des Proteins kodieren, zur Expression gebracht. Auf diese Weise wurden zwei Abschnitte im C-terminalen Bereich von Synaptopodin identifiziert, die unabhängig voneinander den Transport der rekombinanten Proteine in dendritische Dornen vermitteln.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

Asanuma K., Kim, K., Oh, J., Giardino, L., Chabanis, S., Faul, C., Reiser, J., Mundel, P. 2005. Synaptopodin regulates the actin-bundling activity of alpha-actinin in an isoform-specific manner. *J. Clin. Invest.* 115, 1188-1198.

Asanuma, K., Yanagida-Asanuma, E., Faul, C., Tomino, Y., Kim, K., Mundel, P. 2006. Synaptopodin orchestrates actin organization and cell motility via regulation of RhoA signalling. *Nat. Cell. Biol.* 8, 485-491.

Bas Orth, C., Vlachos, A., Del Turco, D., Burbach, G.J., Haas, C.A., Mundel, P. 2005. Lamina-specific distribution of Synaptopodin, an actin-associated molecule essential for the spine apparatus, in identified principal cell dendrites of the mouse hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 487, 227-239.

Bas Orth, C., Muller, C.M., Frotscher, M., Deller, T. 2007. Loss of the cisternal organelle in the axon initial segment of cortical neurons in synaptopodin deficient mice. *J. Comp. Neurol* 504, 441-449.

Bliss, T.V., Collingridge, G.L. 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 36, 31–39.

Bork P., Sudol, M. 1994. The WW domain: a signalling site in dystrophin? *Trends Biochem. Sci.* 19:531-533.

Bork, P., Margolis, B. 1995. A phosphotyrosine interaction domain. *Cell* 80, 693-694.

Cajal, S.R. 1888. Estructura de los centros nerviosos de las aves. *Rev. Trim. Histol. Norm. Pat.* 1, 1-10

Cajal S.R. 1903. Un sencillo metodo de coloracion selectiva del reticulo protoplasmico y sus efectos en los diversos organos nerviosos de vertebrados e invertebrados. *Trab. Lab. Investig. Bio.l Univ. Mad.r* 2, 129–221.

Campbell, R.E., Tour, O., Palmer, A.E., Steinbach, P.A., Baird, G.S., Zacharias, D.A. and Tsien, R.Y. 2002. A monomeric red fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (12), 7877-7882.

Cohen, R.S., Chung, S.K., and Pfaff, D.W. 1985. Immunocytochemical localization of actin in dendritic spines of the cerebral cortex using colloidal gold as probe. *Cell. Mol. Neurobiol.* 5, 271-284.

Colonnier, M. 1968. Synaptic patterns of different cell types in the different laminae of the cat visual cortex. *Brain Res.* 9, 268-287.

Cooke, S.F., Bliss, T.V. 2006. Plasticity in the human central nervous system. *Brain* 129, 1659–1673.

Cowburn, D. 1997. Peptide recognition by PTB and PDZ domains. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7 (6): 835–838.

Czarnecki, K., Haas, C.A., Bas Orth, C., Deller, T., Frotscher, M. 2005. Postnatal development of synaptopodin expression in the rodent hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 490, 133-144.

Deller T., Mundel, P., Frotscher, M. 2000(a). Potential role of Synaptopodin in spine motility by coupling actin to the spine apparatus. *Hippocampus* 10, 569-581.

Deller, T., Merten, T., Roth, S.U., Mundel, P., Frotscher, M. 2000(b). Actin-associated Protein Synaptopodin in the rat hippocampal formation; localization in the spine neck and close association with the spine apparatus of principal neurons. *J. Comp. Neurol.* 418, 164-18.

Deller, T., Haas, C.A., Deissenrieder, K., Del Turco, D., Coulin, C., Gebhardt, C., Drakew, A., Schwarz, K., Mundel, P., Frotscher, M. 2002. Laminar distribution of synaptopodin in normal and reeler mouse brain depends on the position of spine-bearing neurons. *J. Comp. Neurol.* 453, 33-44.

Deller, T., Korte, M., Chabanis, S., Drakew, A., Schwegler, H., Stefani, G.G., Zuniga, A., Schwarz, K., Bonhoeffer, T., Zeller, R., Frotscher, M., Mundel, P. 2003. Synaptopodin-deficient mice lack a spine apparatus and show deficits in synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 10494-10499.

