

**Analyse der Rolle des am trans-Golgi  
lokalisierten Proteins PIST bei der  
Sortierung von postsynaptischen  
Membranproteinen**

Dissertation

zur Erlangung der Würde des

Doktors der Naturwissenschaften (Doctor rerum naturalium)

an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Fachbereich Biologie

der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Malte Klüssendorf**

aus Hamburg

Hamburg 2018

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit vom Mai 2014 bis Oktober 2017 im Rahmen des Graduiertenkollegs 1459 „Sortierung und Wechselwirkung zwischen Proteinen subzellulärer Kompartimente“ am Institut für Humangenetik, Zentrum für Geburtshilfe, Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Kreienkamp, durchgeführt. Die Betreuung der Arbeit erfolgte außerdem durch Prof. Dr. Susanne Dobler und Prof. Dr. Mathias Kneussel.

1. Gutachter: Prof. Dr. Hans-Jürgen Kreienkamp  
2. Gutachter: Prof. Dr. Susanne Dobler  
Kommissionsvorsitzender: Prof. Dr. Christian Lohr

Datum der Disputation: 08.02.2019

## I. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle des am trans-Golgi lokalisierten PDZ-Domänenproteins PIST bei der Sortierung von interagierenden Membranproteinen im zentralen Nervensystem (ZNS) analysiert. PIST interagiert über seine PDZ-Domäne und Linker-Region mit einer Vielzahl von Membranproteinen, von denen einige auch in der postsynaptischen Dichte (PSD) exzitatorischer Synapsen angereichert sind. Für diese Untersuchung wurden PIST-defiziente Mäuse sowie kultivierte Rattenneuronen nach PIST-*knockdown* als Modellsysteme etabliert und in Bezug auf die Lokalisierung einiger wichtiger Membranproteine im ZNS untersucht.

Die zunächst nur verfügbaren heterozygoten PIST *knockout*-Mäuse zeigten in Zelloberflächenbiotinylierungs- und Stimulationsexperimenten an Gehirngewebeschnitten, dass PIST einen Einfluss auf die Verfügbarkeit einiger seiner synaptisch-lokalisierten Interaktionspartner (mGluR5, Stargazin) an der Zellmembran hat. Nach dem *Knockdown* von PIST in kultivierten Rattenneuronen wurde ebenfalls beobachtet, dass die Menge von mGluR5, Neuroligin1 und Neuroligin2 an der Zellmembran reduziert war. Wichtige Signaltransduktionswege sind jedoch in beiden Modellen, mit Ausnahme einer leichten Reduktion der basalen Aktivität von AKT, nicht verändert.

Um die Verfügbarkeit von homozygoten PIST *knockout*-Mäusen zu erhöhen wurde eine konditionale Vorderhirn-spezifische PIST *knockout*-Linie etabliert. Diese Mauslinie unterscheidet sich, neben der Gewebsspezifität, maßgeblich zu den anderen betrachteten Modellen durch den postnatalen und daher relativ späten Verlust von PIST. Wie in den anderen Modellen hatte der Verlust von PIST in homozygoten *knockout*-Mäusen dieser Linie keinen Effekt auf die zellulären Proteinmengen der PIST-assoziierten Membranproteine. Außerdem waren auch die Mengen dieser Proteine in der Membranfraktion und in der PSD-Fraktion im Vorderhirn nicht verändert. Die Aktivität von Signalwegen im Cortex und im Hippocampus war ebenfalls unverändert. Die Analyse der Mäuse in verschiedenen verhaltensbiologischen Tests ergab bei den meisten analysierten Parametern keine Unterschiede zwischen homozygoten PIST *knockout*-Mäusen und den Kontrolltieren. Jedoch zeigten die *knockout*-Mäuse sowohl Defizite im Angst-induzierten Lernen von kontextbezogenen Erinnerungen, als auch in der Fähigkeit, zwischen dem Kontext der Konditionierung und einem neuen Kontext zu unterscheiden.

Die hier untersuchten Modellsysteme unterscheiden sich durch den Zeitpunkt des Verlustes von PIST. In keinem Fall förderte PIST, wie in der Literatur vorgeschlagen, den Abbau der assoziierten Rezeptoren. Stattdessen zeigte sich, dass PIST während der Entwicklung von neuronalen Systemen eher einen stabilisierenden Einfluss hat und die Lokalisation einiger interagierender Membranproteine an der Zellmembran fördert. Erfolgt der Verlust von PIST erst später, wenn z. B. die Bildung von Synapsen bereits begonnen hat, werden diese

Effekte offensichtlich durch andere Mechanismen kompensiert. Für eine eventuelle Rolle von PIST bei der Bildung von Synapsen spricht die Beobachtung, dass die mRNA- und Proteinmenge von PIST in kultivierten Rattenneuronen durch die Inhibierung von NMDA-Rezeptoren erhöht wird. Die Relevanz dieser Regulation von PIST, z. B. bei Prozessen der synaptischen Plastizität, ist jedoch unklar und bedarf weiterer Untersuchungen in einem geeigneten PIST-defizienten System, wie es jetzt durch die konstitutive PIST *knockout*-Mauslinie zur Verfügung steht.

## II. Summary

In this work, I investigated the role of the trans-Golgi associated PDZ domain protein PIST in the sorting of interacting membrane proteins in the central nervous system (CNS). PIST interacts via its PDZ domain and linker region with a variety of membrane proteins, some of which are also enriched in the postsynaptic density (PSD) of excitatory synapses. For this study, PIST-deficient mice and cultured rat neurons were established as model systems and investigated to determine the localization of some important membrane proteins in the CNS.

Initially, only heterozygous PIST knockout mice were available. In cell surface biotinylation and brain tissue sections stimulation experiments, these animals showed that PIST influences the availability of some of its synaptically localized interaction partners (mGluR5, stargazin) at the cell membrane. Similarly, in cultured rat neurons following PIST knockdown, it was observed that mGluR5, neuroligin1 and neuroligin2 levels are reduced at the cell membrane. However, important signal transduction pathways are not altered in either model, with the exception for a slight reduction in the basal activity of the AKT pathway.

To increase the availability of homozygous PIST knockout mice, a conditional forebrain-specific PIST knockout line was established. Besides tissue specificity, this mouse line differs significantly from other models due to the postnatal and therefore relatively late loss of PIST. Similar to the other models, loss of PIST in homozygous PIST knockout mice from this line has no effect on the total protein amount of PIST-associated membrane proteins. Also, the amounts of these proteins in the membrane fraction or the PSD fraction in the forebrain were unaffected. The activity of signaling pathways in the cortex and the hippocampus also remains unchanged. Analysis of the mice by various behavioral tests showed no differences between homozygous PIST knockout mice and control mice for most of the parameters analyzed. However, homozygous PIST knockout mice showed deficits in anxiety-induced learning from contextual memories as well as in the ability to distinguish between the context of the conditioning and a new context. The different models described here differ in the timing of the loss of PIST. I found no indication that PIST leads to the degradation of its associated receptors, as suggested in the literature. PIST rather has a stabilizing effect and promotes the localization of some interacting membrane proteins to the cell membrane. This effect on the regulation of interaction partners occurs primarily during the development of neuronal systems. If the loss of PIST occurs later, e.g. when the formation of synapses has already begun, these effects are apparently compensated by other mechanisms. A possible role of PIST in the formation of synapses is suggested by the observation that the amount of PIST mRNA and protein in cultured rat neurons is increased by inhibiting NMDA receptors. However, the relevance of this regulation of PIST in the context of synaptic plasticity is unclear and requires further investigation in a suitable PIST-deficient system, as is now available with the conventional PIST knockout mouse line.

### III. Inhaltsverzeichnis

I.	Zusammenfassung .....	i
II.	Summary .....	iii
III.	Inhaltsverzeichnis .....	iv
1	Einleitung .....	1
1.1	Sortierung von Membranproteinen .....	1
1.2	PDZ-Domänen .....	3
1.3	Funktionen von PDZ-Domänenproteinen .....	6
1.4	Das PDZ-Domänenprotein PIST .....	7
1.5	Durch die PDZ-Domäne von PIST vermittelte Interaktionen.....	10
1.5.1	Metabotrope Glutamatrezeptoren.....	13
1.5.2	Ionotrope Glutamatrezeptoren .....	14
1.5.3	Neuroligine .....	15
1.6	Die Rolle von PIST <i>in vivo</i> .....	16
1.6.1	Die Rolle von PIST in der Maus .....	16
1.6.2	Die Rolle von PIST im Menschen.....	17
2	Ziel der Arbeit .....	18
3	Material .....	19
3.1	Chemikalien, Reagenzien, Fertiglösungen und Pulver .....	19
3.2	Verbrauchsmaterialien .....	19
3.3	Puffer und Lösungen .....	20
3.4	Medien .....	23
3.5	Inhibitoren und Stimulanzen .....	24
3.6	Reaktionssätze .....	24
3.7	Enzyme und Proteine .....	24
3.8	Vektoren.....	25
3.9	Oligonukleotide und TaqMan-Sonden.....	25
3.10	Antikörper und Proteinkonjugate .....	26
3.11	Bakterienstämme und Zelllinien .....	27
3.12	Geräte und Laborausstattung .....	27
3.13	<i>Software</i> .....	27
4	Methoden .....	28
4.1	Molekularbiologische Methoden.....	28
4.1.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> -Bakterien.....	28
4.1.2	Herstellung und Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien .....	28
4.1.3	DNA-Plasmidpräparation.....	28
4.1.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen.....	29

4.1.5	Restriktionsverdau zur Überprüfung von DNA-Plasmiden.....	29
4.1.6	Agarosegelelektrophorese.....	30
4.1.7	Sequenzierung von DNA-Plasmiden .....	30
4.1.8	RNA-Isolation.....	31
4.1.9	cDNA-Synthese durch reverse Transkription.....	31
4.1.10	Genexpressionsanalyse mittels quantitativer <i>real time</i> -PCR .....	31
4.2	Zellbiologische Methoden.....	32
4.2.1	Kultivierung und Passagieren von HEK293T-Zellen .....	32
4.2.2	Produktion von gentechnisch veränderten Lentiviren .....	32
4.2.3	Bestimmung der transduzierenden Einheiten einer Virussuspension .....	33
4.2.4	Präparation und Kultivierung von primären Rattenneuronen .....	33
4.2.5	Transfektion von kultivierten Rattenneuronen.....	34
4.2.6	Transduktion von kultivierten Rattenneuronen.....	35
4.2.7	Zelloberflächenbiotinylierung von kultivierten Rattenneuronen .....	35
4.2.8	Immunzytochemie .....	36
4.2.9	Mikroskopie .....	36
4.3	Tierexperimentelle Methoden .....	36
4.3.1	Tierversuche.....	36
4.3.2	Rattenmodell .....	37
4.3.3	Mausmodelle .....	37
4.3.4	Tierhaltung und Verpaarung .....	38
4.3.5	Präparation von Mäusen .....	38
4.3.6	Genotypisierung von Mäusen .....	38
4.3.7	Behandlung von akuten Hippocampuschnitten aus Mäusen.....	39
4.3.8	Zelloberflächenbiotinylierung von Gehirngewebeschnitten.....	40
4.3.9	Anreicherung der postsynaptischen Dichte adulter Mäuse.....	41
4.3.10	Verhaltensanalysen .....	42
4.4	Proteinbiochemische Methoden.....	45
4.4.1	Herstellen von Zelllysaten .....	45
4.4.2	Herstellung von Gewebelysaten adulter Mäuse .....	45
4.4.3	Bestimmung der Proteinkonzentration in Zell- und Gewebelysaten .....	46
4.4.4	Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	46
4.4.5	<i>Western Blot</i> und Immundetektion .....	47
4.5	Statistische Auswertung.....	47
5	Ergebnisse .....	48
5.1	Etablierung von Modellsystemen für die Analyse der Funktion von PIST im zentralen Nervensystem.....	48
5.1.1	Generierung einer konditionalen, gehirnspezifischen PIST <i>knockout</i> -Mauslinie ....	48

5.1.2	Etablierung eines PIST- <i>knockdown</i> Modells in primären, kultivierten Rattenneuronen durch modifizierte Lentiviren .....	51
5.2	Analyse des Einflusses von PIST auf die zelluläre sowie die an der Zelloberfläche lokalisierte Proteinmenge von Interaktionspartnern, die im zentralen Nervensystem eine Rolle spielen .....	54
5.2.1	Analyse des Einflusses von PIST auf die Lokalisierung von Interaktionspartnern in heterozygoten PIST <i>knockout</i> -Mäusen aus der <i>knockout-first</i> -Mauslinie durch Zelloberflächenbiotinylierung .....	54
5.2.2	Analyse des Einflusses von PIST auf die Lokalisierung von Interaktionspartnern in primären, kultivierten, kortikalen Rattenneuronen durch Zelloberflächenbiotinylierung .....	57
5.3	Analyse des Einflusses von PIST auf Signalwege im zentralen Nervensystem .....	60
5.4	Analyse des Einflusses von PIST in konditionalen, gehirnspezifischen PIST <i>knockout</i> -Mäusen .....	67
5.4.1	Analyse des Einflusses von PIST auf die Stabilität von Interaktionspartnern .....	67
5.4.2	Analyse des Einflusses von PIST auf die Lokalisierung von einigen Interaktionspartnern.....	69
5.5	Verhaltensanalyse von konditionalen, gehirnspezifischen PIST <i>knockout</i> -Mäusen	72
5.5.1	<i>Open field</i> -Test .....	72
5.5.2	<i>Elevated plus maze</i> -Test.....	73
5.5.3	<i>Y-maze</i> -Test .....	75
5.5.4	<i>Contextual fear-conditioning</i> -Test.....	75
5.5.5	<i>Morris water maze</i> -Test .....	78
6	Diskussion .....	80
7	Ausblick.....	89
IV.	Literaturverzeichnis .....	vii
V.	Abbildungsverzeichnis .....	xiv
VI.	Abkürzungsverzeichnis .....	xv
VII.	Sicherheit und Entsorgung .....	xvii
VIII.	Lebenslauf.....	xviii
IX.	Danksagung .....	xx
X.	Eidesstattliche Erklärung.....	xxi

# 1 Einleitung

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Rolle des am trans-Golgi lokalisierten PDZ-Domänen Proteins PIST bei der Sortierung von Membranrezeptoren untersucht werden. Dabei standen zwei Fragen im Mittelpunkt: Erstens, welchen Einfluss hat PIST auf die Lokalisierung einiger wichtiger Membranproteine im zentralen Nervensystem (ZNS)? Zweitens, hat eine mögliche Fehlverteilung dieser Rezeptoren einen Einfluss auf Signalwege in Neuronen und welche Konsequenzen ergeben sich dadurch *in vivo* in der Maus?

## 1.1 Sortierung von Membranproteinen

Membranproteine wie Zelladhäsionsmoleküle und Rezeptoren sind essentiell für die Realisierung von Zell-Zell-Verbindungen und das Erkennen und Weiterleiten von Signalen in vielzelligen Organismen. An der Zelloberfläche lokalisierte Membranrezeptoren binden spezifische Botenstoffe, wie z. B. Neurotransmitter und setzen dieses extrazelluläre Signal in ein Intrazelluläres um. Durch diese Signaltransduktion werden in der angeregten Zelle Effektoren, wie z. B. Enzyme oder sekundäre Botenstoffe, reguliert. Diese Effektoren sind häufig in Kaskaden angeordnet, bei denen aktivierte Effektoren durch Interaktionen nachgeschaltete Effektoren beeinflussen. Durch diese Signalkaskaden werden bestimmte zelluläre Prozesse reguliert, wodurch die Zelle auf bestimmte äußere Faktoren reagieren kann. Die Intensität und die Dauer der zellulären Antwort hängt zum einen von der Menge des vorhandenen Botenstoffes ab, zum anderen von dem Vorhandensein und der Menge bestimmter Rezeptoren in der Zellmembran. Die Verfügbarkeit von Membranproteinen an der Zellmembran wird durch unterschiedliche vesikuläre Transportmechanismen sowie spezifische Proteininteraktionen reguliert (Abbildung 1-1).

Membranproteine werden an dem mit Ribosomen besetzten rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und durch Sequenzmotive, die von spezifischen Proteinen erkannt werden, dort in die Plasmamembran integriert (Translokation). Im ER finden die Faltung und erste posttranslationale Modifikationen der Proteine statt.<sup>[1,2]</sup> Im anterograden Transport werden die Membranproteine vom ER in COPII-besetzten Vesikeln über das ER-Golgi-Intermediärkompartiment (ERGIC) weiter zum Golgi-Apparat transportiert.<sup>[3,4]</sup> Der Golgi-Apparat ist ein perinukleäres Kompartiment, das aus einem Stapel von membranumgebenen Subkompartimenten besteht und eine starke Polarisierung aufweist. Er lässt sich in eine dem ER zugewandte *cis*- und eine dem ER abgewandte *trans*-Seite einteilen, an die sich das trans-Golgi Netzwerk (TGN) anschließt. Während des anterograden Transportes durchlaufen die Membranproteine den Golgi-Apparat von der *cis*- zur *trans*-Seite, wobei die weitere Reifung der Proteine durch posttranslationale Modifikationen stattfindet.<sup>[5-7]</sup> Das TGN ist ein zentraler Sortierungspunkt für Proteine in der Zelle. Von hier aus werden Membranproteine durch weiteren vesikulären Transport zur Zelloberfläche, zu

Endosomen oder zu Lysosomen dirigiert.<sup>[8]</sup> Vom Golgi-Apparat findet auch ein retrograder Transport zum ER durch COPI-besetzte Vesikel statt.<sup>[2]</sup>

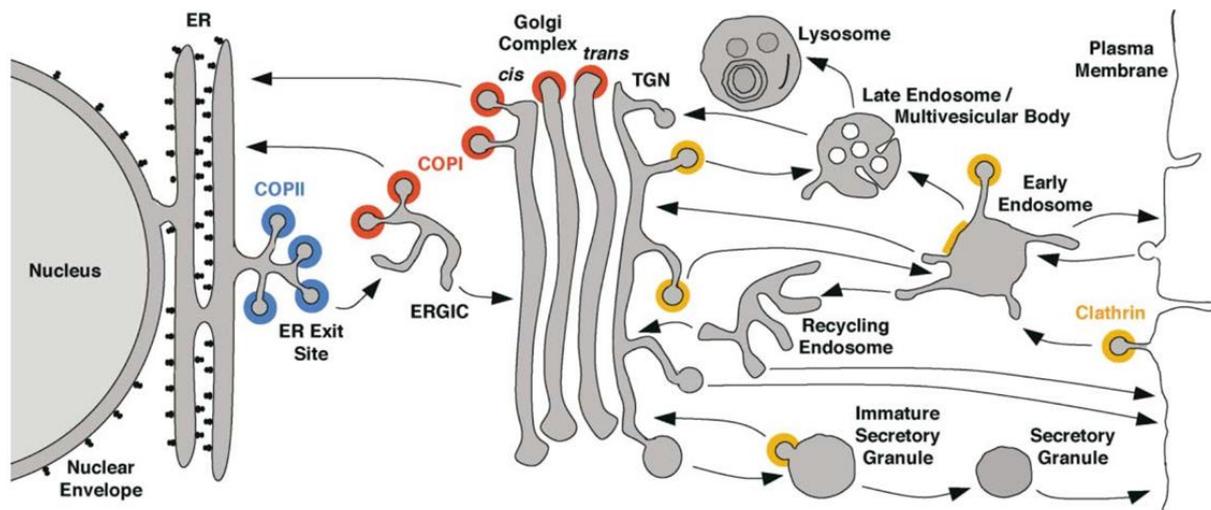


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung der Transportwege von Membranproteinen zwischen subzellulären Kompartimenten. Modifiziert nach Bonifacino und Glick (2004).

Neben dem Transport zur Zellmembran wird die Verfügbarkeit von Membranproteinen auch durch Endozytose und die danach folgende postendozytotische Sortierung beeinflusst. Viele Membranrezeptoren werden nach der Aktivierung durch die Ligandenbindung internalisiert und in Vesikeln zu frühen Endosomen transportiert.<sup>[9]</sup> Frühe Endosomen sind Sortierungspunkte für internalisierte Membranproteine. Von hier können sie direkt (schnelles Recycling) oder über weitere subzelluläre Kompartimente, die Recycling-Endosomen (langsames Recycling), wieder zurück an die Zelloberfläche transportiert werden. Weiterhin können Membranproteine von den frühen Endosomen über späte Endosomen oder multivesikuläre Kompartimente zu Lysosomen transportiert und dort degradiert werden.<sup>[10]</sup> Darüber hinaus kann von Endosomen auch ein retrograder Transport der Proteine zum TGN stattfinden, um von dort aus neu sortiert zu werden. Dieser Transportprozess wird durch das Retromer, einen membranassoziierten Multiproteinkomplex, vermittelt.<sup>[11,12]</sup> Der vesikuläre Transport ist ein komplexer Prozess, bei dem sich die beladenen Vesikel von dem Spenderkompartiment abschnüren, zum Zielort transportiert werden und dort mit dem Akzeptorkompartiment fusionieren. Bei diesen Prozessen spielen kleine GTPasen der Rab- und Arf-Familien eine entscheidende Rolle. Durch diese GTPasen werden viele Effektorproteine, wie Adapterproteine, Motorproteine und für die Fusion benötigte Faktoren gezielt an bestimmte Membranen rekrutiert und somit die Transportmaschinerie reguliert.<sup>[13,14]</sup> Die Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran am Zielkompartiment wird durch Proteine der SNARE-Familie (*soluble NSF attachment protein receptor*) vermittelt.<sup>[15,16]</sup> Die Sortierung von Membranproteinen in den verschiedenen Transportwegen ist streng reguliert und wird durch kurze Sequenzmotive vermittelt, die sich in der Regel in den

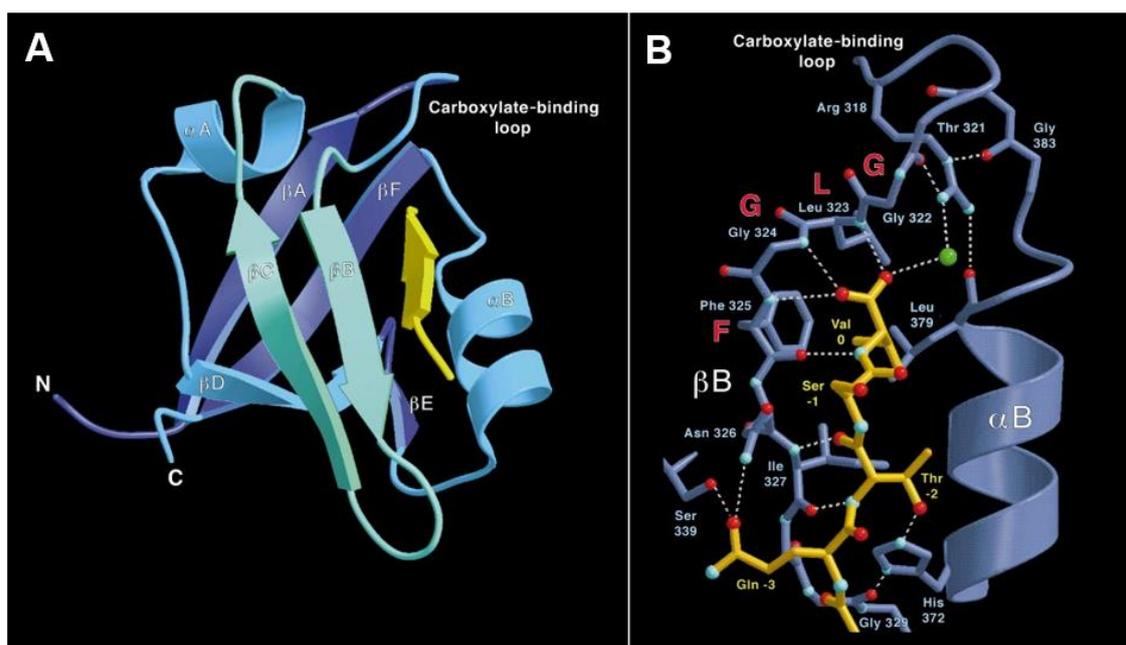
zytoplasmatischen Bereichen der zu sortierenden Proteine befinden. Durch Interaktionen dieser Motive mit spezialisierten Protein-Protein-Interaktionsdomänen von Adapterproteinen wird die Assoziation eines Rezeptors mit der Transportmaschinerie vermittelt, was zum zielgerichteten Transport der Membranproteine führt.<sup>[17]</sup> Eines dieser Motive ist der PDZ-Ligand, eine kurze Sequenz, die sich am C-terminalen Ende vieler verschiedener Membranproteine findet und eine Interaktion mit PDZ-Domänenproteinen vermittelt.