Deller, T., Bas Orth, C., Vlachos, A., Merten, T., Del Turco, D., Dehn, D., Mundel, P., Frotscher, M. 2006. Plasticity of synaptopodin and the spine apparatus organelle in the rat fascia dentata following entorhinal cortex lesion. *J.Comp. Neurol.* 499, 471-484.

Deller, T., Bas Orth, C., Del Turco, D., Vlachos, A., Burbach, G.J., Drakew, A., Chabanis, S., Korte, M., Schwegler, H., Haas, C.A., Frotscher, M. 2007. A role for synaptopodin and the spine apparatus in hippocampal synaptic plasticity. *Ann. Anat.* 189, 5-16

Dingwal, I. C., Sharnick, S.V., Laskey, R.A. 1982. A polypeptide domain that specifies migration of nucleoplasmin into the nucleus. *Cell* 30 (2), 449-458.

Einbound A., Sudol M. 1996. Towards prediction of cognate complexes between the WW domain and proline-rich ligands. *FEBS Lett* 384: 1-8

Fields, S., Song, O. 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-246.

Fifkova, E., Markham, J.A., Delay, R.J. 1983. Calcium in the spine apparatus of dendritic spines in the dentate molecular layer. *Brain Res.* 266, 163-168.

Fifkova E. 1985. A possible mechanism of morphometric changes in dendritic spines induced by stimulation. *Cell. Mol. Neurobiol.* 5, 47-6.

Frotscher, M., Hamori, J., Wenzel, H.J. 1977. Transneuronal effects of entorhinal lesions in the early postnatal period on synaptogenesis in the hippocampus of the rat. *Exp. Brain Res.* 30, 549-560.

Fu X., McGrath S., Pasillas M., Nakazawa S., Kamps M.P. 1999. EB-1, a tyrosine kinase signal transduction gene, is transcriptionally activated in the t (1;19) subset of pre-B- ALL, which express oncoprotein E2a-Pbx1. *Oncogene* 18, 4920-9.

Gall, J.G. 2003. The centennial of the Cajal body. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4, 975-980.

Gherzi, E., Vito, P., Lopez, P., Abdallah, M., D'Adamio, L. 2004(a). The intracellular localization of amyloid- β protein precursor protein (A β PP) intracellular domain associated protein -1 (AIDA-1) is regulated by A β PP an alternative splicing. *J. Alzheimer's Dis.* 6, 67-78.

Gherzi, E., Noviello, C., D'Adamio, L. 2004(b). Amyloid- β Protein Precursor (A β PP) Intracellular Domain-associated Protein-1 Proteins Bind to A β PP and Modulate Its Processing in Isoform-specific Manner. *J. Biol. Chem.*, Vol. 279, No. 47, 49105-49112.

Golding, M., Segal, M. 2003. Protein Kinase C and ERK involvement in dendritic spine plasticity in cultured rodent hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.* 17, 2529-2539.

Gray E.G. 1959. Electron microscopy of synaptic contacts on dendrite spines of the cerebral cortex. *Nature* 183, 1592-3.

Harris, K.M., Kater S.B. 1994. Dendritic spines: cellular specialisations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu. Rev. Neurosci.* 17, 341-371.

Holbro, N., Grunditz, A., Oertner, T.G. 2009. Differential distribution of endoplasmic reticulum controls metabotropic signaling and plasticity at hippocampal synapses. *Proc. Natl. Aca. Sci. U.S.A.* 106, 15055-15060.

Hughes, J. R. 1958. Post-tetanic Potentiation. *Physiological Reviews* 38 (1), 91-113.

Jakob, A., Jordan, B.A., Weinberg, R.J. 2010. Organization of Amyloid- β Protein Precursor Intracellular Domain-Associated Protein-1 in the Rat Brain. *J. Comp. Neurol.* 518, 3221-3236.

Jedlicka P., Vlachos, A., Schwarzacher, S.W., Deller, T. 2008. A role for the spine apparatus in LTP and spatial Learning. *Behav. Brain Res.* 192, 12-19.

Jedlicka, P., Schwarzacher, S.W., Winkels, R., Kienzler, F., Frotscher, M., Bramham, C.R., Schultz, C., Bas Orth, C., Deller, T. 2009. Impairment of in vivo theta burst long-term-potential and network excitability in the dentate gyrus of synaptopodin-deficient mice lacking the spine apparatus and the cisternal organelle. *Hippocampus* 19, 130-140.

Jordan, B.A. 2004. Identification and verification of novel rodent postsynaptic density proteins. *Mol. Cell. Proteomics* 1, 857-87.

Jordan, B.A., Fernholz, B.D., Khatri, L., Ziff, E.B. 2007. Activity-dependent AIDA-1 nuclear signaling regulates nucleolar numbers and protein synthesis in neurons. *Nature Neurosci.*, Vol. 10, No.4, 427-435.

Kalderon D., Roberts B.L., Richardson W.D., Smith A.E. 1984. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 39 (3 Pt 2), 499–509.

Kokortian, E., Segal, M. 2011. Synaptopodin regulates release of calcium from stores in dendritic spines of cultured hippocampal neurons. *J. Physiol.* 589 (Pt 24), 5987-5995.

Kremerskothen, J., Plaas, C., Kindler, S., Frotscher, M., Barnekow, A. 2005. Synaptopodin, a molecule involved in the formation of the dendritic spine apparatus, is a dual actin- α -actinin binding protein. *J. Neurochem.* 92, 597-606.

Kretz, O., Fester, L., Wehrenberg, U., Zhou, L., Brauckmann, S., Zhao, S., Prange-Kiel, J., Naumann, T., Jarry, H., Frotscher, M., Rune, G.M. 2004. Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis. *J. Neurosci.* 24, 5913-5921.

Kurabi A., Brener S., Mobli M., Kwan J.J., Donaldson L.W. 2009. A nuclear localization signal at the SAM-SAM domain interface of AIDA-1 suggests a requirement for domain uncoupling prior to nuclear import. *J. Mol. Biol.* 392(5), 1168-1177.

Lee, H.J., Zheng, J.J. 2010. PDZ domains and their binding partners: structure, specificity, and modification. *Cell Commun. Signal.* 8, 823- 825

Li, J., Mahajan, A., Tsai M.D. 2006. Ankyrin repeat: a unique motif mediating protein-protein-interactions. *Biochemistry* 45 (51), 15168-15178.

Lømo, T. 2003. The discovery of long-term-potentiation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sc.* 358, 617–620.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem. Band* 193, Nr. 1, S. 265–275.

Lüllmann-Rauch, R. 2009. *Histologie*, 3. Auflage, Stuttgart, Georg Thieme Verlag.

Matera, A.G. 2003. Cajal bodies. *Curr. Biol.* 13, 503.

Matsuo, R., Kato, A., Sakaki, Y., Inokuchi, K. 1998. Cataloging altered gene expression during rat hippocampal long-term potentiation by means of differential display. *Neurosci. Lett.* 244, 173–176.

Matsuo, R., Murayama, A., Saitoh, Y., Sakaki, Y., Inokuchi, K. 2000. Identification and cataloging of genes induced by long-lasting long-term potentiation in awake rats. *J. Neurochem.* 74, 2239–2249.

McCarthy, J.B. and Millner, T.A. 2003. Dendritic ribosomes suggest local protein synthesis during estrous synaptogenesis. *Neuroreport* 14, 1357-1360.

Miroci H., Schob C., Kindler, S., Ölschläger-Schütt, J., Fehr, S., Jungenitz, T., Schwarzacher, S.W., Bagni, C., Mohr, E., 2012. Makorin ring zinc finger protein 1 (MKRN1), a novel poly(A)-binding protein-interacting protein, stimulates translation in nerve cells. *J. Biol. Chem.* 287 (2), 1322-34.

Mulholland, P.J., Jordan, B.A., Chandler, L.J. 2012. Chronic ethanol up-regulates the synaptic expression of the nuclear translational regulatory protein AIDA-1 in primary hippocampal neurons. *Alcohol.* 46(6), 569-576.

Mundel, P., Heid, H.W., Mundel, T.M., Kruger, M., Reiser, J., Kriz, W. 1997. Synaptopodin; an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. *J. Cell. Biol.* 139, 193-204.

Nguyen P.V. 1994 Requirement of a critical period of transcription for induction of late phase of LTP. *Science* 265 1104-1107.