## 1.2 PDZ-Domänen

PDZ-Domänen sind Protein-Protein-Interaktionsdomänen mit einer Länge von ca. 80-100 Aminosäuren. Sie vermitteln durch die Wechselwirkung mit einem PDZ-Liganden spezifische Protein-Protein-Interaktionen. Die Bezeichnung PDZ geht historisch auf die ersten drei Proteine zurück, in denen diese Proteindomäne zum ersten Mal identifiziert wurde: PSD-95 (*postsynaptic density 95*), DLG (*disc large*) und ZO-1 (*zonula occludens 1*). Zuvor wurden auch die Bezeichnungen DHR-Domäne (*discs large homology repeat*) oder GLGF-Motiv, wegen eines konservierten GLGF-Sequenzmotivs innerhalb der Domäne, verwendet.<sup>[18,19]</sup> PDZ-Domänen zählen zu den häufigsten Protein-Interaktionsdomänen und liegen hauptsächlich in Proteinen von Metazoen vor, wurden aber auch in Proteinen von Hefen, Bakterien und Pflanzen identifiziert.<sup>[20]</sup> So wurden z. B. im Menschen 234 PDZ-Domänen in 128 Proteinen identifiziert (entnommen aus SMART (*simple modular architecture research tool*) im Genommodus; Stand August 2018). Seltener, aber mit hoher Homologie zu denen in Metazoen, wurden PDZ-Domänen in Proteinen von Bakterien und Pflanzen identifiziert. Strukturanalysen zeigten, dass bakterielle PDZ-Domänen eine ähnliche, aber abweichende Faltung zu denen in Metazoen aufweisen.<sup>[21]</sup> In Proteinen von Hefen hingegen sind PDZ-Domänen deutlich seltener zu finden und weisen nur sehr geringe Sequenzhomologien mit denen in Metazoen auf. Das verstärkte Auftreten von PDZ-Domänen in Metazoen deutet drauf hin, dass sich diese hochspezialisierten Proteinmodule evolutionär mit mehrzelligen Organismen entwickelt haben, möglicherweise, weil multizelluläre Organismen mit ihren hoch spezialisierten Zellen komplexere Signalwege benötigten.<sup>[22]</sup> In Proteinen können einzelne, aber auch mehrere PDZ-Domänen vorkommen. So besitzen ca. 18 % aller humanen PDZ-Domänen-Proteine drei oder mehr PDZ-Domänen. Damit treten PDZ-Domänen mit Ausnahme einiger repetitiver Domänen (z. B. WD40, LRR) innerhalb einer Polypeptidkette mit größerer Häufigkeit auf als andere Proteinmodule. Zum Beispiel beinhaltet das Protein MUPP1 13 PDZ-Domänen.<sup>[22]</sup>

Bei dem PDZ-Liganden handelt es sich um ein wenige Aminosäuren langes Sequenzmotiv, das sich häufig am intrazellulären, C-terminalen Ende von Membranproteinen befindet.<sup>[23,24]</sup> Aufgrund der Spezifität von PDZ-Domänen für bestimmte Sequenzmotive, werden PDZ-Domänen in drei Hauptklassen unterteilt. Hauptsächlich entscheidend für die Bindung

des Liganden an die PDZ-Domäne sind die Aminosäurereste an Position 0 und Position -2. Hierbei entspricht Position 0 der Aminosäure am C-terminalen Ende und die davor befindlichen Aminosäuren in N-terminaler Richtung entsprechen Position -1 usw. PDZ-Domänen der Klasse I interagieren mit Ligandenmotiven, die an Position 0 eine hydrophobe Aminosäure und an Position -2 eine Aminosäure mit einer freien aliphatischen Hydroxygruppe (Serin oder Threonin) aufweisen. PDZ-Domänen der Klasse II und III unterscheiden sich von PDZ-Domänen der Klasse I durch die Aminosäuren an Position -2. PDZ-Domänen der Klasse II weisen an Position -2 eine weitere hydrophobe Aminosäure und Domänen der Klasse III eine saure Aminosäure (Asparaginsäure oder Glutaminsäure) auf.<sup>[25]</sup> Die Aminosäuren an Position -1, Position -3 und weiter davor befindliche Aminosäuren spielen eine Rolle bei der Feinregulierung der Spezifität und Affinität.<sup>[26]</sup> Um den Mechanismus der Bindung der PDZ-Domäne an das Ligandenmotiv zu verstehen, wurde die Struktur von verschiedenen PDZ-Domänen mit oder ohne Ligand durch Röntgenkristallographie oder NMR-Spektroskopie aufgeklärt, so z. B. für die dritte PDZ-Domäne von PSD-95 (Abbildung 1-2).<sup>[27]</sup>



**Abbildung 1-2: Darstellung der Struktur der dritten PDZ-Domäne von PSD-95 und die Interaktion mit dem PDZ-Liganden, reproduziert von Fanning und Anderson (1996) nach Doyle *et al.* (1996).**

**A** Ribbondiagramm der dritten PDZ-Domäne von PSD-95. Der PDZ-Ligand (gelb) liegt in einer Furche zwischen dem Strang βB und der Helix αB und der C-Terminus liegt an der Schleife zwischen den Strängen βA und βB. **B** Interaktion zwischen PDZ-Domäne und -Ligand. Das Diagramm der Peptidbindungstasche zeigt Wasserstoffbrückenbindungen (gestrichelte weiße Linien) zwischen der PDZ-Domäne (blau) und dem PDZ-Liganden (orange). Die grüne Kugel stellt ein Wassermolekül dar, das die Carboxylatgruppe mit der Seitenkette von Arg318 verbindet.

Aus dieser und anderen Untersuchungen wurde ersichtlich, dass PDZ-Domänen in der Sekundärstruktur aus zwei α-Helices (αA und αB) und sechs β-Strängen (βA bis βF) bestehen, die eine kompakte, globuläre Tertiärstruktur aufweisen. Hierbei bilden jeweils zwei β-Stränge (βA/βF, βB/βC und βD/βE) antiparallele β-Faltblätter aus.<sup>[27]</sup> Dabei liegen N- und

C-Terminus der Domäne nah beieinander, wodurch eine Integration in Multidomänen-Proteine vereinfacht wird.<sup>[22]</sup> Die Bindung des Peptidliganden erfolgt in einer Furche zwischen dem Strang  $\beta$ B und der Helix  $\alpha$ B, wobei sich der Ligand ähnlich wie ein zusätzlicher  $\beta$ -Strang verhält und sich durch Wasserstoffbrückenbindungen antiparallel an den Strang  $\beta$ B anlagert. Der C-terminale Carboxylatrest (-COOH) des Liganden bindet über Wasserstoffbrückenbindungen an eine Schleife zwischen  $\beta$ A und  $\beta$ B, die das konservierte GLGF-Motiv beinhaltet.<sup>[27]</sup> Die Carboxylatrest-Bindungsschleife sowie die Furche zwischen der Helix  $\alpha$ B und dem Strang  $\beta$ B sind ohne gebundenen Peptidliganden nur wenig flexibel, wodurch angenommen werden kann, dass PDZ-Domänen eine vorgeformte Bindungstasche besitzen.<sup>[28]</sup> Weiterhin wird die dreidimensionale Struktur der Domäne durch die Bindung des Peptidliganden nur minimal verändert.<sup>[27]</sup>

Die Affinitäten der Bindung zwischen PDZ-Domänen und Peptidliganden sind mit Dissoziationskonstanten von wenigen nM bis einigen  $\mu$ M im Mittel moderat, weshalb sich durch PDZ-Domänen vermittelte Interaktionen gut für regulatorische Prozesse eignen.<sup>[22]</sup> Ursprünglich wurde angenommen, dass die Interaktion von PDZ-Ligandenmotiven und PDZ-Domänen promiskuitiv ist. So interagieren viele Membranproteine, die einen PDZ-Liganden besitzen, mit ähnlichen Affinitäten mit mehreren verschiedenen PDZ-Domänenproteinen und umgekehrt. Das wirft die Frage auf, wie durch PDZ-Domänen spezifische Prozesse reguliert werden, wenn verschiedene Liganden beinhaltende Proteine mit ähnlichen Affinitäten gebunden werden können. Eine mögliche Erklärung wurde in einer vor kurzem veröffentlichten Studie zur Bindungsspezifität der PDZ-Domäne des Proteins Shank3 vorgeschlagen, aufgrund dessen die Affinitäten und Spezifitäten zwischen PDZ-Domänen und -Liganden zum Teil neu bewertet werden müssen. Die PDZ-Domäne von Shank3 interagiert neben dem PDZ-Liganden von SAPAP auch mit den Liganden vieler anderer Proteine, wie den Neuroliginen (NLGN), Calciumkanälen,  $\beta$ -PIX und mGluR. Dabei interagieren z. B. SAPAP3, NLGN1, NLGN3 und  $\beta$ -PIX mit ähnlichen, moderaten Affinitäten mit der isolierten PDZ-Domäne von Shank3.<sup>[29]</sup> Interessanterweise interagiert SAPAP3 mit einer ca. 100-fach größeren Affinität mit einem Fragment der PDZ-Domäne von Shank3, das auch eine N-terminal Erweiterung vor der PDZ-Domäne beinhaltet. Durch Strukturanalysen eines Komplexes, bestehend aus der erweiterten PDZ-Domäne und des Liganden von SAPAP3, der ebenfalls um den N-terminalen Bereich vor dem Liganden verlängert war, wurde eine zweite Bindungsstelle vor der PDZ-Domäne identifiziert. Diese Bindungstasche besteht aus der N-terminalen Erweiterung vor der PDZ-Domäne, die zwei  $\beta$ -Haarnadelstrukturen ausbildet und der Schleife zwischen dem Strang  $\beta$ B und  $\beta$ C der PDZ-Domäne. Zusammen formen diese beiden Strukturen eine weitere hydrophobe Tasche, an die sich der Bereich vor dem PDZ-Liganden anlagert. Diese Form der erweiterten

Interaktion zwischen PDZ-Domäne und -Liganden könnte erklären, warum bestimmte, durch PDZ-Domänen vermittelte Protein-Protein-Komplexe bevorzugt vorliegen.<sup>[29]</sup>

In der Regel ist die Interaktion zwischen PDZ-Domäne und einem entsprechenden Liganden konstitutiv, jedoch müssen einige Membranrezeptoren erst Agonisten-abhängig aktiviert werden, damit eine Bindung des PDZ-Liganden an eine entsprechende PDZ-Domäne erfolgen kann. Zum Beispiel interagiert die PDZ-Domäne des Proteins NHERF1 (*Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger Regulatory Factor 1*) nur mit dem PDZ-Liganden des aktivierten  $\beta$ 2-adrenergen Rezeptors.<sup>[30]</sup>

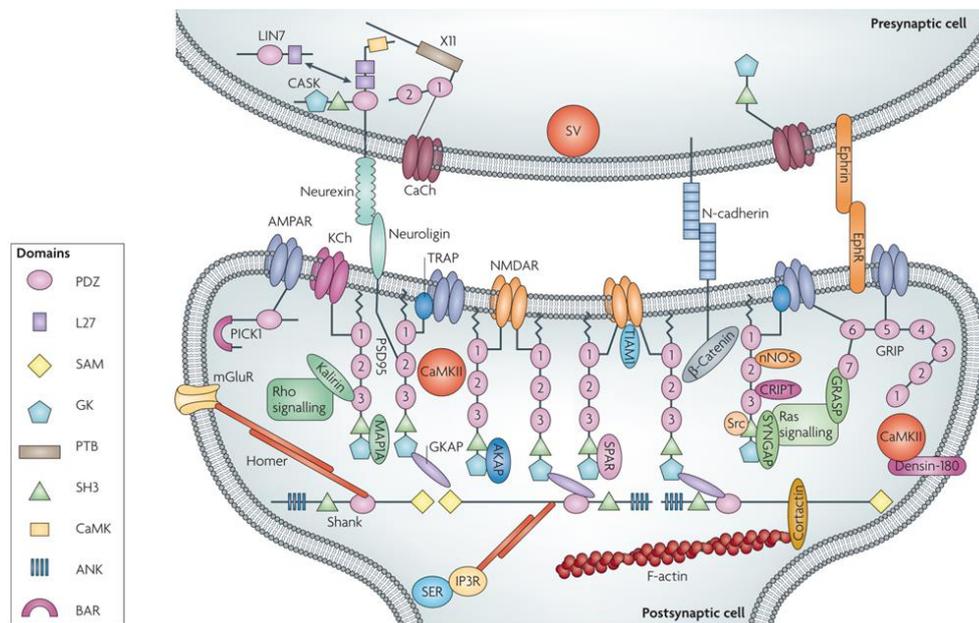
### 1.3 Funktionen von PDZ-Domänenproteinen

Eine oder mehrere PDZ-Domänen können in Proteinen alleine oder in Kombination mit anderen Proteindomänen auftreten und dadurch unterschiedliche Funktionen für ihre Interaktionspartner haben. Die PDZ-Domänen vermittelten Funktionen lassen sich in mehrere Kategorien einteilen. PDZ-Domänenproteine interagieren an Membranen von subzellulären Kompartimenten mit Membranproteinen und regulieren deren Transport zwischen subzellulären Strukturen. Dazu zählen anterograde Transportprozesse im sekretorischen Weg sowie retrograde Transportprozesse, wie die Internalisierung, das Recycling und der Transport zu Lysosomen.<sup>[22]</sup> Darüber hinaus findet aber auch ein PDZ-Domänen unabhängiger Transport von Membranproteinen statt.<sup>[31–33]</sup> PDZ-Domänenproteine vermitteln in vielen Fällen die Verankerung ihrer Interaktionspartner in hoch komplexen Proteinnetzwerken an der Zellmembran.<sup>[34,35]</sup>

Ein gut untersuchtes Proteinnetzwerk ist die postsynaptische Dichte (PSD) in exzitatorischen, glutamatergen Synapsen.<sup>[36]</sup> Die PSD beinhaltet Membranrezeptoren, Ionenkanäle, Zelladhäsionsmoleküle, Signalproteine (wie Kinasen und Phosphatasen) und deren Regulatoren, Komponenten des Zytoskeletts sowie deren Regulatoren und Transportproteine. Diese Komponenten werden durch Gerüstproteine und weitere Adapterproteine zu einem großen Proteinkomplex assembliert. Eine zentrale Rolle als Gerüstprotein bei der Verankerung der einzelnen Komponenten übernehmen dabei die stark in der PSD angereicherten PDZ-Domänenproteine der MAGUK- (wie z. B. PSD-95), Shank- (wie z. B. Shank3) und MAGI-Familien (Abbildung 1-3).<sup>[35]</sup> So interagiert z. B. PSD-95 über seine PDZ-Domänen direkt mit Untereinheiten von *N-methyl-D-aspartate* (NMDA)-Rezeptoren (NMDAR), mit verschiedenen Neuroliginen sowie mit Stargazin, das für die Verankerung von  *$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid* (AMPA)-Rezeptoren (AMPA) in der PSD verantwortlich ist.<sup>[23,37,38]</sup>

Die PSD dient dem Erkennen, der Verarbeitung und Weiterleitung von neuronalen Signalen. Dabei ist die Dynamik der enthaltenden Signalkomplexe entscheidend für Prozesse der

synaptischen Plastizität, wie der Langzeitpotenzierung (*long-term potentiation*, LTP) und Langzeitdepression (*long-term depression*, LTD).



**Abbildung 1-3: Darstellung der postsynaptischen Dichte.**

Die PSD ist ein dicht gepacktes Proteinnetzwerk unterhalb der postsynaptischen Plasmamembran. Sie besteht aus Membranrezeptoren, Ionenkanälen, Zelladhäsionsmolekülen, Gerüstproteinen, Adapterproteinen, Signalproteinen und Komponenten des Zytoskeletts. Die Architektur dieses Proteinnetzwerkes wird durch Proteine geformt und reguliert, die eine oder mehrere Protein-Protein-Interaktionsdomänen beinhalten und dadurch die verschiedenen Komponenten zu Signalkomplexen clustern. Modifiziert nach Feng und Zhang (2009).

Durch diese Prozesse kann die Ausstattung der Synapse mit Neurotransmitterrezeptoren geändert werden, wodurch gezielt die Effizienz von bestimmten Synapsen verstärkt oder abgeschwächt werden kann. Prozesse der synaptischen Plastizität werden als Voraussetzung für komplexe Gehirnfunktionen wie dem Lernen oder Gedächtnis angesehen, indem durch Änderung der synaptischen Signalübertragung die Verarbeitung von Informationen durch neuronale Netzwerke moduliert wird.<sup>[39]</sup> Die Wichtigkeit der Interaktionen und Zusammensetzung der PSD wird dadurch deutlich, dass Mutationen in den kodierenden Genen für viele der postsynaptisch lokalisierten Proteine, wie z. B. Neuroigin und Shank, zu Autismus oder anderen neurologischen Erkrankungen führen.<sup>[40,41]</sup>

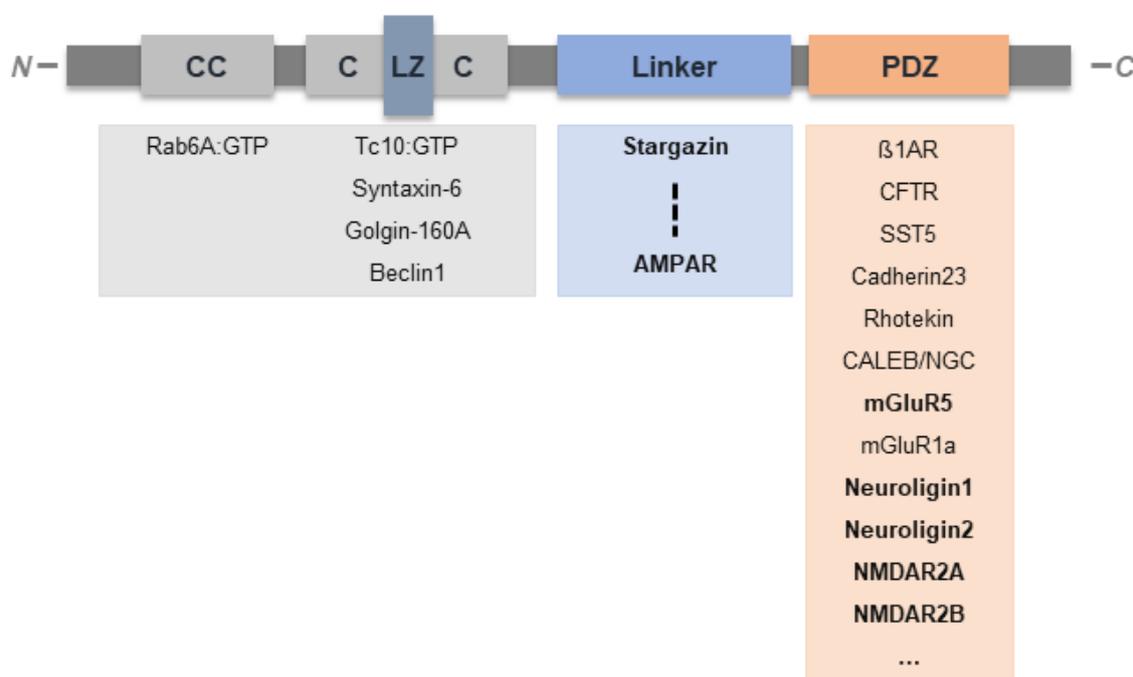
Mehrere der in der PSD angereicherten Membranrezeptoren interagieren auch mit dem ubiquitär exprimierten, Golgi-assoziierten PDZ-Domänenprotein PIST. Die durch PIST vermittelten Funktionen in Bezug auf seine Interaktionspartner werden im Folgenden genauer vorgestellt.

### 1.4 Das PDZ-Domänenprotein PIST

Das *PDZ protein interacting specifically with Tc10* (PIST) wurde zuerst als Protein beschrieben, das spezifisch mit der GTP-gebundenen Form von TC10 (TC10:GTP), aber nicht mit dem eng verwandten Protein Cdc42 interagiert. TC10 gehört, genauso wie Cdc42,

zu der Familie der Rho GTPasen, die den Umbau des Zytoskeletts und die Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden vermitteln.<sup>[42]</sup> Neben der Proteinbezeichnung PIST wurde, ungefähr zur gleichen Zeit, in weiteren Publikationen auch die Bezeichnung *Golgi-associated PDZ and coiled-coil motif-containing protein* (GOPC), *CFTR-associated ligand* (CAL) und *Fused in Glioblastoma* (FIG) eingeführt.<sup>[43–45]</sup> In dieser Arbeit wird die Proteinbezeichnung PIST verwendet. PIST ist ein Multidomänenprotein und besteht, von N- zum C-Terminus, aus zwei *Coiled-coil*-Domänen (CC-Domäne), von denen die zweite CC-Domäne ein Leucin-*Zipper*-Motiv (LZ) enthält. Daran anschließend befindet sich eine Linker-Region (LR), gefolgt von einer PDZ-Domäne.<sup>[42–45]</sup> Bei der PDZ-Domäne von PIST handelt es sich um eine Domäne der Klasse I mit einer für PDZ-Domänen typischen Struktur.<sup>[46]</sup>

Über die verschiedenen Domänen von PIST (CC-Domäne, LZ, LR und PDZ-Domäne) werden Interaktionen mit einer großen Anzahl von Proteinen vermittelt. Durch die CC-Domänen von PIST wird, neben der subzellulären Lokalisierung, auch eine Interaktion mit verschiedenen Proteinen vermittelt (Abbildung 1-4).



**Abbildung 1-4: Schematische Darstellung der Domänenstruktur und einiger Interaktionspartner von PIST.**

PIST besteht aus zwei *Coiled-coil*-Domänen (CC), von denen die zweite ein Leucin-*Zipper*-Motiv (LZ) enthält. Daran anschließend befindet sich eine Linker-Region (Linker) gefolgt von einer PDZ-Domäne (PDZ). Über alle Domänen werden Interaktionen mit anderen Proteinen vermittelt. Einige Beispiele sind unter den Domänen, die für die Interaktion verantwortlich sind, aufgelistet.

An die erste CC-Domäne von PIST bindet eine GTP-gebundene Form der Golgi-lokalisierter GTPase Rab6 (Rab6A:GTP). Rap GTPasen sind wichtige Regulatoren des intrazellulären, vesikulären Transports und spielen eine Rolle bei dem Erhalt und den Funktionen des Golgi-Apparates.<sup>[47]</sup> Durch die zweite CC-Domäne wird, neben der Interaktion mit TC10, eine

Interaktion mit dem Q-SNARE Protein Syntaxin6, dem Golgi-assoziierten Protein Golgin160 sowie mit Beclin1, einem Regulator der Autophagie, vermittelt.<sup>[45,48,49]</sup> Für die Linker-Region von PIST wurde eine Interaktion mit dem Protein Stargazin beschrieben.<sup>[50]</sup> Über die PDZ-Domäne von PIST findet eine Interaktion mit einer Vielzahl von Membranproteinen statt. Auf die durch die PDZ-Domäne vermittelten Interaktionen und die Rolle von PIST für Interaktionspartner wird in Abschnitt 1-5 gesondert eingegangen.