Nimchinsky, E.A., Sabatini, B.L., Svoboda, K. 2002. Structure and function of dendritic spines. *Annu. Rev. Physiol.* 64, 313-353

Nizami, Z., Deryusheva, S., Gall, J.G., 2010. The Cajal Body and Histone Locus Body. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*; doi: 10.1101

Ogg S.C., Lamond A. 2002. Cajal bodies and coilin-moving towards function. *J. Cell Biol.* 159 (1), 17–21.

Okubo-Suzuki, R., Okada, D., Sekiguchi, M., Inokuchi, K. 2008. Synaptopodin maintains the neural activity-dependent enlargement of dendritic spines in hippocampal neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 38, 266–276

Patrie, K.M., Drescher, A.J., Welihinda, A., Mundel, P., Margolis, B. 2002. “Interaction of Two Actin-binding Proteins, Synaptopodin and α -Actinin-4 with the Tight Junction Protein MAGI-1.” *J. Biol. Chem.* Vol. 277, No. 33, 30183-30190.

Peng, J., Kim, M.J., Cheng, D., Duong, D.M., Gygi, S., Sheng, M. 2004. Semiquantitative Proteomic Analysis of Rat Forebrain Postsynaptic Density Fractions by Mass Spectrometry. *J.Biol. Chem.* Vol. 279, No. 20, 21003-21011.

Pierce, J.P., van Leyen, K., Mc Carthy, J.B. 2000. Translocation machinery for synthesis of integral membrane and secretory proteins in dendritic spines. *Nat. Neurosci.* 3, 311-313.

Ranganathan R., Ross E. 1997. PDZ domain proteins: scaffolds for signaling complexes. *Curr Biol* 7 (12), 770– 773.

Reymann, K.G. & Frey, J.U., 2006. The late maintenance of hippocampal LTP: Requirements, phases, “synaptic tagging“, “late associativity“ and “implications“. *Neuropharmacology* 52, 24-40.

Richter J.D., Fallon, J.R. 2007. Synapses go nucleolar. *Nature Neurosci.*, Vol. 10, No.4, 399-400.

Roth, S.U., Sommer, C., Mundel, P., Kiessling, M. 2001. Expression of Synaptopodin, an Actin-associated Protein, in the Rat Hippocampus after limbic epilepsy. *Brain Pathology* 11, 169-181.

Schiebler, T.H. 2004. *Anatomie*, 9. Auflage, Berlin, Springer Verlag.

Schultz, J., Ponting, C.P., Hofmann, K., Bork, P. 1997. SAM as a protein interaction domain involved in developmental regulation. *Protein Sci.* 6, 249-253.

Sedgwick, S.G., Smerdon, S.J. 1999. The ankyrin repeat: A diversity of interactions on a common structural framework. *Trends Biochem. Sci.* 24, 311-316.

Segal, M. 1995. Dendritic spines for neuroprotection: A hypothesis. *Trends Neurosci.* 18, 468-471.

Segal, M. 2005. Dendritic spines and long-term-plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 277-284.

- Segal, M., Vlachos, A., Kokortian, E. 2010. The spine apparatus, Synaptopodin and dendritic spine plasticity. *Neuroscientist* 16, 125-131.
- Sheng, M., Sala, C. 2001. PDZ domains an the organization of supramolecular complexes. *Annu. Rev. Neurosci.* 24: 1-29.
- Sheng,M, Hoogenrad C.C. 2007. The Postsynaptic Architecture of Excitatory Synapses: A More Quantitative View. *Annu. Rev. Biochem.* 76: 823-847.
- Sherrington C.S. 1897. The central nervous system. In Foster M. (ed.): A textbook of physiology 7th edition Part III London: Mac Millan.
- Silbernagl, S. und Despopoulos, A. 2003. Taschenatlas der Physiologie, 6. Auflage, Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Song S., Sjöström, P.J., Reigl, M., Nelson, S., Chklovskii, D.B. 2005. Highly Nonrandom Features of Synaptic Connectivity in Local Cortical Circuits. *PLoS Biol.* 3, e68.
- Spacek, J. 1985. Three-dimensional analysis of dendritis spines. II. Spine apparatus and other cytoplasmic components. *Anat. Embryol.* 171, 235-243;
- Spacek, J., Harris, K.M. 1997. Three-dimensional organization of smooth endoplasmatic reticulum in hippocampal CA1-dendrites and dendritic spines of the immature and amature rat. *J. Neurosci.* 17, 190-203.
- Stephani, G. C.S. 2001; Potential role of Synaptopodin in hippocampal synaptic plasticity [online]. Verfügbar unter: <http://dujs.dartmouth.edu/fall-2002/potential-role-of-synaptopodin-in-hippocampal-synaptic-plasticity> [11.05.2012]
- Trepel, M. 2008. Neuroanatomie, Struktur und Funktion, 4. Auflage, München, Urban & Fischer.

Valverde F. 1967. Apical dendritic spines of the visual cortex and light deprivation in the mouse. *Exp. Brain Res.* 3, 337-352.

Vickers C.A. 2005. Induction and maintenance of late-phase long-term potentiation in isolated dendrites of rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Physiol.* 568, 803-813.

Vlachos, A., Maggio, N., Segal, M. 2008. Lack of correlation between synaptopodin expression and the ability to induce LTP in the rat dorsal and ventral Hippocampus. *Hippocampus* 18, 1-4.

Vlachos, A., Korkotian, E., Schonfeld, E., Copanaki, E., Deller, T., Segal, M. 2009. Synaptopodin regulates plasticity of dendritic spines in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 29, 1017-1033.

Vlachos, A. 2011. Synaptopodin and the spine apparatus organelle- Regulators of different forms of synaptic plasticity? *Ann. Anat.*, 2012, 194(4): 317-320 (Epub Dez. 2011).

Weins, A., Schwarz, K., Faul, C., Barisoni, L., Linke, W.A., Mundel, P. 2001. Differentiation- and stress-dependent nuclear cytoplasmatic redistribution of myopodin, a novel actin-bundling protein. *J. Cell Biol.*, Vol. 15, No.3, 393-403.

Wyszynski, M., Kharazia, V., Schanghvi, R., Rao, A., Beggs, A.H., Craig, A.M., Weinberg, R., Sheng, M., 1998. Differential regional expression and ultrastructural localization of alpha-actinin-2, a putative NMDA receptor-anchoring, in rat brain. *J. Neurosci.* 118, 1383-1392;

Yamazaki, M., Matsuo, R., Fukazawa, Y., Ozawa, F., Inokuchi, K. 2001. Regulated expression of n actin-associated protein, synaptopodin, during long-term potentiation. *J. Neurochem.* 79, 192-199.

Xu, J., Hebert, M.D. 2005. A novel EB-1/AIDA-1- isoform, AIDA-1c, interacts with the Cajal-body-protein coilin. *BMC Cell Biol.* 6, 1471-2121/6/23.

Xu, J., Paquet, M., Lau, A.G., Wood, J.D., Ross, C.A., Hall, R.A. 2001. β 1- adrenergic receptor association with the synaptic scaffolding protein membrane-associated guanylate kinase inverted-2 (MAGI-2). Differential regulation of receptor internalisation by MAGI-2 and PSD-95. *J. Biol. Chem.* 276, 41310-41317.

VII. ANHANG**Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
A β PP	Amyloid- β Protein Precursor Protein
AID	A β PP intracellular domain
AIDA	Amyloid- β protein precursor intracellular domain-associated protein
AMPA	alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BSA	bovine serum albumine
CA	Cornu ammonis (Ammonshorn)
CaM-Kinase II	Calcium-/ Calmodulin-abhängige Kinase II
cDNA	komplementäre DNA
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DDO-Medium	double-drop-out-Medium
d.h.	das heisst
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ECL	enhanced chemiluminescence
EGFP	enhanced green fluorescent protein
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
FP	forward primer (Vorwärts-Primer)
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
GLU1R	Glutamat-Rezeptor 1

HEK	Human Embryonic Kidney
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)- Ethansulfonsäure
i.e.	id est
IP-Puffer	Immunpräzipitationspuffer
IP3R	Inositol-Triphosphat-Rezeptor
kDa	Kilodalton
LB-Medium	lysogeny broth-Medium
LTP	long term potentiation; Langzeitpotenzierung
mA	Milli-Ampere
MAGI	Membran-assoziierte Guanylat Kinasen mit invertierter Orientierung
µm	Mikrometer
min	Minuten
mRFP	monomeric red fluorescent protein
mRNA	messenger RNA
MW	molecular weight (Molekulargewicht)
NLS	Nukleäre Lokalisierungssequenz
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphat buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDZ-Domäne	P steht für das synaptische Protein PSD95, D steht für ein Protein in Septumverbindun- gen der Drosophila, Z steht für Zonula occlu- dens. In diesen Proteinen wurden erstmals PDZ-Domänen gefunden
PEG	Polyethylenglykol
PSD	Postsynaptische Dichte
PTB-Domäne	Phosphotyrosinbindungsdomäne
QDO-Medium	quadrouple-drop-out-Medium
RIPA	Radioimmunpräzipitations-Assay

RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RP	reverse primer (Rückwärts-Primer)
rpm	rounds per minute
RyR	Ryanodin-Rezeptor
sec	Sekunden
snRNP	small nuclear ribonucleoprotein
SAM-Domäne	Sterile Alpha Motif-Domäne
SD-Medium/-Ade/-His/-Leu/-Trp	synthetic defined Medium/ -Adenin/-Histidin/-Leucin/-Tryptophan
SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natrium-Dodecylsulfat)
SOB-Medium	super optimal broth-Medium
SOC-Medium	super optimal broth with catabolite repres- sion-Medium
SP	Sequenzierprimer
Synpo	Synaptopodin
Tab.	Tabelle
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-buffered-saline
TMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
V	Volt
XGal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- β -D- Galactopyranosid
YPD	yeast peptone dextrose
YPDA	yeast peptone dextrose adenine
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Nr.	Titel	Seite
I.1	Schematische Darstellung von Synaptopodin- <i>short</i> und Synaptopodin- <i>long</i>	14
I.2	Schematische Darstellung der verschiedenen AIDA-1-Isoformen	20
II.1	Grundlage des Hefe-2-Hybrid-Systems: Schematische Darstellung	47
II.2	Schema zur Verpaarung von Hefezellen (<i>single mating</i>)	50
III.1	Schematische Darstellung von AIDA-1-39.1	51
III.2	Vergleich der AIDA-Isoform 1d (Ratte) und der Cajalin-Isoformen 2b (Mensch) und 2 (Mensch) mit der neu beschriebenen AIDA-Isoform 1-39.1	53
III.3	AIDA-1-39.1 ist in HEK 293-Zellen überwiegend im Zellkern lokalisiert	55
III.4	Punktuelle Verteilung von AIDA-1-39.1 in Dendriten von Hippocampus-Neuronen	56
III.5	Schematische Darstellung der EGFP-AIDA-1-39.1-Teilproteine, die für dieses Experiment konstruiert wurden	57
III.6	Subzelluläre Verteilung von EGFP-AIDA-1-39.1AS 1-162 und EGFP AIDA-1-39.1AS 163-399	58
III.7	Schematische Darstellung von EGFP- AIDA-1-39.1 und AIDA-1-39.1-mRFP	59
III.8	Ko-Expression von zwei verschiedenen AIDA-1-39.1-Konstrukten in Hippocampus-Neuronen	60
III.9	Schematische Darstellung der festgestellten Interaktion von Synaptopodin und AIDA-1-39.1	66
III.10	Western Blot. Synaptopodin und AIDA sind in der PSD ko- lokalisiert.	70
III.11	Subzelluläre Verteilung von Synaptopodin und AIDA-1-39.1 in HEK- und COS-Zellen	72
III.12	Ko-Lokalisation von Synaptopodin und AIDA-1-39.1 in HEK- und COS-Zellen	73

III.13	Ko-Lokalisation von Synaptopodin und AIDA-1-39.1 in Hippocampus-Neuronen	75
III.14	Schematische Darstellung der EGFP-Synpo- <i>short</i> -Konstrukte	78
III.15	Verteilung verschiedener Synpo- <i>short</i> -Konstrukte in Hippocampus-Neuronen: Die Targetingsequenz zur Lokalisation in Dendriten und dendritischen Dornen liegt im C-terminalen Bereich.	79

Tabellenverzeichnis

Nr.	Titel	Seite
II.1	Primäre Antikörper	31
II.2	Sekundäre Antikörper	31
II.3	Durch PCR generierte DNA-Konstrukte	32
II.4	Durch Umklonieren generierte DNA-Konstrukte	33
II.5	Oligonukleotide	33
II.6	PCR	37
III.1	Detaillierte Ergebnisse der Verpaarungen der einzelnen Synaptopodin-Konstrukte mit AIDA-1-39.1	64-65
III.2	Kontrollen	67