Es sind mehrere Isoformen von PIST bekannt, die entwicklungspezifisch und gewebeabhängig reguliert sind. Gewebeabhängig werden zwei Isoformen unterschieden, eine nicht-neuronale und eine neuronale Form. Neuronales PIST (nPIST) unterscheidet sich von der nicht-neuronalen Form durch acht zusätzliche Aminosäuren in der zweiten *Coiled-coil*-Domäne.<sup>[49]</sup> In *Western Blot*-Analysen von Gehirnllysaten von Ratten unterschiedlicher Entwicklungsstadien wurden vier verschiedene Isoformen mit unterschiedlichem Molekulargewicht (60 kDa, 57 kDa, 55 kDa und 35 kDa) detektiert, die entwicklungspezifisch reguliert werden. Die Isoform von 55 kDa, die in verschiedenen Publikationen üblicherweise das Protein von Interesse darstellt, wurde schon in frühen Embryonalstadien nachgewiesen (Embryonaltag 12,5). Die Expression dieser Isoform nimmt ab Embryonaltag 18,5 zu, erreicht das Expressionsmaximum postnatal an Tag 11 und wird dann gleichbleibend exprimiert. Die Isoform von 60 kDa wird ebenfalls in einem frühen Embryonalstadium exprimiert, hingegen nimmt die Expression dieser Isoform im Laufe der Entwicklung ab und ist postnatal kaum noch nachzuweisen. Genauso verhält es sich mit der Isoform von 57 kDa, wohingegen diese Isoform wieder postnatal an Tag 21 exprimiert wird. Die kleinste Isoform von 35 kDa wird erst postnatal ab Tag 11 exprimiert.<sup>[51]</sup> Später wurden in HEK293-Zellen noch zwei weitere Isoformen von PIST identifiziert. Beide Isoformen zeichnen sich dadurch aus, dass ein Großteil der PDZ-Domäne fehlt. Es handelt sich hierbei um Spleißvarianten von PIST und nPIST, bei denen Exon 6 (Exon 5 in der Maus) herausgespleißt wird, welches für den Großteil der PDZ-Domäne kodiert.<sup>[52]</sup> In unabhängigen Publikationen konnte die PIST mRNA in Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Leber Skelettmuskel, Niere, Pankreas, Milz, Thymus, Prostata, Hoden, Eierstock, Dünndarm, Dickdarm und peripheren Blutlymphozyten nachgewiesen werden.<sup>[42,44,45]</sup> Diese Beobachtungen wurden für viele der genannten Gewebe auf Proteinebene bestätigt und konnten von Cuadra *et al.* (2004) um die Gehirnregionen Cortex, Cerebellum und Hippocampus erweitert werden, in denen nPIST im Vergleich zu anderen Geweben stark angereichert ist.<sup>[45,50]</sup> Die Expression im Magen ist unklar, da in zwei unabhängigen Untersuchungen PIST, auf Proteinebene, im Magen einmal detektiert und einmal nicht-detektiert wurde.<sup>[45,50]</sup> Die Expression der kurzen Isoformen von PIST in unterschiedlichen Mausgeweben wurde durch PCR-Analysen mit cDNA analysiert. Genauso

wie die langen, werden die kurzen Isoformen in nahezu allen getesteten Geweben transkribiert, einschließlich des Magens.<sup>[52]</sup>

Die Expression von PIST im ZNS wurde durch Immunhistochemie genauer untersucht. In allen Regionen des cerebralen Cortex und des Cerebellums wurde eine starke bis sehr starke Expression von PIST nachgewiesen. Im Hippocampus wurde in der Region CA2 eine sehr starke Expression detektiert, wohingegen in den Regionen CA1 und CA3 nur wenig PIST nachgewiesen wurde. Dabei ist PIST nicht ubiquitär in allen Neuronen gleichermaßen exprimiert. So wurden neuronale Zellpopulationen beobachtet, die eine starke Immunreaktivität für PIST aufwiesen, wohingegen in benachbarten Zellen kaum bis kein PIST nachgewiesen wurde.<sup>[53]</sup> Die subzelluläre Lokalisierung von PIST beschränkt sich im Wesentlichen auf die perinukleäre Struktur des Golgi-Apparates. Für diese Lokalisierung ist die zweite *Coiled-coil*-Domäne von PIST verantwortlich.<sup>[43,45]</sup> In nicht-neuronalen Zellen kolokalisiert PIST mit Markerproteinen des TGN (z. B. TGN38), aber nicht mit Makern anderer Golgi-Strukturen (medial- und cis-Golgi).<sup>[43-45]</sup> In primären, neuronalen Zellen und Geweben wurde PIST, neben der somatischen Golgi-Struktur, auch in Dendriten beobachtet, wo es ebenfalls mit TGN38 kolokalisiert.<sup>[50,51,53]</sup> Chen *et al.* (2012) haben gezeigt, dass sich diese Golgi-Ausläufer in der Regel in den Hautpseudodendriten erstrecken und eine fragmentierte Morphologie zeigen, wie sie für sogenannte Golgi-*outposts* beschrieben wurden.<sup>[53]</sup> Golgi-*outposts* sind wichtige Sortierungspunkte für neuronale Membranproteine.<sup>[54,55]</sup> Weiterhin konnten Chen *et al.* PIST nicht in exzitatorischen oder inhibitorischen postsynaptischen Strukturen detektieren. Durch Lebendzellmikroskopie und Photokonvertierungsexperimente wurde gezeigt, dass überexprimiertes PIST in Neuronen stationär am Golgi verweilt und sich auch nur sehr langsam innerhalb des Golgi-Apparates verteilt.<sup>[53]</sup> Außerhalb des Golgi-Apparates wurde PIST nur unter bestimmten Bedingungen beobachtet. So wurde in Zellen beobachtet, dass die Stimulation des  $\beta$ 1-adrenergen Rezeptors mit dem Agonisten Isoproterenol zu einer breiten, über die Zelle verteilten Lokalisierung von PIST führt.<sup>[56]</sup> Außerdem führt die gemeinsame Überexpression von PIST und Frizzled5 zu einer detektierbaren Menge von PIST an der Plasmamembran.<sup>[43]</sup> Auch durch die Koexpression mit Kv10.1 kommt es zu einer detektierbaren Menge von PIST an der Zellperipherie.<sup>[52]</sup> Außerdem folgt, durch die Überexpression einer konstitutiv aktiven Form von TC10 (TC10(Q75L)) eine Umverteilung von PIST, hin zur Plasmamembran.<sup>[57]</sup>

## 1.5 Durch die PDZ-Domäne von PIST vermittelte Interaktionen

Für PIST wurden eine Reihe von Interaktionen mit Membranproteinen beschrieben, die über die PDZ-Domäne vermittelt werden. Wie in Abschnitt 1.3 beschrieben, sind durch PDZ-Domänen vermittelte Interaktionen wichtig, um Membranproteine korrekt in der Zelle zu verteilen und in spezialisierten Strukturen zu verankern. In der Literatur wurden für PIST zum

Teil deutlich voneinander abweichende Funktionen in Bezug auf die Sortierung verschiedener Interaktionspartner vorgeschlagen. So wurde in *in vitro*-Untersuchungen gezeigt, dass PIST, je nach untersuchtem Interaktionspartner und Modellsystem, einen Einfluss auf den anterograden sekretorischen und den retrograden post-endozytotischen Transport von Membranproteinen hat. Dabei wurde beobachtet, dass PIST eine Rolle bei dem Transport von Rezeptoren zu spezialisierten Regionen an der Plasmamembran spielt sowie einen Einfluss auf die Internalisierung, die lysosomale Degradierung und das Recycling hat. Eine häufig wiederkehrende Beobachtung ist, dass neu synthetisierte Rezeptoren durch PIST am TGN zurückgehalten werden. Diese vielfältigen Funktionen werden im Folgenden anhand einiger Beispiele genauer beschrieben.

Ein gut untersuchter Interaktionspartner von PIST ist der *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR). CFTR ist ein durch zyklisches AMP (cAMP) regulierter Chloridkanal, der eine wichtige Funktion für die Salz- und Wasser-Balance in vielen unterschiedlichen Geweben, wie z. B. den Atemwegen und dem Darm, hat. Es wurde beschrieben, dass PIST den CFTR in der Zelle zurückhält und dadurch die Proteinmenge sowie die Halbwertszeit des Rezeptors an der Plasmamembran reduziert, was mit verminderten Chloridströmen einhergeht. Interessanterweise führt die Koexpression mit einem weiteren PDZ-Domänenprotein, dem NHERF1, zur Aufhebung der Retention und Wiederherstellung der Proteinmenge sowie der durch CFTR vermittelten Chloridströme.<sup>[44]</sup> Darüber hinaus wurde für PIST auch eine Funktion beim lysosomalen Abbau des CFTR vorgeschlagen, da die Überexpression von PIST die gesamte Proteinmenge des CFTR reduziert. Aus diesem Grund wurde PIST als Zielmolekül für die Behandlung der Mukoviszidose vorgeschlagen.<sup>[58]</sup> Dieser Effekt wird vermutlich durch die Interaktion von PIST mit TC10 und Syntaxin6 reguliert. Die Expression einer konstitutiv aktiven Form von TC10 führt zu einer erhöhten Gesamtproteinmenge und einer erhöhten Menge von CFTR an der Plasmamembran.<sup>[57]</sup> Als Gegenspieler dieses Effektes wurde Syntaxin6 identifiziert. Die Überexpression von Syntaxin6 fördert den lysosomalen Abbau von CFTR und führt zu reduzierten Gesamtproteinmenge.<sup>[59]</sup>

Für den Einfluss von PIST auf die gesamte Proteinmenge von Interaktionspartnern sind noch weitere Beispiele bekannt. So wird die Proteinmenge des Chloridkanals CIC-3B durch Überexpression von PIST reduziert.<sup>[60]</sup> Genauso verhält es sich mit den Proteinmengen des *multidrug resistance-associated protein 2* (Mrp2), ein apikaler Anionentransporter in Epithelzellen sowie MUC3, ein transmembranes Mucin.<sup>[61,62]</sup>

Für die Retention von Interaktionspartnern nach Überexpression von PIST sind viele weitere Beispiele bekannt. So wird Protocadherin15, eine Komponente der Verknüpfung von Haarzellen im Innenohr, und Cadherin23 durch PIST am TGN zurückgehalten.<sup>[63,64]</sup> Cadherin23, das ebenfalls in Haarzellen im Innenohr eine Rolle spielt, vermittelt

Zell-Zell-Adhäsionen.<sup>[65]</sup> Genauso wie beim CFTR kann die Interaktion mit weiteren PDZ-Domänenproteinen die Retention von Cadherin23 aufheben. Sowohl MAGI-1<sup>[66]</sup> und Harmonin<sup>[67]</sup> interagieren mit Cadherin23 und heben die Retention von Cadherin23 durch PIST am TGN auf.<sup>[64]</sup> Neben dem Einfluss auf Cadherine, hat PIST auch eine Funktion bei der Verteilung von weiteren Zelladhäsionsmolekülen. In Epithelzellen kommt es durch die Überexpression von PIST zu reduzierten Proteinmengen von Claudin-1 und Claudin-2 in „tight junctions“, dies führt zu einem reduzierten transepithelialen Widerstand.<sup>[68]</sup>

Wie beim CFTR und Cadherin23 wurde auch für den Somatostatinrezeptor 5 (SST5) und den  $\beta$ 1-adrenergen Rezeptor ( $\beta$ 1AR) eine Regulation durch weitere PDZ-Domänenproteine beobachtet. SST5 wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Kreienkamp als Interaktionspartner von PIST identifiziert.<sup>[69]</sup> SST5 reguliert die Sekretion von Hormonen, wie z. B. Insulin. SST5 wird durch PIST am TGN zurückgehalten, was in PIST-überexprimierenden Insulin-produzierenden Zellen zu einer gesteigerten Insulinsekretion führt, da die Zellen aufgrund einer reduzierten Rezeptormenge an der Plasmamembran unempfindlicher für den SST5-Agonisten SST sind.<sup>[70]</sup> Die Retention von SST5 am TGN wird durch NHERF1 aufgehoben und der Rezeptor wieder zur Zelloberfläche transportiert.<sup>[33]</sup> Interessanterweise wurde für SST5 im Gegensatz zu anderen Membranproteinen, wie dem genannten CFTR, ein positiver Effekt auf die Rezeptorstabilität beobachtet. So führt die Überexpression von PIST zu einer erhöhten Proteinmenge von SST5.<sup>[33]</sup> Auch der  $\beta$ 1AR wird, vermittelt über die PDZ-Domäne von PIST, am TGN zurückgehalten<sup>[71]</sup>, was sich in einer reduzierten Aktivität des MAP-Kinase Signalweges nach der Behandlung mit einem  $\beta$ 1AR-Agonisten widerspiegelt.<sup>[56]</sup> Eine genauere Untersuchung zeigte, dass PIST neben einer Funktion auf den anterograden Transport von  $\beta$ 1AR auch eine Rolle bei dessen postendozytotischen Recycling hat. So wird durch die Überexpression von PIST die Menge von  $\beta$ 1AR reduziert, die nach der Agonist-induzierten Internalisierung wieder an die Membran transportiert wird. Darüber hinaus wurde auch ein leichter Effekt von PIST auf die Internalisierung von  $\beta$ 1AR beobachtet. Wie schon für den SST5 beobachtet, wird auch der  $\beta$ 1AR durch PIST stabilisiert, indem PIST die Halbwertszeit des Rezeptors erhöht. Auch die Retention des  $\beta$ 1AR durch PIST kann durch ein weiteres PDZ-Domänenprotein gelöst werden. So hebt die Koexpression von PIST und  $\beta$ 1AR mit dem an der Plasmamembran lokalisierten Gerüstprotein PSD-95 die Retention des Rezeptors am TGN auf, so dass er wieder an die Plasmamembran transportiert wird.<sup>[56]</sup> Ähnliche Beobachtungen in Bezug auf den Transport, die Internalisierung und die durch die Stimulierung des Rezeptors hervorgerufene MAP-Kinase Signalweg Aktivierung wurden auch für den *corticotropin releasing factor (CRF) receptor1* (CRFR1) beschrieben, der ebenfalls mit der PDZ-Domäne von PIST interagiert.<sup>[72]</sup>

Für den spannungsabhängigen Kaliumkanal Kv10.1 wurde ein positiver Effekt von PIST auf die Membranexpression beschrieben. Die Überexpression von PIST führt zu einer erhöhten Proteinmenge des Kanals an der Plasmamembran, die mit einer größeren Amplitude der durch Kv10.1 vermittelten Ströme einhergeht. Dabei ist die zelluläre Proteinmenge des Kanals unverändert.<sup>[52]</sup>

Neben einer Funktion in der Sortierung von Membranrezeptoren wurde PIST auch mit der Regulation von Autophagie in Verbindung gebracht. CD46 ist ein ubiquitär exprimierter humaner Membranrezeptor, der verschiedene Pathogene bindet und benötigt wird, um nach der Internalisierung der Pathogene die Infektion durch Autophagie zu bekämpfen. PIST interagiert mit CD46 und verbindet diesen mit dem VPS34/Beclin1-Komplex, der die Formation von Autophagosomen vermittelt. Der *Knockdown* von PIST hat einen negativen Effekt auf die durch das Pathogen ausgelöste Autophagie. Hingegen wird die durch das Hungern von Zellen ausgelöste Autophagie nicht beeinflusst.<sup>[73]</sup>

Wie aus dieser Übersicht über die möglichen Funktionen von PIST hervorgeht, wurde der Effekt von PIST auf seine Interaktionspartner vornehmlich in kultivierten Tumorzelllinien analysiert. Die Rolle von PIST im ZNS ist jedoch unklar. Durch Präzipitationsexperimente und Immunzytochemie wurde gezeigt, dass endogenes PIST mit Rhotekin und  $\beta$ -Catenin in Gehirngewebe interagiert und PIST mit beiden Proteinen in primären Rattenneuronen in Synapsen kolokalisiert.<sup>[51]</sup> Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu den Daten von Chen *et al.* (2012), die PIST nicht in Synapsen detektieren konnten (siehe Abschnitt 1.4). Außerdem interagiert PIST mit CALEB/NGC, einem neuronalen Mitglied der EGF-Proteinfamilie, das wichtig für die Bildung von Neuriten ist. In primären Rattenneuronen kolokalisiert PIST mit CALEB/NGC in perinukleären Golgi-Strukturen, die sich auch in den Hauptdendriten erstrecken und vermittelt den Transport von CALEB/NGC vom Zellkörper in die Dendriten.<sup>[74,75]</sup> Neben diesen Membranproteinen interagiert PIST mit verschiedenen Neurotransmitterrezeptoren und Zelladhäsionsproteinen, die eine Rolle in der PSD spielen. Ein Effekt von PIST auf einige dieser Membranrezeptoren wurde in dieser Arbeit genauer analysiert, weswegen diese nun einzeln betrachtet werden.

### 1.5.1 Metabotrope Glutamatrezeptoren

PIST wurde als Interaktionspartner der G-Protein-gekoppelten Klasse I metabotropen Glutamatrezeptoren mGluR1a und mGluR5 identifiziert. Die Interaktion wird über die PDZ-Domäne von PIST und den PDZ-Liganden der Rezeptoren vermittelt.<sup>[76–78]</sup> Durch die Interaktion mit überexprimierten PIST wird die, durch einen Agonisten induzierte, Signaltransduktion von mGluR1a vermindert. Unter basalen Bedingungen ist keine Kolokalisierung von PIST und mGluR1a beobachtet worden. Erst nach der Behandlung des Rezeptors mit einem Agonisten war ein Teil des Rezeptors mit PIST kolokalisiert.<sup>[77]</sup>

mGluR5 ist in vielen Bereichen des ZNS, wie dem Cortex, Hippocampus, Thalamus und Cerebellum exprimiert.<sup>[79,80]</sup> mGluR5 spielt eine Rolle bei der synaptischen Plastizität, insbesondere bei der synaptischen LTD im Hippocampus.<sup>[81]</sup> In mGluR5-defizienten Mäusen sind Lernverhalten und Erinnerungsvermögen reduziert.<sup>[82]</sup> Darüber hinaus ist in mGluR5-defizienten Mäusen auch die Fähigkeit reduziert gemachte Erfahrungen wieder zu verlernen.<sup>[83]</sup> mGluR5 moduliert die synaptische Plastizität durch Aktivierung des ras/raf/MAPK-Signalweges sowie des Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K)/AKT-Signalweges.<sup>[84-87]</sup> PIST reduziert die Ubiquitinierung des Rezeptors und stabilisiert diesen auf diese Weise.<sup>[78]</sup> mGluRs interagieren mit dem an Synapsen lokalisierten Protein HOMER und werden über diese Interaktion vermutlich in der PSD verankert.<sup>[88]</sup>

## 1.5.2 Ionotrope Glutamatrezeptoren

Ionotrope Glutamatrezeptoren vermitteln einen großen Anteil der Signale an exzitatorischen Synapsen und tragen zu der synaptischen Plastizität bei. Sie lassen sich in NMDA-, AMPA- und Kainat-Rezeptoren unterteilen. NMDA- und AMPA-Rezeptoren sind stark in der PSD angereichert und werden dort, vermittelt durch PDZ-Domänenproteine, verankert. Die Verankerung ist unterschiedlich reguliert. NMDA-Rezeptoren sind relativ stabile Komponenten der PSD, hingegen werden AMPA-Rezeptoren eher dynamisch in die PSD eingebaut und recycelt.<sup>[89,90]</sup>

AMPA-Rezeptoren sind tetramere Ionenkanäle und setzen sich aus vier Untereinheiten zusammen (GluR1-GluR4), wobei die meisten AMPA-Rezeptoren Heterotetramere sind, die sich aus zwei der Untereinheiten zusammensetzen. Durch die Zusammensetzung werden die elektrophysiologischen Eigenschaften des Rezeptors moduliert.<sup>[91]</sup> Die GluR1, GluR2 und GluR4 Untereinheiten des AMPA-Rezeptors interagieren, vermutlich über die Transmembrandomäne, direkt mit Mitgliedern der Familie der *transmembrane AMPA-receptor regulatory proteins* (TARPs), wie z. B. Stargazin. Die Integration von AMPA-Rezeptoren in die Synapse ist von dem C-terminalen PDZ-Ligandenmotiv (Aminosäuren 319-323) von Stargazin abhängig. Über dieses Motiv wird eine Interaktion mit einer PDZ-Domäne von PSD-95 vermittelt. Diese Interaktion sorgt dafür, dass AMPA-Rezeptoren in die PSD eingebaut werden. Eine Variante von Stargazin, der dieser PDZ-Ligand fehlt, ist nicht in Synapsen detektierbar und führt in hippocampalen Neuronen zu einer gestörten AMPA-Rezeptor vermittelten Signalantwort.<sup>[38,92]</sup> In der Stargazer-Mauslinie, die eine Mutation in *Stargazin*-Gen trägt, wurde gezeigt, dass keine funktionellen AMPA-Rezeptoren mehr gebildet werden können, hingegen wrden NMDA-Rezeptoren nicht beeinflusst.<sup>[93,94]</sup> Von Cuadra *et al.* (2004) wurde gezeigt, dass neben dem PDZ-Liganden auch der Bereich zwischen Aminosäuren 244-283 wichtig für die synaptische Lokalisierung von Stargazin ist. Die Aminosäuren 262-282 innerhalb dieses Bereiches binden an die

Linker-Region von PIST. Dies bedeutet, dass Stargazin mit PIST und PSD-95 gleichzeitig interagieren kann, da die Bindung über verschiedene Bereiche vermittelt wird. Die Überexpression einer Variante von PIST, der die Linker-Region und die PDZ-Domäne fehlt, führt zu einem stark reduzierten Einbau der AMPA-Rezeptor Untereinheit GluR1 in Synapsen. Die Interaktion von PIST mit Stargazin scheint also wichtig für den zielgerichteten Transport von AMPA-Rezeptoren an die postsynaptische Membran zu sein.<sup>[50]</sup>

NMDA-Rezeptoren sind, wie AMPA-Rezeptoren, heterotetramere Ionenkanäle. Sie setzen sich aus den Untereinheiten NMDAR1 (GluN1), NMDAR2 (GluN2) und NMDAR3 (GluN3) zusammen, wobei für die Untereinheiten jeweils mehrere Isoformen bekannt sind. NMDAR-Rezeptoren bestehen in der Regel immer aus zwei NMDAR1 Untereinheiten und zwei variablen Untereinheiten. Die Zusammensetzung des Rezeptors hat einen Einfluss auf die Eigenschaften des Kanals. So wird zum Beispiel die Isoform NMDAR2B hauptsächlich in frühen postnatalen Entwicklungsstadien des Gehirns exprimiert. Über die Zeit steigt die Expression der Untereinheit NMDAR2A an, bis diese die Expression von NMDAR2B übersteigt, was einen Einfluss auf die Kinetik des Rezeptors hat. So führt die hohe Expression von NMDAR2B zu NMDA-Rezeptoren, die im Vergleich zu Rezeptoren mit der NMDAR2A Untereinheit länger geöffnet sind.<sup>[95]</sup> Die Expression von NMDAR3 Untereinheiten führt dagegen zur Inhibierung des Rezeptors. NMDAR-Rezeptoren können verschiedenen Formen der synaptischen Plastizität, wie z. B. die LTP, vermitteln.<sup>[96,97]</sup> NMDA-Rezeptoren interagieren über die PDZ-Liganden der Untereinheiten NMDAR2A und NMDAR2B mit PSD-95 und werden über diese Interaktion in der PSD verankert.<sup>[23,89]</sup> Sie interagieren über ihren PDZ-Liganden auch mit der PDZ-Domäne von PIST.<sup>[50]</sup> Die Funktion dieser Interaktion wurde bis jetzt jedoch noch nicht geklärt.

### 1.5.3 Neurologine

Bei Neurologinen handelt es sich um eine Familie von synaptischen Transmembranproteinen, die Zell-Zell-Kontakte vermitteln. Neurologine bestehen aus einem großen extrazellulären Bereich, der Ähnlichkeiten zu einer Cholinesterasedomäne besitzt, einer Linker Region, der Transmembrandomäne und einem kurzen C-terminalen Bereich, der ein PDZ-Ligandenmotiv der Klasse I beinhaltet.<sup>[98]</sup> Im Menschen sind fünf verschiedene Neurologine bekannt, die durch die Gene *NLGN1*, *NLGN2*, *NLGN3*, *NLGN4X* und *NLGN4Y* kodiert werden. Alle Mitglieder der Neurologin-Familie sind im Gehirn exprimiert und in Synapsen lokalisiert, wobei es jedoch Unterschiede in der Anreicherung in spezialisierten Synapsen gibt. *NLGN1* ist in der PSD von exzitatorischen Synapsen angereichert, wohingegen man *NLGN2* nur in inhibitorischen Synapsen findet.<sup>[99,100]</sup> Die Neurologine interagieren mit dem präsynaptischen Membranprotein  $\beta$ -Neurexin, wodurch die Konnektivität von prä- und postsynaptischer Membranen stabilisiert wird.<sup>[98,101]</sup>

Mutationen in Neuroliginen sind mit Krankheiten mit einem neuronalen Phänotyp, wie z. B. Autismus, assoziiert.<sup>[102]</sup> Der PDZ-Ligand der Neuroligine vermittelt die Interaktion mit PSD-95, jedoch scheint der Einbau von Neuroliginen in die PSD nicht von der Interaktion mit PSD-95 oder Neurexin abhängig zu sein.<sup>[37,103]</sup> Allerdings ist die Interaktion mit PSD-95 wichtig bei Prozessen der synaptischen Plastizität. Durch Induktion von LTD werden NLNG1 und PSD-95 gemeinsam aus der Postsynapse transportiert, wohingegen die Induktion von LTP zur Anreicherung von NLNG1 führt.<sup>[104]</sup> NLGN1 und NLGN2 wurden als Interaktionspartner von PIST identifiziert. Die Interaktion wird über den PDZ-Liganden der Neuroligine und die PDZ-Domäne von PIST vermittelt.<sup>[105]</sup> Die Funktion dieser Interaktion wurde bis jetzt jedoch noch nicht beschrieben.

## 1.6 Die Rolle von PIST *in vivo*

### 1.6.1 Die Rolle von PIST in der Maus

Für die Rolle von PIST *in vivo* wurden bis jetzt wenige Daten publiziert. Im Jahr 2002 wurde von Yao *et al.* eine PIST *knockout*-Mauslinie publiziert, die in Hinblick auf die Infertilität von PIST-defizienten Männchen untersucht wurde. In der Studie wurde beschrieben, dass PIST-defiziente Männchen infertil sind. Die Spermien dieser Tiere zeigen einen Phänotyp, der dem der Globozoospermie ähnelt. Globozoospermie führt beim Menschen zur Unfruchtbarkeit; sie geht mit einer Fehlbildung des Akrosoms einher und in schweren Fällen fehlt diese Struktur komplett. Die Bildung des Akrosoms startet in der frühen Phase der Spermatogenese; es wird aus Vesikeln gebildet, die sich vom TGN abschnüren und unterhalb der Plasmamembran des Spermienkopfes akkumulieren. Das Akrosom ist essentiell für und während der Befruchtung der Eizelle. Spermien von männlichen PIST-defizienten Mäusen fehlt das Akrosom komplett, was auf Fehler beim Transport der Vesikel vom Golgi-Apparat zurückgeführt wurde.<sup>[106–108]</sup> Da auch wiederholte Anfragen bezüglich der Verfügbarkeit dieser Mauslinie von den Autoren nicht beantwortet wurde, wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Kreienkamp eine PIST-defiziente Mauslinie erzeugt. In ersten Analysen von heterozygoten PIST *knockout*-Mäusen dieser Linie wurde beobachtet, dass es zu Veränderungen in der Ausstattung glutamaterger Synapsen mit verschiedenen Glutamatrezeptoren kommt und die Signaltransduktion durch diese Rezeptoren verändert ist. Darüber hinaus wurde ein reduzierter Blutglukosespiegel beobachtet.<sup>[109]</sup> Der Transport des Glukosetransporters GLUT4 wird durch das mit dem Transporter interagierende Protein TUG reguliert. Es wurde gezeigt, dass ein Insulinsignal die Spaltung des Proteins TUG induziert, worauf hin GLUT4 an die Plasmamembran transportiert wird.<sup>[110]</sup> PIST wurde als Interaktionspartner von TUG identifiziert und ein Komplex beschrieben, in dem GLUT4, vermittelt durch TUG, mit Golgin160 und PIST vorliegt. Durch diese Interaktion wird GLUT4

am Golgi-Apparat zurückgehalten, bis die Spaltung von TUG induziert wird. Über welche Domäne die Interaktion von PIST mit TUG vermittelt wird, ist unbekannt.<sup>[111]</sup>

PIST wurde im ZNS auch mit einer Neurodegeneration in Verbindung gebracht. In dem Lurcher-Mausmodell führt eine Mutation in dem  $\delta 2$ -Glutamat Rezeptor (GluR $\delta 2$ ) zum spezifischen Zelltod von Purkinje-Zellen, die Merkmale von Autophagie zeigen. PIST wurde als Interaktionspartner von GluR $\delta 2$  sowie dem mutierten Rezeptor GluR $\delta 2^{LC}$  identifiziert. Es wurde angenommen, dass PIST den Rezeptor mit Beclin-1 verbindet und so zur Autophagie beiträgt.<sup>[49]</sup> Diese Beobachtung wurde aber vor kurzem in Frage gestellt, da genauere Analysen zeigten, dass der Zelltod von Purkinje-Zellen in Lurcher-Mäusen durch Nekrose mit leichten Merkmalen der Autophagie hervorgerufen wird.<sup>[112]</sup>

### 1.6.2 Die Rolle von PIST im Menschen

In Zellen von zwei Patienten mit Glioblastom und einem Patienten mit einem Lungen-Adenokarzinom wurden Deletionen von 240 kb in Chromosom 6 detektiert (del(6)(q22q22)), wodurch das PIST-Gen mit dem Gen der Rezeptortyrosinkinase ROS fusioniert wird. Das daraus resultierende PIST-ROS Fusionsprotein weist eine konstitutiv aktive Tyrosinkinaseaktivität auf und fungiert somit möglicherweise als Onkogen.<sup>[113–115]</sup> Darüber hinaus zeigen genetische Daten der *Decipher*-Datenbank, dass veränderte Kopienzahlen der genomischen Region auf Chromosom 6, die auch für PIST kodiert, in Patienten mit verschiedenen Defekten assoziiert werden. Dazu zählen Arrhythmien, Autismus und beschränkter Intellekt. Weiterhin sind in der *denovo-db*, einer Datenbank, die gefundene *de novo*-Mutationen listet, mehrere Patienten bekannt, die eine *de novo*-Mutation im PIST-Gen aufweisen, die mit verschiedenen Phänotypen assoziiert werden. Dabei wird die im Exom eines Patienten gefundene *nonsense*-Mutation in c.373C>T im Exon 2, die zu einem Stop-Codon im Bereich der zweiten *Coiled-coil*-Domäne führt (p.Q125\*), mit Autismus assoziiert. Des Weiteren wurden im Exom zweier weiterer Patienten unterschiedliche *missense*-Mutationen gefunden. Zum einen in c.641T>A im Exon 4, die zu einem Aminosäureaustausch in der Linker-Region (p.L214Q) führt und mit dem Tourettesyndrom assoziiert wird. Zum anderen in c.1043A>G im Exon 7, die zu einem Aminosäureaustausch in der PDZ-Domäne führt und mit Entwicklungsstörungen assoziiert wird. Darüber hinaus wurden im Genom von fünf Patienten unterschiedliche Mutationen im Intron 1 gefunden, die in zwei Fällen mit Autismus assoziiert werden.

## 2 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle von PIST für einige seiner synaptisch-lokalisierten Interaktionspartner im ZNS aufzuklären. PIST interagiert mit einer Vielzahl von Membranproteinen, von denen einige auch in PSD angereichert sind, wie z. B. mGluR5, NMDA-Rezeptoren, NLGN1, NLGN2, und Stargazin. Allgemein wurde für die Rolle von PIST in Bezug auf seine Interaktionspartner in verschiedenen Publikationen, aufgrund von *in vitro*-Untersuchungen von Tumorzelllinien, zum Teil deutlich abweichende Funktionen vorgeschlagen. Die Funktion von PIST für seine interagierenden Membranproteine im ZNS ist unklar. Deswegen soll im Rahmen dieser Arbeit die Rolle von PIST, hinsichtlich seiner zellulären Funktion bei der Sortierung von postsynaptischen Membranrezeptoren und deren Einbau in synaptische Signalkomplexe, untersucht werden.

Dabei lag zum einen das Bestreben zu Grunde, zu verstehen welchen Einfluss PIST auf die Lokalisierung einiger wichtiger Membranproteine im ZNS hat. Zum anderen inwiefern eine mögliche Fehlverteilung dieser Rezeptoren einen Einfluss auf Signalwege in Neuronen hat und welche Konsequenzen sich dadurch *in vivo* in der Maus ergeben. Hierfür sollen verschiedenen Modellsysteme eingesetzt werden, die sich maßgeblich durch den Zeitpunkt des Verlustes von PIST während der Entwicklung unterscheiden. Zum einen *in vitro*-Analysen von primär kultivierten, kortikalen Rattenneuronen nach lentiviralem PIST-*knockdown*, zum anderen *in vivo*-Analysen von PIST-defizienten Mauslinien. Hierzu stand in der Arbeitsgruppe von Prof. Kreienkamp eine bereits generierte PIST-defiziente Mauslinie zur Verfügung. Diese Mauslinie weist eine geringe Verfügbarkeit von homozygoten PIST *knockout*-Mäusen auf. Jedoch wurden bereits in vorangegangenen Analysen in heterozygoten PIST *knockout*-Mäusen dieser Linie, Effekte auf einige der synaptischen Interaktionspartner von PIST beobachtet. Diese Effekte sollen in dieser Arbeit durch weitere Experimente genauer beleuchtet und mit denen in kultivierten Rattenneuronen nach PIST-*knockdown* verglichen werden. Parallel dazu sollen, um möglicherweise die Verfügbarkeit von homozygoten PIST *knockout*-Mäusen zu erhöhen, ausgehend von der vorhandenen Mauslinie weitere Mauslinien, wie z. B. eine konditionale Vorderhirn-spezifische PIST *knockout*-Mauslinie, erzeugt und diese analysiert werden.

### 3 Material

#### 3.1 Chemikalien, Reagenzien, Fertiglösungen und Pulver

Die nicht in Tabelle 3-1 aufgeführten Standardchemikalien, wie z. B. Salze, wurden „reinst“ oder in analytischer Qualität, von den Firmen Thermo Fisher Scientific Inc., Merck KGaA, Carl Roth GmbH + Co. KG und Sigma-Aldrich bezogen.

**Tabelle 3-1: Übersicht über die verwendeten Chemikalien, Reagenzien, Fertiglösungen und Pulver.**

Bezeichnung	Anwendung / Material	Bezugsquelle
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	30 % Acrylamid-Stammlösung	Carl Roth GmbH + Co
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	SDS-PAGE	Sigma-Aldrich
Complete Mini, EDTA-free	Proteaseinhibitor	Roche Applied Science AG
10x CoralLoad PCR-Buffer	PCR-Puffer	Qiagen
DirectPCR Tail	Schwanzspitzenlysepuffer	VWR Life Science
dNTPSs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	dNTP Mischung	Thermo Fisher Scientific Inc.
EZ-Link-Sulfo-NHS-SS-Biotin	Reaktives Biotin	Thermo Fisher Scientific Inc.
10x FastDigest Green Buffer	Restriktions-Puffer	Thermo Fisher Scientific Inc.
GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder	DNA-Größenstandard	Thermo Fisher Scientific Inc.
Hi-Di Formamide	DNA-Sequenzierung	Thermo Fisher Scientific Inc.
Ketavet Injektionslösung (Ketaminhydrochlorid)	Betäubungsmittel	Pfizer GmbH
Lenti-X Concentrator	Aufreinigung Lentiviren	Takra Clontech
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	PCR-Zusatz	Qiagen
Mindori Green Advance DNA Stain	Nukleinsäure-Detektion	Biozym Scientific GmbH
NeutrAvidin Agarose Resin	Biotinylierung	Thermo Fisher Scientific Inc.
PageRuler Plus Pre-Stained Protein Ladder	Protein-Größenstandard	Thermo Fisher Scientific Inc.
PhosStop EASYpack	Phosphataseinhibitor	Roche Applied Science AG
Poly-L-Lysin (PLL)	Oberflächen-Beschichtung	Sigma-Aldrich
ProLong Diamond Antifade Mountant with DAPI	Eindeckelmedium	Thermo Fisher Scientific Inc.
5x Q-Solution	PCR-Zusatz	Qiagen
Rompun Injektionslösung (Xylazinhydrochlorid)	Betäubungsmittel	Bayer Pharma AG
Natriumdodecylsulfat (SDS)	SDS-PAGE	Carl Roth GmbH + Co
TaqMan 2x Universal PCR Master Mix	TaqMan-Mastermix	Thermo Fisher Scientific Inc.
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamine (TEMED)	SDS-PAGE	Sigma-Aldrich
TurboFect	Transfektionsreagenz	Thermo Fisher Scientific Inc.

#### 3.2 Verbrauchsmaterialien

Die nicht in Tabelle 3-2 aufgeführten Standardlabormaterialien, wie z. B. Plastikpipetten und Plastikreaktionsgefäße, stammen von den Firmen Sarstedt AG & Co. KG, Greiner Bio-One, Thermo Fischer Scientific Inc., BD Biosciences und Eppendorf AG.

**Tabelle 3-2: Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien.**

Bezeichnung	Anwendung / Material	Bezugsquelle
Amersham Protan 0,45 µm NC	Nitrocellulosemembran	Sigma-Aldrich
Deckgläschen (No 1, 18 mm Durchmesser)	Deckgläschen für Neuronen	Karl Hecht GmbH + Co. KG
Falcon Cell Strainer 70 µm	Zellsieb	Thermo Fisher Scientific Inc.
Falcon 5 mL Polystyrene Round-Bottom Tube	FACS-Röhrchen	Thermo Fisher Scientific Inc.
MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate	qRT-PCR Reaktionsplatte	Thermo Fisher Scientific Inc.
MicroAmp Optical Adhesion Film	qRT-PCR Dichtfolie	Thermo Fisher Scientific Inc.
Nuclon Delta Surface	6- und 12-Loch-Zellkulturplatten	Thermo Fisher Scientific Inc.
Objektträger (76 mm x 26 mm)	Objektträger für Immunfluoreszenzen	Karl Hecht GmbH + Co. KG
TC-Schale 100, Standard	Zellkulturschale	Sarstedt AG & Co. KG
Ultra-Clear Centrifuge Tubes (14 x 95 mm)	Gefäß für Saccharose-Gradienten	Beckman Coulter

### 3.3 Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht angegeben, mit doppelt demineralisiertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) angesetzt und bei Bedarf durch autoklavieren (20 Minuten bei 121 °C und 2 bar) sterilisiert. Hitzeempfindliche Komponenten wurden in Lösung mit einem Filter mit 0,45 µm Porengröße steriltfiltriert und später zugesetzt.

Bei proteinbiochemischen Analysen wurde den verwendeten Puffern Proteaseinhibitoren zugesetzt (*Complete Mini, EDTA-free*, 1 Tablette / 10 mL), für die Analyse von phosphorylierten Proteinen zusätzlich Phosphataseinhibitoren (*PhosStop EASYPack*, 1 Tablette / 10 mL).

Tabelle 3-3: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen.

Bezeichnung	Zusammensetzung
ACSF für Biotinylierungen	120 mM NaCl 10 mM D-Glucose 2,5 mM KCl 2,2 mM NaHCO <sub>3</sub> 2 mM MgSO <sub>4</sub> 1,25 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,40
ACSF für Stimulationen	120 mM NaCl 26 mM NaHCO <sub>3</sub> 10 mM D-Glucose 2,5 mM KCl 2,5 mM CaCl <sub>2</sub> 1 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 mM / 2 mM MgSO <sub>4</sub> (LTP/LTD) pH 7,4
10 % APS	10 % (w/v) APS
2x BSS	280 mM NaCl 50 mM BES 1,5 mM Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 6,80
BSA-Stammlösung	2 mg / mL BSA
2,5 M CaCl <sub>2</sub>	2,5 M CaCl <sub>2</sub>
70 % Ethanol	70 % (v/v) Ethanol
IZ-Blockierlösung	2 % (v/v) Pferdeserum in PBS-Puffer
IZ-Fixierlösung	4 % (w/v) Paraformaldehyd 4 % (w/v) Saccharose in PBS-Puffer
IZ-Permeabilisierungspuffer	0,1 % (v/v) Triton X-100 in PBS-Puffer
5x KCM-Puffer	500 mM KCl 250 mM MgCl <sub>2</sub> 150 mM CaCl <sub>2</sub> in ddH <sub>2</sub> O

5x Lämmli-Probenpuffer	500 mM	DTT
	300 mM	TRIS/HCl
	50 % (v/v)	Glycerin
	7,5 % (v/v)	SDS
	0,01 % (w/v)	Bromphenolblau pH 6,80
Lysepuffer für Biotinylierungen	150 mM	NaCl
	25 mM	TRIS/HCl
	2 mM	NaF
	1 mM	EDTA
	1 % (v/v)	Triton X-100
	0,1 % (v/v)	Natriumdesoxycholate
	0,1 % (w/v)	SDS pH 7,60
0,9 % NaCl-Lösung	0,9 % (w/v)	NaCl
3M Natriumacetat pH 5,5	3 M	Natriumacetat pH 5,50
PBS-Puffer	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	8 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	2 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,40
PBS/Ca/Mg-Puffer	1 mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,1 mM	CaCl <sub>2</sub> in PBS-Puffer
Poly-L-Lysin-Lösung	6,183 mg / mL	Borsäure
	1 mg / mL	Poly-L-Lysin pH 8,50
PSD-Lösung A	320 mM	Saccharose
	4 mM	HEPES
	1 mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,5 mM	CaCl <sub>2</sub> pH 7,40
PSD-Lösung B	320 mM	Saccharose
	4 mM	HEPES pH 7,40
PSD-Lösung C	320 mM	Saccharose
	12 mM	TRIS/HCl
	1 % (v/v)	Triton X-100 pH 8,10
Puffer A	50 mM	TRIS/HCl
	50 mM	D-Glucose
	1 mM	EDTA
	4 mg / mL	Lysozym pH 7,90
Puffer B	50 mM	KCl
	10 mM	TRIS/HCl
	1 mM	EDTA
	0,5 % (v/v)	Tween 20
	0,5 % (v/v)	NP40 pH 7,90
RIPA-Lysepuffer	150 mM	NaCl
	50 mM	TRIS/HCl
	5 mM	EDTA
	1 % (v/v)	NP-40

	0,5 % (w/v)	Natriumdesoxycholat
	0,1 % (v/v)	SDS pH 8,00
Schnittpuffer	25 mM	HEPES ad HBSS pH 7,4
10 % SDS	10 % (w/v)	SDS
SDS-PAGE-Laufpuffer	0,1 % (w/v)	SDS in TRIS/Glycin-Puffer
4x Storage-Puffer	200 mM 400 mM 2 mM 0,4 mM 4 % (v/v)	TRIS/HCl NaCl DTT EDTA TritonX-100 pH 7,90
Storage-Puffer 1	1 Volumen 1 Volumen 2 Volumen	4x Storage-Puffer ddH <sub>2</sub> O Glycerin
Storage-Puffer 2	1 Volumen 3 Volumen	4x Storage-Puffer Glycerin
TAE-Puffer	40 mM 2 mM	TRIS/Acetat EDTA pH 8,00
TBS	100 mM 20 mM	NaCl TRIS/HCl pH 7,50
TBS-T	150 mM 10 mM 0,05 % (v/v)	NaCl TRIS/HCl Tween 20 pH 8,00
TE-Puffer	10 mM 1 mM	TRIS/HCl EDTA pH 7,5
1 M TRIS/HCL pH 6,8	1 M	TRIS pH 6,80
1,5 M T/HCL pH 8,8	1,5 M	TRIS pH 8,80
TRIS/Glycin-Puffer	192 mM 25 mM	Glycin TRIS pH 8,30
TSB-Puffer	10 mM 10 mM 10 % (v/v) 5 % (v/v)	MgCl <sub>2</sub> MgSO <sub>4</sub> PEG 3350 DMSO in LB-Medium pH 6,1
Versene-Puffer	0,5 mM	EDTA ad PBS-Puffer
Western Blot-Transferpuffer	20 % (v/v) 0,02 % (w/v)	Methanol SDS in TRIS/Glycin-Puffer

### 3.4 Medien

Medien und Zusätze wurden, wenn nicht anders angegeben, mit ddH<sub>2</sub>O angesetzt. Medien und Zusätze wurden steril bezogen oder bei Bedarf durch Autoklavieren (20 Minuten bei 121 °C und 2 bar) sterilisiert. Hitzeempfindliche Komponenten wurden bei Bedarf in Lösung sterilfiltriert (Filter mit 0,45 µm Porengröße) und später zugesetzt.

#### 3.4.1 Medien und Zusätze für bakterielle Arbeiten

Tabelle 3-4: Übersicht über die verwendeten Medien und Zusätze für bakterielle Arbeiten.

Bezeichnung	Zusammensetzung		Verdünnung
LB-Medium	10 g / L	Trypton	
	5 g / L	Hefeextrakt	
	5 g / L	NaCl	
		pH 7,5	
LB-Agar	15 g / L	Agar-Agar ad LB-Medium	
<i>Super Broth</i> (SB)-Medium	32 g / L	Trypton	
	20 g / L	Hefeextrakt	
	5 g / L	NaCl	
	5 mL	1 M NaOH	
Ampicillin-Stammlösung	100 mg / mL	Ampicillin-Natriumsalz	100 µg / mL
Kanamycin-Stammlösung	100 mg / mL	Kanamycinsulfat	50 µg / mL
Tetracyclin-Stammlösung	5 mg / mL	Tetracyclin	15 µg / mL

#### 3.4.2 Medien und Zusätze für zellbiologische Arbeiten

Tabelle 3-5: Übersicht über verwendet Medien und Zusätze für zellbiologische Arbeiten.

Bezeichnung	Bezugsquelle
<i>B27 Supplement</i> (Serum-freier Zusatz)	Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM)	Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>Fetal Bovine Serum</i> (FBS)	Sigma-Aldrich
Glutamat	Sigma-Aldrich
<i>Hank's Balanced Salt Solution</i> (HBSS)	Thermo Fisher Scientific Inc.
L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>Minimum Essential Media</i> (MEM)	Thermo Fisher Scientific Inc.
Neurobasal-Medium	Thermo Fisher Scientific Inc.
Penicillin / Streptomycin	Thermo Fisher Scientific Inc.
Pferdeserum	Sigma-Aldrich
Primocin	Invivo Gen

Tabelle 3-6 Zusammensetzung der verwendeten Medien für zellbiologische Arbeiten.

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Einfriermedium für HEK293T	10 % (v/v)	FBS
	10 % (v/v)	DMSO in DMEM
HBSS/Pen/Strep	100 µg / mL	Penicillin / Streptomycin in HBSS

Kulturmedium für HEK293T (DMEM-komplett)	10 % (v/v) 100 µg / mL	FBS Penicillin / Streptomycin in DMEM
Neuronen-Kulturmedium	2 % (v/v) 5 mM 25 µM 0,1 mg / mL	<i>B27 Supplement</i> L-Glutamin Glutamat Primocin in Neurobasal
Neuronen-Platiermedium	10 % (v/v) 10 % (v/v)	Pferdeserum (D)-Glucose in MEM

### 3.5 Inhibitoren und Stimulanzien

**Tabelle 3-7: Übersicht über die verwendeten Inhibitoren und Stimulanzien.**

Name	Stammlösung	Anwendung/Material	Bezugsquelle
2-Amino-5-phosphonovaleriansäure (AP-5)	10 mM in H <sub>2</sub> O	NMDA-Rezeptor Antagonist	Tocris
6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX)	5 mM in H <sub>2</sub> O	AMPA/Kainat-Rezeptor Antagonist	Sigma-Aldrich
Forskolin	1 mM in DMSO	Aktivator der Adenylatcyclase	Sigma-Aldrich
Nimodipin	10 mM in Methanol	Blockiert Calciumkanäle	Sigma-Aldrich
Rolipram	1 mM in DMSO	Inhibitor der Phosphodiesterase	Sigma-Aldrich
(RS)-3,5-Dihydroxyphenylglycine (DHPG)	10 mM in H <sub>2</sub> O	Selektiver mGluR5-Agonist	Tocris
Tetrodotoxin (TTX)	1 mM in H <sub>2</sub> O	Blockiert Natriumkanäle	Bio Trend

### 3.6 Reaktionssätze

**Tabelle 3-8: Übersicht über die verwendeten Reaktionssätze.**

Bezeichnung	Anwendung/Material	Bezugsquelle
<i>NukleoBond Xtra Midi Kit</i>	Aufreinigung Plasmid-DNA	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
<i>BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit</i>	DNA-Sequenzierung	Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>Quick-RNA MiniPrep Kit</i>	Aufreinigung RNA	Zymo Research
<i>WesternBright</i> Chemilumineszenzsubstrat für Film	ECL-Substrat	Biozym Scientific GmbH
<i>SuperScript First-Strand Synthese System for RT-PCR</i>	reverse Transkription	Thermo Fisher Scientific Inc
<i>DC-Protein Assay Kit</i>	Proteinkonzentration	Bio-Rad Laboratories, Inc

### 3.7 Enzyme und Proteine

Für Restriktionsanalysen wurden ausschließlich *FastDigest*-Restriktionsendonukleasen der Firma Thermo Fisher Scientific Inc. verwendet.

**Tabelle 3-9: Übersicht über die verwendeten Enzyme und Proteine.**

Name	Bezugsquelle
Benzonase Nuklease	Merck KGaA
Lysozym	Sigma-Aldrich
10x Trypsin	Thermo Fisher Scientific Inc.
Proteinase K	Sigma-Aldrich
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Taq DNA Polymerase	Selbst aufgereinigt

### 3.8 Vektoren

Tabelle 3-10: Übersicht über die verwendeten Vektoren.

Name des Vektors	Eigenschaften	Herkunft/Referenz
pLVTHM Kontrolle	Eukaryotischer Expressionsvektor; kodiert für eGFP; Ampicillin-Resistenz	Addgene (Plasmid #12247)
pLVTHM PISTsh	Basiert auf dem pLVTHM-Vektor; kodiert für eGFP und eine gegen PIST gerichtete shRNA unter der Kontrolle des H1-Promotors shRNA-kodierende Sequenz: 5'-GGCGGACATCACTTATGAGTTCAAGAGACTCATAAGTGATGTCCGCC-3'	AG Kreienkamp
pLVTHM PISTsh-scramble	Basiert auf dem pLVTHM-Vektor; kodiert für eGFP und eine randomisierte PIST shRNA unter der Kontrolle des H1-Promotors shRNA-kodierende Sequenz: 5'-ATTAATCCGGTTGTGGAACCTCTCTGAAGTCCACAACCGGATTAAT-3'	AG Kreienkamp
pMD2.G	Eukaryotischer Expressionsvektor; kodiert für das virale Hüllprotein VSV-G; Ampicillin-Resistenz	Addgene (Plasmid #12259)
psPAX.2	Eukaryotischer Expressionsvektor; kodiert für virale Proteine, die für die Verpackung von Lentiviren benötigt werden; Ampicillin-Resistenz	Addgene (Plasmid #12260)

### 3.9 Oligonukleotide und TaqMan-Sonden

Die im Folgenden gelisteten Oligonukleotide sind in 5'→3' Orientierung aufgeführt. Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich synthetisiert.

Die verwendeten *TaqMan*-Sonden wurden von Thermo Fisher Scientific Inc. bezogen und vom Hersteller auf Effizienz und Spezifität getestet.

Tabelle 3-11: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide für die Sequenzierung.

Bezeichnung	Sequenz
SP6-vor	SP6 Promotor GAT TTA GGT GAC ACT ATA G
H1-vor	Humaner H1 Promotor TCG CTA TGT GTT CTG GGA AA

Tabelle 3-12: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide für die Genotypisierung.

Bezeichnung	Sequenz
CamKII-Cre-rev	TGC ACA CCT CCC TCT GCA TGA TGC ACG
CamKII-Cre-vor	ATG CGC TGG GCT CTA TGG CTT CTG
Flp-rev	GTT GCG CTA AAG AAG TAT ATG TGC C
Flp-vor	GTC ACT GCA GTT TAA ATA CAA CAC G
3'-rev	CCA CCT ACG GTC CCA TTC AG
5'-rev	TTG ATA TCG TGG TAT CGT TAT GCG
Tm1c-rev	ATC GAT GGC GAG CTC AGA CC
Tm1c-vor	AAG GCG CAT AAC GAT ACC AC
WT-rev	CCA CCT ACG GTC CCA TTC AG
WT-for	GCT TTG ACG TGA AGC TGC CC

Tabelle 3-13: Übersicht über die verwendeten TaqMan-Sonden für Genexpressions-Analysen.

Gen	TaqMan-Sonde
<i>Gopc</i>	Rn01433819_m1
<i>Gapdh</i>	Rn01775763_g1

### 3.10 Antikörper und Proteinkonjugate

**Tabelle 3-14: Übersicht der Primärantikörper für Western Blot und Immunzytochemie.** WB = Verdünnung für Immundetektion im *Western Blot*, IZ = Verdünnung für Immundetektion bei der Immunzytochemie

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Lösung	Bezugsquelle
$\alpha$ -AKT	Kaninchen	WB 1:1000	5 % BSA/TBS-T	Cell Signaling (9272)
$\alpha$ -phospho-AKT (pAKT) (Ser473)	Kaninchen	WB 1:1000	5 % BSA/TBS-T	Cell Signaling (9271)
$\alpha$ -alpha-Tubulin	Maus	WB 1:1000	5 % Milchpulver/TBS-T	Abcam (ab7291)
$\alpha$ -p44/42 (ERK 1/2)	Kaninchen	WB 1:1000	5 % Milchpulver/TBS-T	Cell Signaling (9102)
$\alpha$ -phospho-p44/42 (pERK 1/2) (Thr202/Tyr204)	Kaninchen	WB 1:1000	5 % BSA/TBS-T	Cell Signaling (9101)
$\alpha$ -GFP	Kaninchen	WB 1:1000	5 % Milchpulver/TBS-T	Serum, AG Kreienkamp, UKE (Serum Tier 2 Tag 150)
$\alpha$ -GluR1	Kaninchen	WB 1:1000	5 % Milchpulver/TBS-T	Alomone (AGC-004)
$\alpha$ -MAP2	Huhn	IZ 1:1000	2 % Pferdeserum/PBS	Antibodiesonline (ABIN372661)
$\alpha$ -mGluR5	Kaninchen	WB 1:1000	5 % Milchpulver/TBS-T	Merck (ab5675)
$\alpha$ -NLGN1	Maus	WB 1:1000	5 % Milchpulver/TBS-T	Synaptic System (129-111)
$\alpha$ -NLGN2	Kaninchen	WB 1:1000	5 % Milchpulver/TBS-T	Synaptic System (129-203)
$\alpha$ -NMDAR1	Maus	WB 1:1000	5 % Milchpulver/TBS-T	Merck (MAB363)
$\alpha$ -NMDAR2A	Kaninchen	WB 1:1000	5 % Milchpulver/TBS-T	Novous Biologicals (NB300-105)
$\alpha$ -NMDAR2B	Kaninchen	WB 1:1000	5 % Milchpulver/TBS-T	Novous Biologicals (NB300-106)
$\alpha$ -PIST	Kaninchen	WB 1:1000	5 % Milchpulver/TBS-T	Sigma-Aldrich (HPA024018)
$\alpha$ -PIST	Meerschweinchen	WB 1:1000 IZ 1:1000	5 % Milchpulver/TBS-T 2 % Pferdeserum/PBS	Serum, AG Kreienkamp, UKE (Serum Tier 8)
$\alpha$ -PSD-95	Maus	WB 1:1000	5 % Milchpulver/TBS-T	Merck (MABN68)
$\alpha$ -ShankPDZ	Kaninchen	WB 1:1000	5 % Milchpulver/TBS-T	Serum, AG Kreienkamp, UKE (Serum Tag 90)
$\alpha$ -Stargazin	Kaninchen	WB 1:1000	5 % Milchpulver/TBS-T	Merck (07-577)
$\alpha$ -Transferrin-Rezeptor (TFR)	Kaninchen	WB 1:1000	5 % Milchpulver/TBS-T	Abcam (ab84036)

**Tabelle 3-15: Übersicht der Sekundärantikörper.** HRP = Merretichperoxidase (engl. *Horse Radish Peroxidase*)

Antikörper	Wirt	Konjugat	Verdünnung	Bezugsquelle
$\alpha$ -Huhn	Ziege	Alexa-Fluor 633	1:1000	Thermo Fisher Scientific Inc. (A21103)
$\alpha$ -Kaninchen	Ziege	HRP	1:2500	Immuno Reagents, Inc. (GtXRb-003-EHRPX)
$\alpha$ -Maus	Ziege	HRP	1:2500	Immuno Reagents, Inc. (GtXMu-003-E2HRPX)
$\alpha$ -Meerschweinchen	Ziege	HRP	1:2500	Immuno Reagents, Inc. (GtXGp-003-DHRPX)
$\alpha$ -Meerschweinchen	Ziege	Alexa-Fluor 555	1:1000	Thermo Fisher Scientific Inc. (A21435)

Tabelle 3-16: Übersicht der Proteinkonjugate. HRP = Merretichperoxidase

Protein	Konjugat	Verdünnung	Bezugsquelle/Referenz
Avidin	HRP	1:1000	Bio-Rad Laboratories, Inc. (170-6528)

### 3.11 Bakterienstämme und Zelllinien

Tabelle 3-17: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme.

Bezeichnung	Eigenschaften	Bezugsquelle/Referenz
DH5 $\alpha$ -pTaq	Transformierter <i>E. coli</i> -Bakterienstamm. Trägt ein Plasmid das für eine Taq-DNA-Polymerase unter der Kontrolle des <i>lac</i> -Operons kodiert	AG Kutsche, UKE
TOP10F'	Chemisch kompetente <i>E. coli</i> -Bakterien mit F'-Episom; Tetracyclin-Resistenz	Thermo Fisher Scientific Inc

Tabelle 3-18: Übersicht über die verwendeten Zelllinien.

Bezeichnung	Eigenschaften	Bezugsquelle / Referenz
HEK293T	Humane embryonale Nierenzelllinie mit dem T-Large Antigen (engl. <i>human embryonic kidney cells with T-Large Antigen</i> ) Diese Zelllinie exprimiert das <i>SV40 large T-Antigen</i> , wodurch diese Zellen Plasmide mit dem <i>SV40 origin of replication</i> episomal replizieren können und sich für die Produktion von hohen Titern an Lentiviren eignet	American Type Culture Collection (ATCC CRL-3216)

### 3.12 Geräte und Laborausstattung

Tabelle 3-19: Übersicht über die für die Datenerhebung relevanten Laborgeräte.

Bezeichnung	Anwendung	Bezugsquelle
<i>ABI PRISM 3500 Genetic Analyser</i>	DNA-Sequenziergerät	Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>FACS Canto II</i>	Analytische Durchflusszytometrie	BD Biosciences
<i>ChemiDoc XRS-System</i>	Detektion von Chemilumineszenz	Bio-Rad Laboratories, Inc.
<i>Epoch Multi-Volume Spectrophotometer-System</i>	Nukleinsäure- und Proteinkonzentration	BioTek Instruments, Inc.
Vibratom Leica VT1000S	Gewebeschnitte	Leica Biosystems
Stoelting 51425 Tissue Slicer	Gewebeschnitte	Stoelting
<i>MOUSE-E-MOTION</i> -Datenlogger	Verhaltensanalysen	INFRA-E-Motion GmbH
<i>Leica TCS SP5-System</i>	konfokale Laserrastermikroskopie	Leica Microsystems
<i>Leica TCS SP8-System</i>	konfokale Laserrastermikroskopie	Leica Microsystems
Transilluminator-System	Detektion von Nukleinsäurebanden	Bachofer
<i>Biometra T Gradient Thermocycler</i>	Polymerasekettenreaktion	Biometra GmbH
<i>Mini-PROTEAN III-System</i>	SDS-PAGE	Bio-Rad Laboratories, Inc.
<i>Mini Trans-Blot-System</i>	<i>Western Blot</i>	Bio-Rad Laboratories, Inc.
<i>StepOnePlus</i>	<i>real time</i> -PCR System	Thermo Fisher Scientific Inc

### 3.13 Software

Tabelle 3-20: Übersicht über die für die Datenerhebung relevante Software.

Bezeichnung	Anwendung	Bezugsquelle
<i>BD FACSDIVA</i>	Visualisierung und Analyse von FACS-Daten	BD Biosciences
<i>Leica LAS X</i>	Visualisierung und Analyse von Mikroskopie-Daten	Leica Microsystems
<i>GraphPad Prism</i>	Statistische Analysen	GraphPad Software
<i>EthoVision</i>	Analyse von Maus Bewegungsdaten	Noldus
<i>The Observer</i>	Analyse von Verhaltensparametern	Noldus
<i>ImageLab</i>	Visualisierung und Analyse von Chemilumineszenzdaten	Bio-Rad Laboratories, Inc
<i>StepOne</i>	Visualisierung und Analyse von <i>real time</i> -PCR-Daten	Thermo Fisher Scientific Inc
<i>Chromas</i>	Visualisierung und Analyse von DNA-Sequenzen	Technelysium

## 4 Methoden

### 4.1 Molekularbiologische Methoden

#### 4.1.1 Kultivierung von *E. coli*-Bakterien

Die Kultivierung von *E. coli*-Bakterien erfolgte aerob in Flüssigmedium oder auf festen Nährböden und unter dem Selektionsdruck geeigneter Antibiotika. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte für 12-16 Stunden bei 37 °C und 200 rpm.

#### 4.1.2 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Bakterien

Für die Präparation von chemisch kompetenten *E. coli*-Bakterien wurden 500 mL LB-Medium mit einer Vorkultur des *E. coli*-Stammes TOP10F' inokuliert und unter dem Selektionsdruck von Tetracyclin bei 37 °C und 200 rpm kultiviert, bis eine optische Dichte (OD<sub>600</sub>) von 0,3 - 0,6 erreicht wurde. Anschließend wurde die Kultur für 2 Minuten in Eiswasser abgekühlt, dann für 5 Minuten bei 4000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde in insgesamt 50 mL eisgekühltem TSB-Puffer resuspendiert, die Bakteriensuspension 10-15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend zu 500 µL aliquotiert. Die Aliquots wurden im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Für die Transformation mit DNA-Plasmiden wurden zu 1 µg der zu vervielfältigenden DNA-Plasmide 20 µL 5x KCM-Puffer gegeben und dann mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 100 µL gebracht. Der Ansatz wurde auf Eis abgekühlt, 100 µL der Bakteriensuspension chemisch kompetenter *E. coli*-Bakterien hinzugegeben und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden die Bakterien für 45 Sekunden bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt und im Anschluss 2 Minuten auf Eis abgekühlt. Dann wurde 1 mL auf 37 °C erwärmtes LB-Medium ohne Antibiotikum zu dem Ansatz gegeben und die Bakterien für 1 Stunden bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Die Suspension wurde auf LB-Agar ausgestrichen und unter dem Selektionsdruck des geeigneten Antibiotikums über Nacht kultiviert.

#### 4.1.3 DNA-Plasmidpräparation

##### 4.1.3.1 Plasmidpräparation im kleinen Maßstab (Minipräparation)

Für die Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab wurden 3 mL LB-Medium mit einer Bakterienkolonie inokuliert und über Nacht, unter dem Selektionsdruck des geeigneten Antibiotikums, kultiviert. Dann wurden die Bakterien aus 1,5 mL der Kultur durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 3000 g und Raumtemperatur (RT) pelletiert und der Überstand abgenommen. Das Bakterienpellet wurde in 100 µL Resuspensions-Puffer aufgenommen, 100 µL Lysis-Puffer hinzugegeben und beides durch mehrmaliges invertieren vermischt. Nach 2 Minuten bei RT wurde die Lyse durch Zugabe von

100 µL Neutralisierungspuffer abgestoppt, wobei die bakteriellen Proteine ausgefällt wurden. Die verwendeten Lösungen stammen aus dem *NukleoBond Xtra Midi Kit*. Die ausgefallenen Proteine wurden durch Zentrifugation, für 20 Minuten bei 20000 g und RT, präzipitiert. Der Überstand wurde mit 0,7 Volumeneinheiten Isopropanol vermischt, für 20 Minuten bei 20000 g und RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das DNA-Pellet wurde 2 Mal mit je 500 µL 70% (v/v) Ethanol gewaschen, anschließend für 10-15 Minuten bei RT getrocknet und dann in 100 µL TE-Puffer resuspendiert. Die Identität der isolierten DNA wurde durch einen Restriktionsverdau überprüft.

#### **4.1.3.2 Plasmidpräparation im großen Maßstab (Midipräparation)**

Für die Isolation von Plasmid-DNA im großen Maßstab wurden 100 mL Kultur über Nacht, unter dem Selektionsdruck des geeigneten Antibiotikums, kultiviert. Die Isolierung der DNA erfolgte dann durch alkalische Lyse mit dem *Nucleo Bond Xtra Midi Kit*-Reaktionsatz entsprechend der Herstellerangaben. Die Konzentration der isolierten DNA wurde über Messung der optischen Dichte bestimmt und die Qualität durch einen Restriktionsverdau sowie durch DNA-Sequenzierung überprüft.

#### **4.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen**

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen erfolgte durch die Messung der optischen Dichte bei 260 nm ( $OD_{260}$ ) mithilfe des *Epoch Multi-Volume Spectrophotometer*-Systems, entsprechend der Herstellerangaben. Dabei entspricht eine  $OD_{260}$  von 1 50 µg DNA / mL bei doppelsträngiger DNA oder 40 µg RNA / mL bei einzelsträngiger RNA. Die Reinheit der Nukleinsäurelösung, in Bezug auf Proteinkontamination, wurde durch das Verhältnis der optischen Dichte bei 260 nm (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren) zu der optischen Dichte bei 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) überprüft ( $OD_{260}/OD_{280}$ ). Dieses Verhältnis sollte für doppelsträngige DNA bei 1,8 liegen und für einzelsträngige RNA bei 2,0, um eine Proteinkontamination ausschließen zu können. Die DNA-Konzentration wurde auf 1 mg / mL mit TE-Puffer eingestellt.

#### **4.1.5 Restriktionsverdau zur Überprüfung von DNA-Plasmiden**

Zur Überprüfung der Identität von DNA-Plasmiden wurden diese mit sequenzspezifischen Restriktionsendonukleasen hydrolytisch gespalten. Für den Restriktionsverdau wurden *FastDigest*-Restriktionsenzyme und *10x FastDigest Green Buffer* verwendet. Dafür wurde 1 µg DNA mit 2 µL des Reaktionspuffers versetzt, dann 1 U eines oder mehrerer geeigneter Restriktionsenzyme zugegeben und mit ddH<sub>2</sub>O auf insgesamt 20 µL aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend die DNA-Fragmente durch Agarosegelelektrophorese analysiert.

#### 4.1.6 Agarosegelelektrophorese

Durch Agarosegelelektrophorese wurden DNA-Fragmente und Produkte von Polymerasekettenreaktionen (PCR) der Größe nach aufgetrennt. Hierfür wurden Agarosegele von 0,8 – 1,3 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer, die mit dem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff *Mindori Green Advance DNA Stain* (6 µL / 100 mL Agarose-TAE-Lösung) versetzt waren, verwendet. Die DNA-Proben wurden auf das Agarosegel geladen und bei 120 V in TAE-Puffer aufgetrennt. Zum Größenvergleich wurde der DNA-Größenstandard *GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder* verwendet. Die Visualisierung der Nukleinsäure-Banden erfolgte unter UV-Licht am Transilluminator bei 312 nm, wodurch der interkalierte Fluoreszenzfarbstoff zur Emission von sichtbarem Licht angeregt wurde.

#### 4.1.7 Sequenzierung von DNA-Plasmiden

Für die Sequenzierung wurde das Kettenabbruchverfahren mit Fluorophor-markierten 2',3'-Dideoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTPs) nach Sanger *et al.* durchgeführt. Dies erfolgte gemäß den Herstelleranweisungen des dafür verwendeten Reaktionsatzes *BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit*. Hierfür wurde 1 µg der Plasmid-DNA als *Template* mit 10 pmol eines sequenzspezifischen Oligonukleotids, 2,5 µL *Half Term Reaction Buffer* und 2 µL *BigDye Terminator Mix* vermischt und mit ddH<sub>2</sub>O auf insgesamt 10 µL aufgefüllt. Die Sequenzierungsreaktion erfolgte durch eine Polymerasereaktion (PCR) gemäß Tabelle 4-1.

Tabelle 4-1: PCR-Programm für die Sequenzierungsreaktion.

Schritt der PCR	Temperatur (°C)	Dauer (s)	
Initiale Denaturierung	96	300	} 25 Zyklen
Denaturierung	96	30	
Primer-Hybridisierung	60	15	
Elongation	60	300	
Pause	4		

Nach der Reaktion wurde die DNA durch Zugabe von 10 µL ddH<sub>2</sub>O, 50 µL Ethanol und 2 µL 3M Natriumacetat pH 5,5 gefällt und durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 3000 g und RT präzipitiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet 2 Mal mit je 100 µL 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, für 10 Minuten bei 50 °C getrocknet und mit 20 µL *Hi-Di Formamide* überschichtet. Die Bestimmung der Nukleotidabfolge erfolgte am *ABI Prism 3500 Genetic Analyzer* im Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Die Auswertung der erhaltenen Sequenzen erfolgte durch verschiedene *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)*-Programme des *National Center For Biotchnology Information (NCBI)* unter der Internet-Adresse <http://ncbi.nlm.nih.gov>.

#### 4.1.8 RNA-Isolation

Die RNA von kultivierten, kortikalen Rattenneuronen wurde mithilfe des Reaktionsatzes *Quick-RNA MiniPrep Kit*, gemäß den Herstellerangaben, isoliert. Die Konzentration der Nukleinsäurelösung wurde durch die Messung der optischen Dichte bestimmt.

#### 4.1.9 cDNA-Synthese durch reverse Transkription

Das Umschreiben von *messenger* RNA (mRNA) zu komplementärer DNA (cDNA) erfolgte durch reverse Transkription, mittels des Reaktionsatzes *SuperScript First-Strand Synthese System for RT-PCR* nach Herstellerangaben durch das *First-Strand Synthesis Using Oligo(dt)*-Protokoll, mit 200 ng RNA als *Template*. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

#### 4.1.10 Genexpressionsanalyse mittels quantitativer *real time*-PCR

Für die qRT-PCR wurde das TaqMan-Sonden System von Thermo Fisher verwendet. Die TaqMan-Sonden bestehen aus einem für ein Transkript spezifischen, Oligonukleotidprimerpaar und einem speziellen Oligonukleotid, das komplementär zu einem DNA-Abschnitt zwischen den beiden Primerbindungsstellen ist. Dieses Oligonukleotid besitzt ein Fluorophor sowie einen *Quencher*, der das Fluoreszenzsignal des Fluorophors unterdrückt. Während der Synthese eines DNA-Stranges bei der qRT-PCR wird durch die Polymerase das bereits mit dem cDNA-*Template* hybridisierte Oligonukleotid abgebaut und dadurch das Fluorophor und der *Quencher* räumlich voneinander getrennt. Dadurch kann das Fluorophor mittels seines Fluoreszenzsignals detektiert werden. Mit steigender Zyklenzahl werden immer mehr Fluorophore freigesetzt, wobei die Fluoreszenz in der exponentiellen Phase der qRT-PCR proportional mit der Menge des PCR-Produktes zunimmt. Es wird ein Fluoreszenzschwellenwert festgelegt, durch den die Zyklenzahl bestimmt werden kann, bei der der Schwellenwert in einer Probe zum ersten Mal überschritten wird (*threshold cycle*-Wert =  $C_T$ -Wert). Mithilfe der ermittelten  $C_T$ -Werte lässt sich die relative Menge einer RNA in einer Probe berechnen.

Die Reaktion wurde in optischen Mikrotiterplatten im 96-Loch Format durchgeführt. Dabei erfolgte die Reaktion für jede Probe im Triplikate, mit dem in Tabelle 4-2 angegebenen Reaktionsansatz.

Tabelle 4-2: Reaktionsansatz für die qRT-PCR.

Komponente	Volumen (µL)
H <sub>2</sub> O	7
TaqMan 2x Universal PCR Master Mix	10
TaqMan-Sonde	1
cDNA- <i>Template</i> oder H <sub>2</sub> O-Kontrolle	2

Die PCR-Reaktion erfolgte in einem *StepOnePlus real-time*-PCR-Gerät, im Institut für Osteologie und Bioinformatik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, nach den Vorgaben des Herstellers. Dabei erfolgte die Bestimmung der  $C_T$ -Werte automatisch durch die *StepOne-Software*. Die Berechnung der relativen Genexpression erfolgte durch die unten angegebenen Formeln, nach der  $ddC_T$ -Methode mit *Gapdh* als probeninterne Referenz.

$$dC_T = C_T(\text{Zielgen}) - C_T(\text{Referenzgen})$$

$$ddC_T = dC_T(\text{Probe}) - dC_T(\text{Kontrolle})$$

$$\text{Relative Genexpression} = 2^{-ddC_T}$$

## 4.2 Zellbiologische Methoden

### 4.2.1 Kultivierung und Passagieren von HEK293T-Zellen

Die adhäsiven HEK293T-Zelllinie wurde auf 10 cm Zellkulturschalen, in 10 mL DMEM-komplett, bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Zum Passagieren der Zellen wurde zunächst das Zellkultur-Medium abgenommen und die Zellen mit Versene-Puffer gewaschen. Danach mit 1x Trypsin in Versene-Puffer für 5 Minuten bei RT inkubiert, wodurch Adhäsionsmoleküle an der Oberfläche der HEK293T-Zellen abgebaut wurden. Die Zellen wurden in frischem DMEM-komplett aufgenommen und durch Zentrifugation für 3 Minuten bei 500 g sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen je nach Anwendung in frischem DMEM-komplett ausgesät und weiter kultiviert.

Für die Langzeitlagerung bei -150 °C wurden die Zellen bei einer Konfluenz von ca. 90 % von der Kulturschale gelöst, pelletiert und mit einer Dichte von 1x10<sup>6</sup> Zellen / mL in DMEM-Einfriermedium resuspendiert. 1 mL Suspension wurde in Kryoröhrchen überführt und, von Isopropanol umgeben, zunächst langsam auf -80 °C heruntergekühlt und nach 24 Stunden dauerhaft bei -150 °C gelagert.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte lichtmikroskopisch mithilfe eines Hämocytometers (Neubauer-Zählkammer).

### 4.2.2 Produktion von gentechnisch veränderten Lentiviren

Für die Produktion von lentiviralen Partikeln, die für die Transduktion von primären, kortikalen Rattenneuronen verwendet wurden, wurden HEK293T-Zellen auf 10 cm-Zellkulturschalen bei einer Konfluenz von ca. 60 % transfiziert. Für die Transfektion wurden 10 µg des zu verpackenden viralen Vektors, 3,33 µg psPAX.2 und 1,66 µg pMD2.G in insgesamt 1 mL DMEM ohne Zusätze aufgenommen, 18 µL *TurboFect* hinzugegeben und der Ansatz gründlich gemischt. Nach 20 Minuten bei RT wurde der gesamte Ansatz tröpfchenweise in das Kulturmedium gegeben und die Zellen weiter kultiviert. Nach 6 Stunden wurde das Kulturmedium abgenommen, durch frisches DMEM-komplett ersetzt

und die Zellen weiter kultiviert. Nach 48 und 72 Stunden wurde der Virus-haltige Kulturüberstand abgenommen und durch einen Filter mit 0,45 µm Porengröße filtriert. Die Filtrate wurden vereinigt und die lentiviralen Partikel mithilfe des *Lenti-X Concentrator* gemäß den Herstellerangaben aus den Überständen pelletiert. Die Überstände wurden verworfen und das Pellet in 100 µL kaltem PBS resuspendiert, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

#### 4.2.3 Bestimmung der transduzierenden Einheiten einer Virussuspension

Für die Bestimmung der transduzierenden Einheiten einer Virusproduktion mittels analytischer Durchflusszytometrie wurden  $5 \times 10^4$  HEK293T-Zellen ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen im Duplikat mit unterschiedlichen Volumina einer 1:100 mit PBS verdünnten Virussuspension infiziert, indem die Virussuspension direkt in das Kulturmedium gegeben wurde. Nach 48 Stunden in Kultur wurden die Zellen 2 Mal mit PBS gewaschen und dann für 5 Minuten bei RT mit 300 µL 1x Trypsin in Versene-Puffer abgelöst. Die Suspension wurde in Röhrchen für die Durchflusszytometrie überführt und die Zellen durch Zentrifugation für 3 Minuten bei 500 g und RT sedimentiert. Das Zellpellet wurde 2 Mal mit PBS gewaschen und dann in 500 µL PBS aufgenommen. Die Analyse erfolgte an dem Durchflusszytometer *FACS Canto II* in der *FACS Core Facility* des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Dabei wurde für jede Zelle zum einen das nur leicht gebrochene Durchlicht (*Forward Scatter*, FSC) und das seitliche Streulicht (*Side Scatter*, SSC) detektiert, um die Population der singulären lebenden HEK-Zellen zu definieren. Zum anderen wurde die Fluoreszenzintensität des von GFP emittierten Lichts bei Anregung mit einem Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm detektiert. Dadurch konnte der Anteil der GFP-positiven Zellen innerhalb der Population von lebenden Zellen bestimmt werden. Hierbei dienten nicht infizierte Zellen als Referenz. Die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten erfolgte mit der *Software BD FACSDIVA*. Die Zahl der transduzierenden Einheiten (TU) pro mL Virussuspension wurde dann berechnet.

$$\frac{TU}{mL} = \frac{GFP\text{-positiv} (\%) * Anzahl\ lebende\ Zellen (n) * Verdünnungsfaktor * 1000}{Infektionsvolumen (\mu L)}$$

#### 4.2.4 Präparation und Kultivierung von primären Rattenneuronen

Kulturen von primären, hippocampalen und kortikalen Neuronen wurden aus den Gehirnen von Rattenembryonen angelegt. Für Hippocampuskulturen wurden zunächst Deckgläschen zur besseren Adhäsion der Neuronen mit Poly-L-Lysin beschichtet. Dafür wurden die Deckgläschen (No 1, 18 mm Durchmesser) in Vertiefungen von 12 Loch-Kulturplatten ausgelegt, mit Poly-L-Lysin-Lösung überschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Für Cortexkulturen wurden die Vertiefungen von 6 Loch-Zellkulturplatten mit Poly-L-Lysin-Lösung bedeckt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Deckgläschen und

die Vertiefungen der 6 Loch-Zellkulturplatte 5-7 Mal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Für die Präparation der Neuronen wurde eine tragende Ratte, an Tag 20 nach der Verpaarung, zunächst durch langsames Einleiten von CO<sub>2</sub> betäubt, bevor die eigentliche Tötung durch 100 % CO<sub>2</sub> erfolgte. Nach der Tötung wurden die Tiere dekapitiert, anschließend die Bauchdecke geöffnet und der Uterus entfernt. Der Uterus sowie die Fruchtblasen wurden auf Eis geöffnet, die Embryonen entnommen und sofort dekapitiert. Die Gehirne der Embryonen wurden isoliert und in eine Kulturschale mit HBSS/Pen/Strep überführt. Unter Verwendung eines Binokular-Mikroskops wurden die Hemisphären an der Mittellinie getrennt, die Hirnhaut entfernt und jeweils der Hippocampus isoliert und in einer separaten Kulturschale mit HBSS/Pen/Strep gesammelt. Der Cortex wurde ebenfalls in eine separate Kulturschale mit HBSS/Pen/Strep überführt und dort mechanisch zerkleinert. Die Gewebe wurden mit 1x Trypsin in HBSS/Pen/Strep für 15 Minuten (Hippocampus), bzw. 20 Minuten (Cortex) bei 37 °C unter leichtem Schwenken inkubiert, die trypsinierten Gewebe insgesamt 5 Mal mit Neuronen-Platiermedium gewaschen und anschließend die Zellen mithilfe von verengten, feuerpolierten Glas-Pasteurpipetten mechanisch trituiert. Die kortikalen Zellen wurden zusätzlich durch ein Zellsieb (*Cell Strainer* 70 µm) filtriert. Dann wurde die Zellzahl mithilfe eines Hämozytometers (Neubauer-Zählkammer) bestimmt. Von der Hippocampus-Präparation wurden pro Deckgläschen  $3 \times 10^5$  Zellen in insgesamt 1 mL Neuronen-Platiermedium ausgesät. Von der Cortexpräparation wurde das Äquivalent von 1,5 Embryonen in insgesamt 2 mL Neuronen-Platiermedium pro 6 Loch-Zellkulturplatte ausgesät, dies entsprach über mehrere Präparationen hinweg einer Zellzahl von ca.  $3 \times 10^6$  Zellen pro 6 Loch-Vertiefung. Nachdem die Zellen für 3 Stunden sedimentierten und adhärenz werden konnten, wurde das Neuronen-Platiermedium durch Neuronen-Kulturmedium ersetzt und die Zellen weiter kultiviert. Nach 7 Tagen in Kultur wurde das Neuronen-Kulturmedium gegen Neuronen-Kulturmedium ohne Glutamat gewechselt. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

#### 4.2.5 Transfektion von kultivierten Rattenneuronen

Die Transfektion von hippocampalen Neuronen erfolgte an DIV 7 (*days in vitro*) durch die Calciumphosphat-Methode. Dazu wurden 5 µg Plasmid-DNA mit sterilem ddH<sub>2</sub>O auf insgesamt 45 µL gebracht und unter starkem Schütteln sukzessive erst 5 µL 2,5 M CaCl<sub>2</sub> und dann 50 µL 2x BBS hinzugegeben. Nach 15 Minuten bei RT wurde der gesamte Ansatz direkt in das Medium gegeben und die Neurone für 3 Stunden weiter kultiviert. Das Kulturmedium wurde abgenommen und 5-7 Mal mit vorgewärmten HBSS gewaschen, bis keine Calciumphosphat-Kristalle im Durchlichtmikroskop mehr zu erkennen waren. Dann wurde Neuronen-Kulturmedium ohne Glutamat zu den Zellen gegeben und diese weiter kultiviert.

#### 4.2.6 Transduktion von kultivierten Rattenneuronen

Die Transduktion von primären, kortikalen Rattenneuronen erfolgte an DIV 7 durch die Infektion mit gentechnisch veränderten Lentiviren. Die kortikalen Rattenneuronen wurden infiziert, indem das Kulturmedium durch frisches Neuronen-Kulturmedium ohne Glutamat substituiert wurde, welches die produzierten lentiviralen Partikel enthielt. Für die Infektion wurde immer die gleiche Anzahl an transduzierenden Einheiten je Virus eingesetzt. Dabei war die Anzahl so gewählt, dass keine schädlichen Effekte an den Neuronen auftraten.

#### 4.2.7 Zelloberflächenbiotinylierung von kultivierten Rattenneuronen

Die Zelloberflächenbiotinylierung ermöglicht eine relative Quantifizierung der an der Zelloberfläche von lebenden Zellen lokalisierten Membranproteine, indem diese an Lysinresten kovalent, mit dem nicht-membrangängigen Reagenz Sulfosuccinimidyl-2-(biotinamido)ethyl-1,3-dithiopropionat (*EZ-Link-Sulfo-NHS-SS-Biotin*), markiert werden. Durch Ausnutzung der Interaktion von Biotin mit Streptavidin werden die markierten Proteine präzipitiert. Die Zelloberflächenbiotinylierung wurde an primären, kortikalen Rattenneuronen an DIV14 durchgeführt. Dabei wurden alle Schritte mit gekühlten Puffern und auf Eis durchgeführt. Für die Biotin-Markierung wurde zunächst das Kulturmedium abgenommen und die Neuronen 2 Mal mit PBS/Ca/Mg gewaschen. Anschließend wurden die Neuronen mit 1 mg / mL Sulfo-NHS-SS-Biotin in PBS/Ca/Mg überschichtet und unter leichtem Schwenken für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Um nicht überschüssiges Biotin abreagieren zu lassen, wurden die Neuronen insgesamt 3 Mal mit 100 mM Glycin in PBS/Ca/Mg überschichtet, wobei der Puffer beim letzten Schritt für 20 Minuten bei 4 °C unter leichtem Schwenken auf den Zellen belassen wurde. Daraufhin wurden die Neuronen 2 Mal mit PBS/Ca/Mg gewaschen und die Zellen anschließend lysiert. Von den Lysaten wurden 50 µL als Input-Probe bei 4 °C verwahrt. Für die Präzipitation der Biotin-markierten Proteine wurden gleiche Proteinmengen der Lysate mit 100 µL Streptavidin-Agarose (*NeutrAvidin Agarose Resin*) für 16-24 Stunden unter Rotation bei 4 °C inkubiert. Zum Entfernen unspezifisch gebundener Proteine wurde die Streptavidin-Agarose insgesamt 3 Mal für 5 Minuten mit RIPA-Lysepuffer gewaschen. Für die Freisetzung der gebundenen Proteine wurde die Streptavidin-Agarose nach dem letzten Waschschrift in 75 µL 5x Lämmli-Probenpuffer resuspendiert und für 16-24 Stunden bei 4 °C inkubiert (im Folgenden als Präzipitat bezeichnet). Durch das in dem Lämmli-Probenpuffer enthaltene DTT wurde die Disulfidbrücke (-SS-) zwischen der an die Proteine gebundenen reaktiven Gruppe (-NHS-) und dem an das Streptavidin gebundene Biotin reduziert und dadurch die Proteine freigesetzt. Parallel dazu wurde die bei 4 °C verwahrte Input-Probe mit 15 µL 5x Lämmli-Probenpuffer versetzt und ebenfalls bei 4 °C inkubiert. Das Präzipitat wurde von der Streptavidin-Agarose abgetrennt indem es, durch ein in die Mitte des Bodens des Reaktionsgefäßes gestochenes Loch, in ein frisches

Reaktionsgefäß bei 500 g für 1 Minute abzentrifugiert wurde. Input und Präzipitat wurden mittels *Western Blot* analysiert.

#### **4.2.8 Immunzytochemie**

Für die immunzytochemische Färbung (IZ) von Proteinen in primären, hippocampalen Rattenneuronen wurden die Neuronen an DIV 14 zunächst 3 Mal mit PBS gewaschen und anschließend mit IZ-Fixierlösung für 15 Minuten fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die fixierten Neurone mit IZ-Permeabilisierungspuffer für 3 Minuten permeabilisiert und 4 Mal mit PBS gewaschen. Zum Blockieren von unspezifischen Bindungsstellen wurden die Neuronen für 1 Stunde mit IZ-Blockierlösung überschichtet und anschließend mit dem Primäantikörper (verdünnt in IZ-Blockierlösung; 3 Stunden bei RT, oder über Nacht bei 4 °C) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (jeweils 10 Minuten bei RT) erfolgte die Inkubation mit dem Fluorophor-markierten Sekundäantikörper (verdünnt in PBS; 1 Stunde bei RT). Nach dreimaligem Waschen mit PBS (10 Minuten bei RT) wurden die Deckgläschen in *ProLong Diamond Antifade Mountant with DAPI* auf Objektträgern eingebettet und bis zur mikroskopischen Analyse bei 4 °C aufbewahrt. Eine Übersicht über die verwendeten Antikörper findet sich in Abschnitt 3.10.

#### **4.2.9 Mikroskopie**

Die Analyse von immunzytochemisch gefärbten Präparaten erfolgte an einem konfokalen Laserrastermikroskop *Leica TCS SP5 (Microscopy Imaging Facility, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf)* ausgestattet mit Lasern zum Anregen von Fluorophoren bei 405 nm, 488 nm, 552 nm und 638 nm und entsprechenden Filtersystemen für das emittierte Fluoreszenzsignal. Die Aufnahme von Bildern unterschiedlicher Präparate erfolgte unter gleichen Mikroskopeinstellungen in x,y,z-Orientierung als bidirektionaler Linienscan bei 400 Hz unter Verwendung eines *HC PLA APO CS2 63x/1.40 Oil*-Objektives mit HyD- oder PMT-Detektoren. Die Darstellung und Bearbeitung der Bilder für Abbildungen (Maximumintensitätsprojektionen und Optimieren des Kontrastes) erfolgte durch die *Leica LAS X-Software*.

### **4.3 Tierexperimentelle Methoden**

#### **4.3.1 Tierversuche**

Alle Tierversuche und Organentnahmen wurden von der Tierschutzkommission des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf und der Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz, Abteilung Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen begutachtet und genehmigt.

### 4.3.2 Rattenmodell

Für die Erzeugung von Kulturen primärer, hippocampaler und kortikaler Rattenneuronen wurden Rattenembryonen an Embryonaltag 19 (E19) der Spezies *Rattus Norvegicus* (Wistar-Stamm) verwendet. Tragende Muttertiere wurden von der Zentralen Versuchstierhaltung (VTH) des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf bezogen.

### 4.3.3 Mausmodelle

#### 4.3.3.1 C57BL/6-Gopc<sup>Tm1a</sup>-Mauslinie

Diese Mauslinie wurde am Institut für Humangenetik in der Arbeitsgruppe von Prof. Hans-Jürgen Kreienkamp generiert und beschrieben<sup>[109]</sup>. Diese Mauslinie trägt im *Gopc*-Genlocus eine Selektionskassette nach dem *knockout first*-Prinzip, wodurch es durch einen alternativen Spleiß-Akzeptor zur Zerstörung des *Gopc*-Gens kommt (siehe Abschnitt 5.1.1). Der genetische Hintergrund dieser Mauslinie war C57BL/6.

#### 4.3.3.2 C57BL/6-Gopc<sup>Tm1c</sup>-Mauslinie

Diese Linie wurde im Rahmen dieser Arbeit, ausgehend von der C57BL/6-Gopc<sup>Tm1a</sup>-Linie generiert. Die genaue Methode der Erzeugung und Verpaarung wird in Abschnitt 5.1.1 beschrieben. Sie besitzt die im Genom der Mäuse editierte Selektionskassette, bei der das dritte Exon von *Gopc* durch loxP-Sequenzmotive flankiert wird. Diese Linie ist geeignet um konditionale *knockout*-Tiere zu erzeugen. Der genetische Hintergrund dieser Mauslinie war C57BL/6.

#### 4.3.3.3 Flp-*deleter*-Mauslinie

Diese Linie wurde ursprünglich von Rodriguez *et al.* erzeugt und beschrieben.<sup>[116]</sup> Mäuse wurden aus einer Kolonie am Zentrum für molekulare Neurobiologie Hamburg von PD Dr. Irm Hermans-Borgmeyer zur Verfügung gestellt. Die Mauslinie exprimiert die eFlp-DNA-Rekombinase unter der Kontrolle des humanen *ACTB*-Promotors. Dadurch kommt es zur globalen Expression der Flp-Rekombinase prenatal ab Tag 10,5. Diese Linie ist geeignet um durch FRT-Sequenzmotive flankierte Bereiche des Genoms spezifisch zu entfernen. Der genetische Hintergrund dieser Mauslinie war C57BL/6.

#### 4.3.3.4 CamKII-Cre-*deleter*-Mauslinie

Diese Linie wurde ursprünglich von Casanova *et al.* erzeugt und beschrieben<sup>[117]</sup>. Mäuse wurden aus einer Kolonie am Zentrum für molekulare Neurobiologie Hamburg von PD Dr. Irm Hermans-Borgmeyer zur Verfügung gestellt. Die Mauslinie exprimiert die Cre-DNA-Rekombinase unter der Kontrolle des CaMKII-Promotors. Dadurch kommt es zur

Neuronen-spezifischen Expression der Cre-Rekombinase postnatal ab Tag 3. Diese Linie ist geeignet, um spezifisch durch loxP-Sequenzmotive flankierte Bereich des Genoms in Neuronen des Vorderhirns zu entfernen. Der genetische Hintergrund dieser Mauslinie war C57BL/6.

#### 4.3.4 Tierhaltung und Verpaarung

Die Haltung aller Mauslinien erfolgte unter standardisierten Bedingungen in den Räumlichkeiten der VTH des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Die Versorgung der Mäuse sowie das Ansetzen von Verpaarungen wurde von Tierpflegern der VTH übernommen. Den Tieren stand Trinkwasser und Trockenfutter *ad libitum* zur Verfügung. Eine detailliertere Beschreibung der gewählten Verpaarungsstrategien findet sich in Abschnitt 5.1.1.

#### 4.3.5 Präparation von Mäusen

Für biochemische Analyse wurden die Mäuse zunächst durch langsames Einleiten von CO<sub>2</sub> betäubt, bevor die eigentliche Tötung durch 100 % CO<sub>2</sub> erfolgte. Nach der Tötung und Überprüfung des Fehlens des Zwischenzehenreflexes wurden die Tiere dekapitiert. Anschließend wurden sie mit 70 % (v/v) Ethanol besprüht, um Haarflug zu verhindern. Ein Teil der Schwanzspitze wurde zur Bestätigung des Genotyps abgenommen und anschließend Gewebe für die Analysen entnommen.

#### 4.3.6 Genotypisierung von Mäusen

Die Genotypisierung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Mauslinien erfolgte mittels Polymerasekettenreaktion. Hierfür wurde zunächst genomische DNA aus Biopsien der Schwanzspitze von Mäusen isoliert, die von den Tierpflegern der VTH abgenommen wurden. Für die DNA-Isolierung wurden die Biopsien in 50 µL *DirectPCR Tail* mit 0,2 mg / mL Proteinase K für 12-16 Stunden bei 55 °C unter leichtem Schütteln lysiert. Anschließend wurde die Proteinase K für 45 Minuten bei 85 °C, inaktiviert. Nach Zentrifugation (1 Minute bei 20000 g), wurde der Überstand für die PCR eingesetzt. Eine Übersicht über die dabei verwendeten Oligonukletodie findet sich in Abschnitt 3.9. Für die PCR wurde ein Reaktionsansatz gemäß Tabelle 4-3 angesetzt

**Tabelle 4-3: Reaktionsansatz für die Genotypisierungs-PCR.**

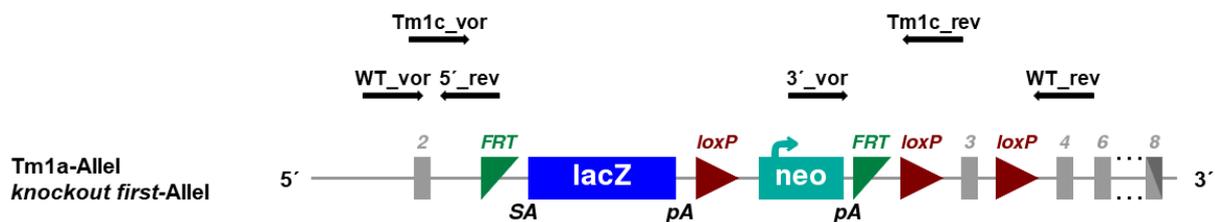
Komponente	Volumen (µL)
ddH <sub>2</sub> O	7,8
10x <i>CoralLoad PCR-Buffer</i>	2
5x <i>Q-Solution</i>	4
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,2
8 mM dNTPs (je 8 mM; dATP, dTTP, dGTP, dCTP)	1
10 mM Vorwärtsprimer / 10 mM Rückwärtsprimer	1

Schwanzspitzenlysat	1
Taq-DNA-Polymerase	1

Die Reaktion erfolgte in einem *Thermocycler* mit dem in Tabelle 4-4 angegebenen PCR-Programm. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte durch Agarosegelelektrophorese. Die verwendete Genotypisierungstrategie ist in Abbildung 4-1 dargestellt.

**Tabelle 4-4: PCR-Programm für die Sequenzierungsreaktion.**

Schritt der PCR	Temperatur (°C)	Dauer (s)	
Initiale Denaturierung	94	300	} 30 Zyklen
Denaturierung	94	30	
Primer-Hybridisierung	64	30	
Elongation	72	60	
Finale Elongation	72	300	
Pause	4		



Primer-Kombination	Gopc <sup>wt/wt</sup>	Gopc <sup>Tm1a/Tm1a</sup>	Gopc <sup>Tm1c/Tm1c</sup>
WT-vor + WT-rev	328 bp	---	486 bp
WT-vor + 5'-rev	---	149 bp	149 bp
3'-rev + WT-rev	---	614 bp	---
Tm1c-vor + Tm1c-rev	---	---	218 bp

Primer-Kombination	Flp-Transgen	CamKII-Transgen
Flp-vor + Flp-rev	480 bp	
CamKII-Cre-vor + CamKII-Cre-rev		250 bp

**Abbildung 4-1: Darstellung des Tm1a-Allels mit den Bindungsstellen der für die Genotypisierung verwendeten Primer und der dabei erwarteten Größen der PCR-Produkte.**

Schematisch dargestellt ist der Aufbau des Tm1a-Allels und die ungefähre Position der Bindungsstellen der für die Genotypisierung verwendeten vorwärts (vor) und rückwärts (rev) Primer. In der oberen Tabelle sind die bei der Genotypisierung erwarteten Größen der PCR-Produkte für die verschiedenen Genotypen (Gopc<sup>wt/wt</sup>, Gopc<sup>Tm1a/Tm1a</sup> und Gopc<sup>Tm1c/Tm1c</sup>) zusammengefasst. In der unteren Tabelle sind die bei dem Nachweis des Flp- und CamKII-Cre-Transgens erwarteten Größen der PCR-Produkte aufgelistet.

### 4.3.7 Behandlung von akuten Hippocampuschnitten aus Mäusen

Für die Stimulation von akuten Hippocampuschnitten aus Mäusen wurden 4-6 Wochen alte Tiere zunächst durch intraperitoneale Injektion einer Mischung von Ketavet (Ketaminhydrochlorid, 12 mg / mL) und Rompun (Xylanzinhydrochlorid, 1,6 mg / mL) in 0,9 % NaCl-Lösung terminal narkotisiert (12 mL Lösung pro kg Körpergewicht). Nach der Überprüfung des Fehlens des Zwischenzehenreflexes wurde eine zervikale Dislokation durchgeführt und die Tiere danach dekapitiert. Anschließend wurde die Schädeldecke geöffnet, das Gehirn isoliert und in Schnittpuffer überführt. Nach dem Abtrennen des Cerebellums und des Stammhirns wurden die Hemisphären separiert, diese mit dem Hippocampus nach oben auf den Objektisch eines Gewebeschniders (*Stoelting 51425 Tissue Slicer*) festgeklebt und 300 µm dicke koronale Schnitte angefertigt. Die

Hippocampusschnitte wurden in frischen Schnittpuffer überführt, dann mithilfe eines Binokular-Mikroskops voneinander separiert und für die Behandlung in Körbchen mit einem Netzboden überführt. Die Körbchen wurden in 32 °C warmes, mit 95 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub> oxygeniertes, ACSF überführt und die Schnitte zur Erholung für vier Stunden dort belassen. Je nach Behandlungsprotokoll erfolgte die Erholung in ACSF, mit unterschiedlicher MgSO<sub>4</sub>-Konzentration. Für die Induktion von LTP durch die Behandlung mit 0,1 µM Rolipram (Inhibitor der Phosphodiesterase) und 50 µM Forskolin (Aktivator der Adenylatcyclase) erfolgte die Erholung in ACSF mit 2 mM MgSO<sub>4</sub>. Für die Induktion von LTD durch die Behandlung mit 100 µM DHPG (selektiver Agonist von mGluR5), erfolgte die Erholung in ACSF mit 1 mM MgSO<sub>4</sub>. Für die eigentliche Behandlung mit den Stimulanzen wurden die Schnitte in 37 °C warmes oxygeniertes ACSF überführt, in dem die Stimulanzen verdünnt vorlagen. Dabei erfolgte die Behandlung mit Forskolin und Rolipram in modifiziertem ACSF ohne MgSO<sub>4</sub>. Zur Kontrolle wurden Schnitte nur mit dem Lösungsmittel der jeweiligen Stimulanzen behandelt. Jedes Experiment bestand aus 6-8 Schnitten des jeweiligen Genotyps, wobei die Behandlung im Duplikat durchgeführt wurde. Daran anschließend wurden die Schnitte in flüssigem Stickstoff gefroren, in 150 µL RIPA-Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren und Phosphataseinhibitoren sowie 1 µL / mL Benzonase Nuclease mithilfe eines Potters homogenisiert. Für die Lyse wurden die Homogenate für eine Stunde auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde für 10 Minuten bei 10000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Zum Schluss wurde die Proteinkonzentration in den Lysaten bestimmt, diese einander angeglichen und mit 5x Lämmli-Probenpuffer versetzt. Die Analyse erfolgte durch *Western Blot* unter Einsatz gleicher Probenvolumina.

#### 4.3.8 Zelloberflächenbiotinylierung von Gehirngewebeschnitten

Alle Schritte wurden mit gekühlten Puffern und auf Eis durchgeführt. 12 Wochen alte Mäuse wurden zunächst getötet (Abschnitt 4.3.5) anschließend die Schädeldecke geöffnet, das Gehirn isoliert und dieses in oxygeniertes (5 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub>) ACSF überführt. Anschließend wurde das Cerebellum abgetrennt und das Vorderhirn sowie das Cerebellum auf dem Objektisch eines Vibratoms (Leica VT1000S) festgeklebt. Danach wurden aus dem Gewebe, in einer Eisumgebung in oxygeniertem ACSF 300 µm dicke koronale Gewebeschnitte angefertigt, diese in Körbchen mit einem Netzboden überführt und in oxygeniertem ACSF gelagert. Es wurden 6-8 Schnitte, die die Gehirregionen Cortex, Hippocampus, Thalamus, Striatum und Cerebellum enthielten in Vertiefungen von 6-Loch-Zellkulturplatten überführt, in denen oxygeniertes ACSF vorlag. Für die Oberflächen-Biotinylierung wurde das ACSF durch oxygeniertes ACSF mit 1 mg / mL Sulfosuccinimidyl-2-(biotinamido)ethyl-1,3-dithiopropionat (*EZ-Link-Sulfo-NHS-SS-Biotin*) substituiert und die Schnitte für 45 Minuten bei 4 °C und leichtem Schwenken inkubiert. Um nicht reagiertes

Biotin zu entfernen, wurden die Schnitte 2 Mal für 5 Minuten bei 4 °C und leichtem Schwenken mit oxygeniertem ACSF mit 10 mM Glycin und danach einmal mit oxygeniertem TBS gewaschen. Nach den Waschschritten wurden die Gehirnregionen auf einer vorgekühlten Glasplatte, in jeweils einem Tropfen TBS, voneinander separiert und gleiche Regionen in ein Reaktionsgefäß, in dem 600 µL Lysepuffer vorlagen, gesammelt und auf Eis gelagert. Die Gewebe wurden durch mehrmaliges auf und ab Pipettieren zerkleinert und mithilfe eines Potters mechanisch homogenisiert. Die Lyse der Zellen erfolgte unter Rotation für 15 Minuten bei 4 °C. Anschließend wurden die Lysate für 15 Minuten bei 13000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration in den Lysaten, wurde die Proteinkonzentration mit Lysepuffer für Biotinylierungen auf 1 mg / mL eingestellt. Jeweils 50 µL des Überstandes wurden als Input-Probe bei 4 °C aufbewahrt. Für die Präzipitation der Biotin-markierten Proteine wurden gleiche Proteinmengen mit 100 µL Lysepuffer-equilibrierter Streptavidin-Agarose (*NeutrAvidin Agarose Resin*) für 16-24 Stunden unter Rotation bei 4 °C inkubiert. Zum Entfernen ungebundener Proteine wurde die Streptavidin-Agarose insgesamt 3 Mal für 5 Minuten mit Lysepuffer und anschließend 2 Mal mit TBS gewaschen. Für die Freisetzung der gebundenen Proteine wurde die Streptavidin-Agarose nach dem letzten Waschschrift in 65 µL 4x Lämmli-Probenpuffer suspendiert (im Folgenden Präzipitat genannt). Parallel wurde die Input-Probe mit 16,66 µL 4x Lämmli-Probenpuffer versetzt. Input und Präzipitat wurden für 5 Minuten bei 58 °C erhitzt und danach kurz auf Eis gestellt. Daraufhin wurde das Präzipitat 3 Minuten bei 1000 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Input und Präzipitat wurden im *Western Blot* analysiert.

#### **4.3.9 Anreicherung der postsynaptischen Dichte adulter Mäuse**

Für die Anreicherung der PSD, wurden adulte Mäuse zunächst getötet (Abschnitt 4.3.5). Anschließend wurde die Schädeldecke geöffnet, das Gehirn isoliert und das Cerebellum sowie das Stammhirn abgetrennt. Das Vorderhirn wurde anschließend in 3 mL hypotonischer PSD-Lösung A, mithilfe eines Potters, mechanisch homogenisiert. Das Homogenat wurde für 10 Minuten, bei 1400 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und auf Eis gestellt. Das Pellet wurde in 3 mL PSD-Lösung A resuspendiert und erneut, mithilfe eines Potters, mechanisch behandelt. Nach einer erneuten Zentrifugation, für 10 Minuten bei 1400 g und 4 °C, wurde der Überstand abgenommen und mit dem der ersten Zentrifugation vereinigt. 200 µL des Überstandes wurden in flüssigen Stickstoff gefroren und als Postnukleärefraktion (Gesamtlysat) bei -80 °C aufbewahrt. Der restliche Überstand wurde für 15 Minuten bei 13800 g und 4 °C zentrifugiert, um die Membranfraktion zu sedimentieren. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 2,5 mL PSD-Lösung B resuspendiert, 200 µL der Suspension in flüssigem Stickstoff gefroren und als

Membranfraktion bei -80 °C aufbewahrt. Die restliche Suspension wurde zur Aufreinigung der Synaptosomen auf einen Saccharose-Gradienten aufgetragen. Hierfür wurden 3 mL 1,2 molare Saccharose-Lösung zunächst mit 3 mL 1,0 molarer und dann mit 3 mL 0,85 molarer Saccharose-Lösung überschichtet. Der beladene Gradient wurde für 2 Stunden bei 82500 g und 4 °C zentrifugiert und die Synaptosomen beinhaltende Fraktion, zwischen der 1 molaren und 1,2 molaren Saccharose-Schicht, isoliert. Die Synaptosomenfraktion wurde mit PSD-Lösung B auf ein Volumen von 5 mL gebracht und zum Freisetzen der PSD mit 5 mL PSD-Lösung C vermischt, dann für 15 Minuten bei 4 °C rotiert. Die PSD wurde durch Zentrifugation für 20 Minuten bei 32800 g und 4 °C sedimentiert, das Pellet in 300 µL Lösung B resuspendiert, die Suspension in flüssigem Stickstoff gefroren und als PSD-Fraktion bei -80 °C aufbewahrt. Dann wurde die Proteinkonzentration der Fraktionen bestimmt, diese dann so mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt und mit 5x Lämmli-Probenpuffer versetzt, dass eine Konzentration von 10 µg / 15 µL erreicht wurde. Die Analyse der Fraktionen erfolgte durch *Western Blot* unter Einsatz gleicher Probenvolumina.

#### 4.3.10 Verhaltensanalysen

##### 4.3.10.1 Tierhaltung während der Verhaltensanalysen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden einige standardisierte Verhaltensanalysen, in Kooperation mit Dr. Fabio Morellini und Lynn Schau von der Forschergruppe Verhaltensbiologie am Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg, durchgeführt. Dafür wurden 12 bis 20 Wochen alte Tiere aus der C57BL/6-Gopc<sup>Tm1c</sup>-Mauslinie in das Versuchsvivarium von Dr. Morellini transferiert. Dort wurden die Tiere mit einem umgekehrten 12 Stunden / 12 Stunden-Licht/Dunkel-Zyklus (Licht aus um 8 Uhr morgens) unter Standardbedingungen (21 ± 1 °C, 40-50 % Luftfeuchtigkeit, Trinkwasser und Trockenfutter *ad libitum*) gehalten. Verhaltensexperimente wurden während des Dunkel-Zyklus, in einem an das Versuchsvivarium angrenzenden Raum, mit gedämpften Rotlicht durchgeführt. Versuchsmaterialien wurden vor und nach jedem Tierkontakt mit Seife und Wasser sowie 70 % (v/v) Ethanol gereinigt. Alle Tests wurden videoüberwacht und dabei Bewegungsspuren, die die Position der Mäuse widerspiegelten, aufgezeichnet und mit der *Software EthoVision* analysiert. Nach Beendigung der Verhaltensanalysen wurde zur Bestätigung des Genotyps ein Teil der Schwanzspitze entnommen.

##### 4.3.10.2 *Open field*-Test

Der *open field*-Test beruht auf der Beobachtung, dass Mäuse und andere Nagetiere das Betreten einer ihnen unbekanntes, hell erleuchteten, offenen Fläche ohne Deckungsmöglichkeiten vermeiden. Der *open field*-Test wurde in einer mit Weißlicht (50 Lux)

erleuchteten Box (50 cm x 50 cm mit einer Höhe von 40 cm) durchgeführt. Die Mäuse wurden in einer Ecke der Arena positioniert und 20 Minuten videoüberwacht. Dabei wurden als Messparameter die zurückgelegte Strecke, die mittlere minimale Distanz zur Wand, der Anteil der Zeit an der Wand und der Anteil der Zeit im Zentrum (eine imaginäre Fläche von 25 x 25 cm in der Mitte der Arena) analysiert.

#### **4.3.10.3 *Elevated plus maze-Test***

Dieser Test beruht auf der Aversion von Mäusen gegenüber offenen Flächen. Das Labyrinth hatte die Form eines Pluszeichens mit vier 30 cm langen und 5 cm breiten Armen, die durch ein quadratisches Zentrum (5 cm x 5cm) verbunden waren. Zwei geschlossene Arme hatten eine 15 cm hohe Wand, die offenen Arme hingegen waren nur durch einen 2 mm hohen Rand abgegrenzt. Das Labyrinth war 75 cm vom Boden angehoben. Eine Infrarotkamera erlaubte die Videoüberwachung in kompletter Dunkelheit. Für den Test wurden die Mäuse im Zentrum positioniert, wobei die Schnauze in die Richtung eines der offenen Arme zeigte und für 5 Minuten in dem Labyrinth gelassen. Dabei drückt sich das Angstverhalten dadurch aus, dass die Mäuse mehr Zeit in geschlossenen Bereichen des Labyrinthes verbringen. Es wurden die Parameter Anzahl der gesamten Armwechsel (gezählt wenn alle vier Pfoten auf dem Arm waren), Anteil der Armwechsel zu einem offenen Arm, Anteil der Zeit auf dem offenen Armen, Anteil der Zeit im Zentrum und das Aufbäumen der Mäuse analysiert.

#### **4.3.10.4 *Y-maze-Test***

Das Arbeitsgedächtnis und das Erkundungsverhalten wurden im *Y-maze-Test* (Test in einem Ypsilon förmigen Labyrinth) untersucht. Dieser Test basiert auf der generellen Bereitschaft von Nagetieren für sie neue Bereiche zu erkunden. Normalerweise suchen Nagetiere eher neue Bereiche auf als in zuvor besuchte zurückzukehren. Das Y-Labyrinth bestand aus drei gleichförmigen Armen (34 cm x 5 cm x 30 cm) aus transparentem Plexiglas, die so miteinander verbunden waren, dass sie ein Ypsilon bildeten. Das Labyrinth war mit Weißlicht (15 Lux) ausgeleuchtet. Mäuse wurden in der Mitte des Labyrinthes positioniert und solange dort belassen und videoüberwacht, bis sie 27 Armwechsel absolviert hatten oder die gegebene Zeit von 20 Minuten verstrichen war. Dabei wurde das Betreten eines Armes gezählt, wenn sich alle vier Pfoten auf dem Arm befanden. Es wurde der Anteil der Armwechsel und die durchschnittliche Zeit pro Wechsel analysiert.

#### **4.3.10.5 *Contextual fear-conditioning-Test***

Dieser Test basiert auf einer klassischen Konditionierung und dient der Untersuchung der Fähigkeit des Lernens und Erstellens einer Assoziation zwischen einer aversiven Erfahrung (hier: ein leichter elektrischer Impuls) und einem neutralen Kontext (hier: der Käfig), in dem

diese Erfahrung gesammelt wurde. Die Konditionierung führt normalerweise dazu, dass konditionierte Mäuse zu einem späteren Zeitpunkt in dem Kontext, in dem die Konditionierung stattfand, auch ohne den aversiven Stimulus ein Angstverhalten zeigen. Das Angstverhalten bzw. das Angstgedächtnis wird durch das sogenannte *Freezing* (Angststarre) der Mäuse quantifiziert, ein Verhalten, bei dem Mäuse bis auf die Atembewegung völlig bewegungslos sind. Zunächst mussten die Mäuse lernen den aversiven Stimulus mit dem neutralen Kontext zu assoziieren (Kontextgedächtnis). Dafür wurden die Mäuse in dem Kontext einer Plexiglaskammer (23,5 cm x 23,5 cm mit einer Höhe von 19,5 cm) mit einem Stahlgitterboden, über den ein milder elektrischer Impuls vermittelt werden konnte, konditioniert. Die Kammer war mit Weißlicht (45 Lux) ausgeleuchtet und besaß auf einer Seite ein sichtbares Muster. Für die Konditionierung wurden die Mäuse in der Mitte der Kammer positioniert und erhielten insgesamt drei milde, elektrische Impulse (0,35 mA, 1 s) nach 120, 160 und 200 Sekunden. Nach insgesamt 240 Sekunden wurde die Aufzeichnung der Bewegung beendet und die Mäuse sofort in ihren Heimkäfig zurückgesetzt. Das Langzeitangstgedächtnis der Mäuse wurde einen Tag nach der Konditionierung getestet, indem die Mäuse wieder in die Kammer eingebracht wurden, in der die Konditionierung stattgefunden hatte. Hier wurden sie für 3 Minuten beobachtet, wobei das Erstarrungsverhalten aufgezeichnet wurde. Um zu testen, ob die Mäuse zwischen dem Kontext, in dem die Konditionierung stattfand und einem neutralen Kontext unterscheiden können, wurden sie am zweiten Tag nach der Konditionierung in eine Kammer gesetzt, die der ersten ähnlich war, sich aber durch ein anderes Muster unterschied. Die Mäuse wurden ebenfalls für drei Minuten beobachtet und das Erstarrungsverhalten aufgezeichnet. Es wurde der Anteil der Zeit, die die Mäuse in Erstarrung verbrachten (erstarrt für mindestens eine Sekunde), automatisch durch ein modifiziertes *Mouse-E Motion*-System quantifiziert.

#### **4.3.10.6 Morris water maze-Test**

In dem *Morris water maze*-Test (Morris-Wasserlabyrinth-Test) wurde das räumliche und das Langzeitgedächtnis analysiert. Das Wasserlabyrinth besteht aus einem runden Wasserbecken (145 cm Durchmesser). Das Wasser wurde durch Zusetzen von nicht-toxischer weißer Farbe undurchsichtig gemacht, so dass eine weiße Plattform unter der Wasseroberfläche (14 cm Durchmesser, 9 cm hoch und 1 cm unter der Wasseroberfläche) nicht sichtbar war. Vier Markierungen waren an der Wand des Labyrinthes angebracht, die sich in Form und Graustufung unterschieden. Vier Lampen, verteilt auf dem Boden um das Wasserbecken, sorgten für eine gleichmäßige Ausleuchtung mit Weißlicht (60 Lux), über der Wasseroberfläche. Der Versuchsaufbau war rundherum durch schwarze Vorhänge abgegrenzt. Bevor die eigentlichen Experimente durchgeführt wurden, wurden die Mäuse daran gewöhnt zu schwimmen und auf eine Plattform zu klettern. Dies wurde in einem

kleinen rechteckigen, mit Wasser gefüllten Behälter (42,5 cm x 26,5 cm mit einer Höhe von 15,5 cm), in dem sich eine schwimmende Plattform befand (14 cm Durchmesser), durchgeführt. Die Position der Plattform war während der Gewöhnungsphase willkürlich und wurde in kompletter Dunkelheit durchgeführt. Nach der Gewöhnungsphase wurden die Mäuse in insgesamt 10 Trainingseinheiten, an zwei aufeinander folgenden Tagen, trainiert die versteckte Plattform zu finden (5 Trainingseinheiten pro Tag, maximale Dauer pro Einheit 90 Sekunden, mit einem Intervall von 10 Minuten zwischen den Einheiten). Die Startpositionen und die Position der Mäuse von der sie aus dem Labyrinth herausgeholt wurden, waren dabei willkürlich gewählt. Hierbei wurde die insgesamt zurückgelegte Strecke, die Zeit um die Plattform zu finden und die mittlere minimale Distanz zur Plattform analysiert. Um das Kurzzeitgedächtnis zu untersuchen wurde am zweiten Tag nach der letzten Trainingseinheit, ein sogenannter Transferversuch durchgeführt, vor dem die versteckte Plattform aus dem Labyrinth entfernt wurde und die Mäuse für 60 Sekunden in dem Labyrinth frei schwimmen konnten. Um das Langzeitgedächtnis zu untersuchen wurde 24 Stunden (Langzeit) und 7 Tage (Entfernt) nach der letzten Trainingseinheit ein Transferversuch durchgeführt. Bei den Transferversuchen wurde zum einen der Anteil der Zeit, die die Mäuse in dem Quadranten verbrachten, in dem sich zuvor die Plattform befand (Zielquadrant), zum anderen die mittlere minimale Distanz zu der Position, an der sich die Plattform während der Trainingseinheiten befand analysiert.

## **4.4 Proteinbiochemische Methoden**

### **4.4.1 Herstellen von Zelllysaten**

Für die Herstellung von Lysaten von primär kultivierten Neuronen wurden die Zellen zunächst auf Eis gestellt und 2 Mal mit PBS gewaschen. Die Lyse erfolgte mit 200  $\mu$ L (Stimulations-Experimente) bis 300  $\mu$ L (Biotinylierungs-Assays) RIPA-Puffer pro Vertiefung einer 6 Loch-Zellkulturplatte für 15 Minuten. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Oberfläche abgekratzt, das Lysat von zwei Proben je Bedingung vereinigt in ein Reaktionsgefäß überführt und unter Rotation für 15 Minuten bei 4 °C weiter lysiert. Nach der Lyse wurden die Proben für 20 Minuten bei 20000 g und 4 °C zentrifugiert, um Zelltrümmer zu pelletieren. Der Überstand wurde abgenommen, die Proteinkonzentration bestimmt, und die Proteinkonzentration der Proben durch Zugabe von RIPA-Puffer einander angeglichen. Anschließend wurden die Proben mit 5x Lämmli-Probenpuffer versetzt und im *Western Blot* analysiert.

### **4.4.2 Herstellung von Gewebelysaten adulter Mäuse**

Gewebeproben aus Hippocampus, Cortex und Leber adulter Mäuse wurden präpariert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lyse der Gewebe erfolgte durch mechanische

Homogenisierung mithilfe eines Potters in RIPA-Puffer. Die Homogenate wurden für 15 Minuten auf Eis und anschließend für 15 Minuten bei 4 °C unter Rotation lysiert. Nach der Lyse wurden die Proben für 20 Minuten bei 20000 g und 4 °C zentrifugiert, um Zelltrümmer zu pelletieren. Der Überstand wurde abgenommen, die Proteinkonzentration bestimmt und durch Zugabe von RIPA-Puffer einander angeglichen, anschließend der Überstand mit 5x Lämmli-Probenpuffer versetzt und im *Western Blot* analysiert.

#### 4.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration in Zell- und Gewebelysaten

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in Zelllysaten von primären, kortikalen Rattenneuronen und Gewebelysaten adulter Mäuse erfolgte kolorimetrisch mit dem Reaktionsatz *DC-Protein Assay Kit*, nach den Angaben des Herstellers, in optischen Mikrotiterplatten, im 96-Loch-Format. Dabei erfolgte die Berechnung der Proteinkonzentration der Proben im Triplikate, anhand der linearen Gleichung einer Eichreihe, die durch das Verdünnen einer BSA-Stammlösung erstellt wurde.

#### 4.4.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht das Auftrennen von Proteinen anhand ihres Molekulargewichtes unter denaturierenden Bedingungen. Die mit Lämmli-Probenpuffer versetzten Zell- oder Gewebelysate wurden entweder für 5 Minuten bei 95 °C gekocht, oder im Falle der Analyse von Membranproteinen nicht gekocht. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in 1,5 mm dicken 10 % SDS-Polyacrylamidgelen, die mit einem Sammelgel überschichtet waren (Tabelle 4-5), in einem diskontinuierlichen Tris/Glycin-Puffersystem.

Tabelle 4-5: Zusammensetzung SDS-Polyacrylamidgelen pro 10 mL.

Komponente	Trenngel	Sammelgel
ddH <sub>2</sub> O	3,9 mL	6,9 mL
30 % Acrylamid-Stammlösung	3,3 mL	1,7 mL
1,5 M TRIS/HCL pH 8,8	2,6 mL	-
1,0 M TRIS/HCL pH 6,8	-	1,3 mL
10 % SDS	0,1 mL	0,1 mL
10 % APS	0,1 mL	0,1 mL
TEMED	0,007 mL	0,007 mL

Dafür wurden 15 µL der Proben auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und in SDS-PAGE-Laufpuffer bei RT, zunächst bei 100 V (Sammelgel) und dann bei 120 V (Trenngel), aufgetrennt bis der im Probenpuffer enthaltene Bromphenolblau-Farbstoff den unteren Rand des Gels erreichte. Zum Größenvergleich der aufgetrennten Proteine, wurde der Protein-Größenstandard *PageRuler Plus Pre-Stained Protein Ladder* verwendet. Für die Herstellung der Gele und die Durchführung der SDS-PAGE, wurde das *Mini-PROTEAN III-System* verwendet.

#### 4.4.5 Western Blot und Immundetektion

Der *Western Blot* erlaubt den spezifischen und sensitiven Nachweis von Proteinen mittels einer Immundetektion im Anschluss an eine SDS-PAGE. Der Proteintransfer aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte in einer Nassblotapparatur (*Mini Trans-Blot-System*) in *Western Blot*-Transferpuffer, bei 400 mA für 120 Minuten. Anschließend an den Transfer wurden die Membranen, um freie Bindungsstellen zu blockieren, mit 5 % (w/v) Milchpulver in TBS-T überschichtet und für 1 Stunde bei RT und leichtem Schwenken inkubiert. Nach der Blockierung wurden die Membranen mit dem spezifischen Primärantikörper, der verdünnt in 5 % (w/v) Milchpulver oder 5 % (w/v) BSA in TBS-T vorlag, überschichtet und über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schwenken inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T-Puffer (jeweils 10 Minuten) wurde die Membran für 1 Stunde mit einem Sekundärantikörper (verdünnt in TBS-T-Puffer) inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit TBS-T erfolgte die Detektion der Antikörper-markierten Proteine mit frisch angesetztem ECL-Chemilumineszenzsubstrat (*WesternBright* Chemilumineszenz Substrat für Film). Die Chemilumineszenzsignale wurden mit Hilfe des digitalen *ChemiDOC XRS*-System durch eine CCD-Kamera detektiert. Die densitometrische Auswertung der Signale erfolgte mit der *Image Lab-Software*. Eine vollständige Liste der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper sowie deren Verdünnungen und Inkubationsbedingungen findet sich in Abschnitt 3.10.

#### 4.5 Statistische Auswertung

Für den statistischen Vergleich von zwei Gruppen wurde ein unabhängiger zweiseitiger t-Test durchgeführt. Ansonsten wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (*one-way ANOVA*; engl. *analysis of variance*), gefolgt von einem *post-hoc* Vergleich nach der Tukey-Methode, durchgeführt. Im Falle der Verhaltensanalysen wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse (*two-way ANOVA*), gefolgt von einem *post-hoc* Vergleich nach der Bonferroni-Methode, durchgeführt. Die gezeigten Daten entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  der Standardabweichung (SD). Im Falle der Verhaltensanalysen entsprechen die gezeigten Daten dem Mittelwert  $\pm$  dem Standardfehler (SEM). Als statistisch signifikant wurden p-Werte unterhalb von 0,05 angesehen.

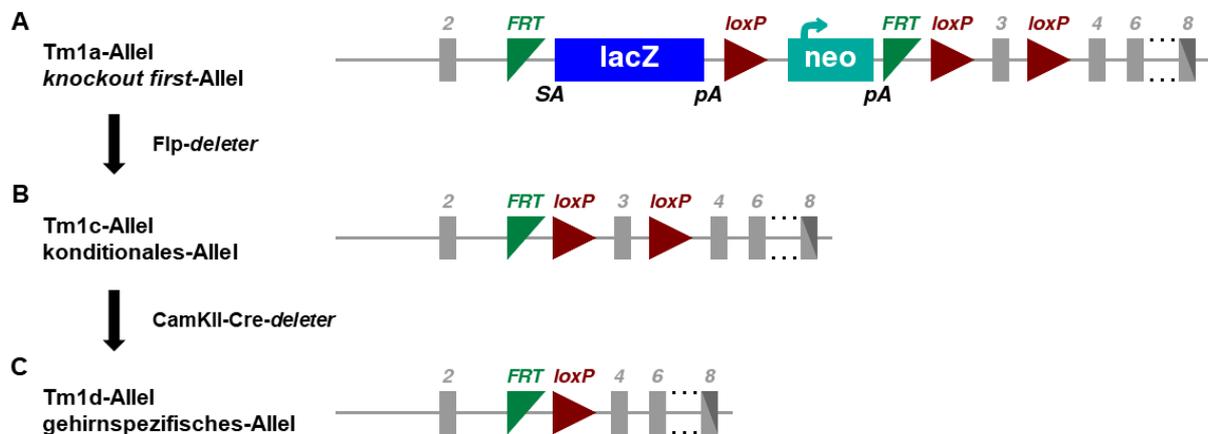
## 5 Ergebnisse

### 5.1 Etablierung von Modellsystemen für die Analyse der Funktion von PIST im zentralen Nervensystem

Für die Untersuchung der Rolle von einzelnen Proteinen im ZNS stehen neben *in vitro*-Analysen von nicht-neuronalen Zellen zwei weniger artifizielle Modellsysteme zur Verfügung. Dies sind zum einen *in vitro* Analysen von primären Neuronenkulturen, die aus den Gehirnen von embryonalen Ratten oder Mäusen erzeugt wurden und zum anderen *in vivo*-Analysen von spezifischen *knockout*-Mauslinien.

#### 5.1.1 Generierung einer konditionalen, gehirnspezifischen PIST *knockout*-Mauslinie

Für die Erzeugung einer PIST/GOPC *knockout*-Mauslinie wurde der embryonale Stammzellklon EPD0822\_2\_B04 (EUCOMM Konsortium, München, Deutschland) verwendet. Bei diesem Klon wurde mithilfe eines *targeting*-Vektors, durch homologe Rekombination, in einem *Gopc*-Allel eine Selektionskassette nach dem *knockout-first*-Prinzip eingebracht (Abbildung 5-1 A; Tm1a-Allel).



**Abbildung 5-1: Schematische Darstellung des modifizierten *Gopc*-Allels und dessen Konversion zum konditionalen Allel.**

**A** Darstellung des *Gopc*-Allels mit inserierter Selektionskassette (Tm1a-Allel). Der alternative Spleiß-Akzeptor En2SA (hier SA) führt zur Expression eines Genprodukts, bestehend aus den ersten 111 Aminosäuren von PIST in Fusion mit der  $\beta$ -Galactosidase. **B** Darstellung des konditionalen Tm1c-Allels nach dem Einkreuzen einer transgenen *Flp-deleter*-Mauslinie. Durch Rekombination zwischen den FRT-Sequenzmotiven kommt es zur Konversion des Tm1a-Allels zum Tm1c-Allel und PIST kann wieder normal exprimiert werden. Dieses Allel besitzt das Potenzial um konditionale *knockout*-Mäuse zu generieren, da das dritte Exon von zwei *loxP*-Sequenzmotiven flankiert wird. **C** Darstellung des gehirnspezifischen Tm1d-Allels. Durch das Einkreuzen der *CamKII-Cre-deleter*-Mauslinie wird die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des nur in Neuronen des Vorderhirns aktiven Cam-Kinase II-Promotors exprimiert. Dadurch wird das dritte Exon des *Gopc*-Gens entfernt und dieses dadurch zerstört. Modifiziert nach <http://www.mousephenotype.org/>

Bei den mit diesem Stammzellklon erzeugten Mäusen sorgt der alternative Spleiß-Akzeptor (En2SA) der Selektionskassette dafür, dass beim Spleißen der mRNA das Transkript des *lacZ*-Gens hinter das zweite Exon des *Gopc*-Gens angefügt wird. Durch ein an das *lacZ*-Gen folgendes Stopp-Codon und eine Polyadenylierungssequenz (pA) wird der Rest des *Gopc*-Gens nicht weiter transkribiert. Dadurch wird eine verkürzte mRNA erzeugt; das

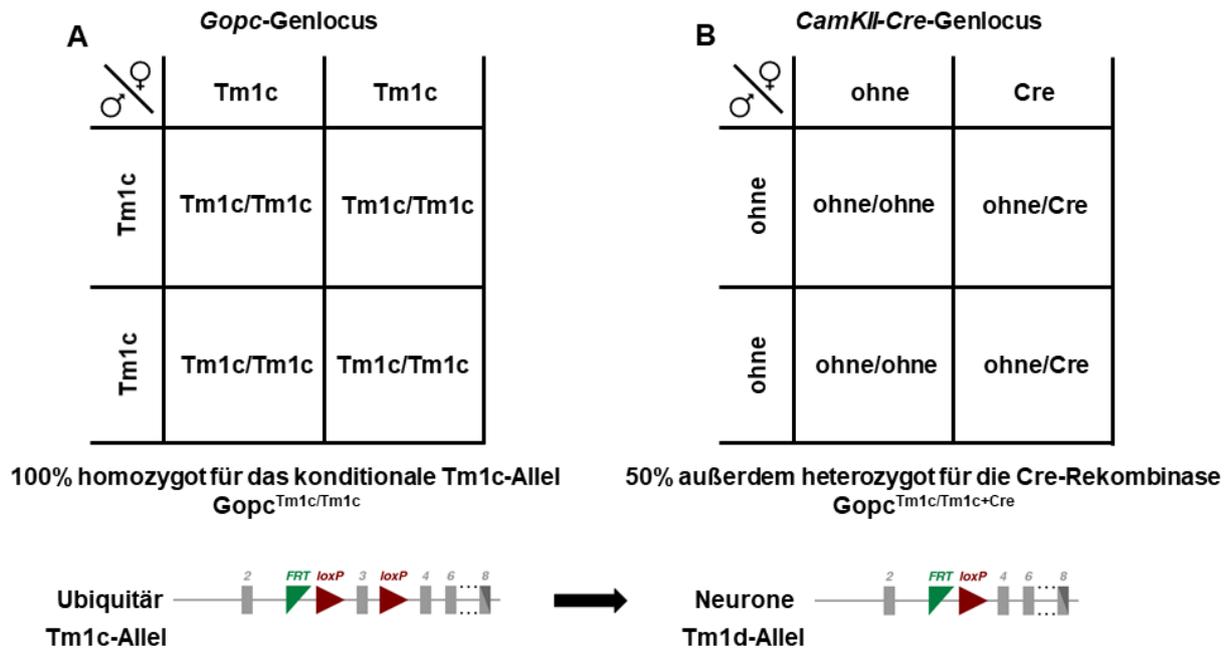
resultierende Genprodukt besteht aus den ersten 111 Aminosäuren von PIST in Fusion mit der vom *lacZ*-Gen kodierten  $\beta$ -Galactosidase (Abbildung 5-1 A; Tm1a-Allel). Nach der Etablierung dieser *knockout-first*-Mauslinie (C57BL/6-Gopc<sup>Tm1a</sup>) stellte sich heraus, dass aus Verpaarungen von Mäusen, die heterozygot für das Tm1a-Allel waren, entgegen der nach Mendel erwarteten 25 %, nach mehreren Generationen nur 2 % homozygote (Gopc<sup>Tm1a/Tm1a</sup>) Mäuse geboren wurden. Im Vergleich dazu, wurden 36 % Wildtyp (Gopc<sup>w<sup>t</sup>/w<sup>t</sup></sup>) und 62 % heterozygote (Gopc<sup>w<sup>t</sup>/Tm1a</sup>) Mäuse geboren<sup>[109]</sup>. Aufgrund der geringen Verfügbarkeit von homozygoten PIST *knockout*-Mäusen wurden anfänglich nur heterozygote PIST *knockout*-Mäuse analysiert. Diese ersten Analysen von heterozygoten PIST *knockout*-Mäusen zeigten, dass die Reduktion der PIST-Proteinmenge auf ca. 62 %, der in Wildtyp-Mäusen detektierten Menge, zu Effekten in Bezug auf einige Interaktionspartner von PIST führte<sup>[109]</sup>.

Um das Problem der geringen Verfügbarkeit von homozygoten PIST *knockout*-Mäuse zu umgehen, wurde in dieser Arbeit, ausgehend von der C57BL/6-Gopc<sup>Tm,1a</sup>-Mauslinie, eine gehirnspezifische konditionale *knockout*-Mauslinie erzeugt. Dazu wurde eine Strategie gewählt, die dazu führt, dass das *Gopc*-Gen nur in Neuronen des Vorderhirns ausgeschaltet wird. Dies war möglich, da die bereits eingebrachte Selektionskassette FRT- und loxP-Sequenzmotive aufweist, an die sequenzspezifische DNA-Rekombinasen binden können, wodurch die Selektionskassette editiert werden kann (Abbildung 5-1 A Tm1a-Allel). Zunächst wurde die, ursprünglich von Rodriguez *et al.* (2000) beschriebene<sup>[116]</sup>, transgene Flp-*deleter*-Maus in die bestehende C57BL/6-Gopc<sup>Tm1a</sup>-Mauslinie eingekreuzt. In den Nachkommen kam es durch die Expression der Flp-Rekombinase zu einer Rekombination zwischen den FRT-Sequenzmotiven innerhalb der Selektionskassette und das Tm1a-Allel wurde zum Tm1c-Allel konvertiert. Dadurch wurde der Bereich der Selektionskassette mit dem alternativen Spleiß-Akzeptor entfernt. Das *Gopc*-Gen kann so wieder normal transkribiert und PIST wieder normal exprimiert werden. Jedoch wurde nun in dem Tm1c-Allel das dritte Exon des *Gopc*-Gens von zwei loxP-Sequenzmotiven flankiert (Abbildung 5-1 B; Tm1c-Allel). Im zweiten Schritt wurde in die so erzeugte C57BL/6-Gopc<sup>Tm1c</sup>-Mauslinie die von Casanova *et al.* (2001) beschriebene<sup>[117]</sup> CamKII-Cre-*deleter*-Mauslinie eingekreuzt. Der Cam Kinase II-Promotor ist gewebespezifisch in Neuronen des Vorderhirns aktiv. Von Casanova *et al.* wurde gezeigt, dass in der transgenen Maus die Cam-Kinase II ein Expressionsmuster wie das endogene Protein in Wildtyp-Mäusen aufweist. Eine starke Expression der Cam-Kinase II sowie die daran gekoppelte Expression der Cre-Rekombinase findet im Cortex und Hippocampus statt. Weniger stark werden die Proteine im Striatum, Thalamus und Hypothalamus exprimiert. Im Cerebellum sowie außerhalb des Gehirns findet keine Expression statt. Die Expression der Cre-Rekombinase beginnt postnatal ab Tag 3 und erreicht ihr Maximum an Tag 15.

Um sicherzustellen, dass bei Mäusen der C57BL/6-Gopc<sup>Tm1c</sup>-Linie der BL/6J-Hintergrund stabilisiert war, wurden während der Etablierung einige Zuchttiere hinsichtlich ihres Linienhintergrundes, in Zusammenarbeit mit PD Dr. Hoffmeister-Ullerich der *Core Facility* Bioanalytik des Zentrums für Molekulare Neurobiologie Hamburg, analysiert. In den Zuchtstämmen C57BL/6N (BL6N) und C57BL/6J (BL6J) sind mehrere Mutationen bekannt, die unterschiedlich in den Stämmen konserviert sind. Das ist zum einen eine Deletion im BL/6J-Stamm im Gen, das für die *nicotinamid nucleotid transhydrogenase* (Nnt) kodiert, zum anderen zwei Mutationen, die im BL/6N-Stamm konserviert sind. Dies ist eine Mutation im Gen, das für das *crumbs homolog 1* (Crb1) sowie eine Mutation im Gen, das für das *cytoplasmic FMRP interactin protein 2* (Cyfip2) kodiert. Durch die Analyse dieser Mutationen, konnten Tiere für die Zucht ausgewählt werden, die homozygot die Nnt-Deletion, aber nicht die Mutationen in den Genen für Crb1 und Cyfip2 aufwiesen, wodurch angenommen wurde, dass diese Tiere weitestgehend den Linienhintergrund des C57BL/6J-Stammes besaßen (Daten nicht gezeigt). Für die Erzeugung der konditionalen PIST *knockout*-Mäuse wurden Eltern verpaart, die homozygot für das konditionale Tm1c-Allel waren (Abbildung 5-2 A), wobei einer der Eltern, bevorzugt das Weibchen, zusätzlich heterozygot das transgene CamKII-Cre-Allel trug (Abbildung 5-2 B). Aus diesen Verpaarungen gingen Nachkommen hervor, die alle homozygot für das Tm1c-Allel waren, wovon außerdem ca. 50 % der Nachkommen das CamKII-Cre-Allel aufwiesen. Diese konditionalen PIST *knockout*-Mäuse (GOPOC<sup>Tm1c/Tm1c+Cre</sup>) wurden mit den Nachkommen verglichen, die homozygot für das Tm1c-Allel waren, aber nicht die CamKII-Cre-Rekombinase exprimierten (Gopc<sup>Tm1c/Tm1c</sup>).

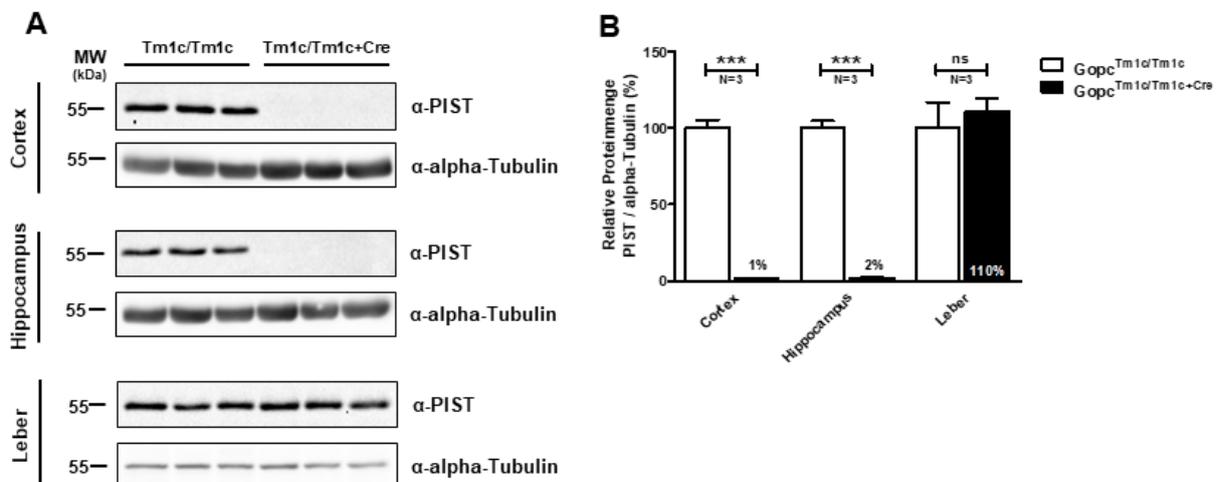
Die postnatale Konversion des Tm1c-Allels zum Tm1d-Allels in Neuronen wurde auf Proteinebene nachgewiesen. Dafür wurden die Gehirne von adulten Gopc<sup>Tm1c/Tm1c</sup>- und Gopc<sup>Tm1c/Tm1c+Cre</sup>-Mäusen isoliert und Proteinlysate vom Cortex- und Hippocampusgewebe hergestellt. Um die PIST-Proteinmenge in Zellen außerhalb des Gehirns analysieren zu können, wurden zusätzlich Lysate aus dem Lebergewebe hergestellt.

Die Analyse der PIST-Proteinmenge in den Lysaten erfolgte durch *Western Blot* (Abbildung 5-3 A). Für die Quantifizierung wurden die detektierten Chemilumineszenzsignale von PIST auf das Signal des Haushaltsproteins alpha-Tubulin der gleichen Probe normiert. In den Cortex- und Hippocampuslysaten der Gopc<sup>Tm1c/Tm1c+Cre</sup>-Mäuse konnte, im Vergleich zu den Gopc<sup>Tm1c/Tm1c</sup>-Mäusen, kein PIST detektiert werden. Im Gegensatz dazu war die PIST-Proteinmenge in den Leberlysaten der Gopc<sup>Tm1c/Tm1c+Cre</sup>-Mäuse, im Vergleich zu den Lysaten der Gopc<sup>Tm1c/Tm1c</sup>-Mäuse, unverändert (Abbildung 5-3 B).



**Abbildung 5-2: Verpaarungsschema zur Erzeugung von konditionalen PIST *knockout*-Mäusen für experimentelle Vorhaben.**

Um konditionale PIST *knockout*- sowie Wildtyp-Tiere in den Nachkommen einer Verpaarung zu erhalten, wurden Eltern, die homozygot für das konditionale Tm1c-Allel waren verpaart (A), wobei eines der Eltern zusätzlich heterozygot das Allel für die CamKII-Cre-Rekombinase trug (B). Dadurch waren alle Nachkommen homozygot für das Tm1c-Allel und ca. 50 % der Nachkommen waren außerdem heterozygot für das CamKII-Cre-Allel.



**Abbildung 5-3: In Cortex- und Hippocampusgewebelysaten von Gopc<sup>Tm1c/Tm1c+Cre</sup>-Mäusen wurde kein PIST detektiert, hingegen war die PIST-Proteinmenge außerhalb des Gehirns unverändert.**

**A** Die Proteinmenge von PIST wurde in Cortex-, Hippocampus- und Lebergewebelysaten von adulten Gopc<sup>Tm1c/Tm1c</sup>- und Gopc<sup>Tm1c/Tm1c+Cre</sup>-Mäusen durch *Western Blot*, unter Einsatz gleicher Proteinkonzentrationen, analysiert. Für die Detektion von PIST und alpha-Tubulin wurden spezifische Antikörper verwendet. **B** Quantifizierung der *Western Blot*-Daten aus A. Dargestellt ist das Verhältnis von PIST zu alpha-Tubulin (PIST / alpha-Tubulin) in den Lysaten von Gopc<sup>Tm1c/Tm1c+Cre</sup>-Mäusen bezogen auf das Verhältnis in den Lysaten von Gopc<sup>Tm1c/Tm1c</sup>-Mäusen in Prozent (Gopc<sup>Tm1c/Tm1c</sup> = 100 %). Die Balken stellen das arithmetische Mittel  $\pm$  SD dar, ungepaarter t-Test, 2 Seiten; N=3; Signifikanzlevel: \*\*\*  $p \leq 0,001$  (ns = nicht-signifikant).