Herstellernachweis

Adobe Systems Inc.	D-80992 München
Agfa Vertriebsgesellschaft mbH+Cie. KG	D-50670 Köln
Amersham Biosciences Europe GmbH	D-79111 Freiburg
BD Becton Dickinson GmbH	D-69126 Heidelberg
Biomol GmbH	D-22769 Hamburg
Bio-Rad Laboratories GmbH	D-80901 München
Bio 101 Inc.	U.S.-Vista, CA 92038
Calbiochem Novabiochem GmbH	D-65812 Bad Soden
Chemicon International Deutschland	D-65719 Hofheim
Clontec Laboratories GmbH	D-69126 Heidelberg
Dianova GmbH	D-20354 Hamburg
Du Pont Performance Coatings GmbH	D-42285 Wuppertal
Eppendorf AG	D-22339 Hamburg
Fermentas GmbH	D-68789 St. Leon-Rot
Finnzymes Fisher Scientific GmbH	D-58239 Schwerte
GE Healthcare Deutschland Holding GmbH	D-80807 München
Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH	D-82211 Herrsching
Heraeus Holding GmbH	D-63450 Hanau
Improvision	D-72070 Tübingen
Invitrogen Life Technologies GmbH	D-64293 Darmstadt
Jackson Immunosearch Europe Ltd.	über Dianova GmbH
Leica Biosystems GmbH	D-69226 Nussloch
Merck KGaA	D-64293 Darmstadt
Merck Millipore	über Merck KGaA
Microsoft GmbH	D-22761 Hamburg
Molecular Probes	über Invitrogen
MP Biomedicals Germany GmbH	D-37269 Eschwege
MWG Eurofins	D-85560 Ebersberg
New England Biolabs GmbH	D-65926 Frankfurt a.M.
Novagen	über Merck KGaA
OXOID Deutschland GmbH	D-46467 Wesel

Perkin-Elmer LAS (Germany) GmbH	D-63110 Rodgau-Jügesheim
Progen Biotechnik GmbH	D-69123 Heidelberg
QIAGEN Deutschland GmbH	D-40724 Hilden
Roche Diagnostics Deutschland GmbH	D-68305 Mannheim
Rockland	über Biomol GmbH
Santa Cruz Biotechnology Inc.	D-69115 Heidelberg
Schleicher & Schuell BioScience GmbH	D-37586 Dassel
Sigma-Aldrich Chemie GmbH	D-82024 Taufkirchen
Stratagene GmbH	D-69115 Heidelberg
Zeiss, Carl Zeiss AG	D-73447 Oberkochen

Danksagung

Zuerst möchte ich Frau PD Dr. rer. nat. Evita Mohr für die engagierte Betreuung und die Bereitstellung eines interessanten Themas sowie für die guten Arbeitsbedingungen danken. Ich danke ihr für die tolle Einarbeitung in die Laborarbeit und die intensive Betreuung im Laboralltag. Danke für die Geduld bei der Fertigstellung der Dissertation.

Frau Prof. Dr. med. Gabriele Rune danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für Neuroanatomie.

Allen Mitarbeitern des Instituts danke ich für die große Hilfsbereitschaft und die anregenden Diskussionen. Mein besonderer Dank gilt Frau Christiane Schröder-Birkner für die Bereitstellung der Zellysate sowie für die Hilfe im Laboralltag, Geduld und ständige Bereitschaft, meine Fragen zu beantworten.

Herrn PD Dr. rer. nat. Stefan Kindler möchte ich für die Bereitstellung des Antikörpers und die Hilfe am konfokalen Mikroskop danken.

Danke an meine Familie für das immer offene Ohr, die ermutigenden Worte und das Aushalten meiner Laune wenn es nicht gut lief.

Danke Marianne, danke Papa für das Korrekturlesen.

Danke Gela für die Drucke.

Danke Anika für die Hilfe bei der Bildbearbeitung.

Danke Norman.

Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

Eidesstattliche Erklärung

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

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg bekannt ist. Ich habe die vorliegende Dissertation selbst angefertigt und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben. Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde nicht in Anspruch genommen, Dritte haben weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

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

Unterschrift: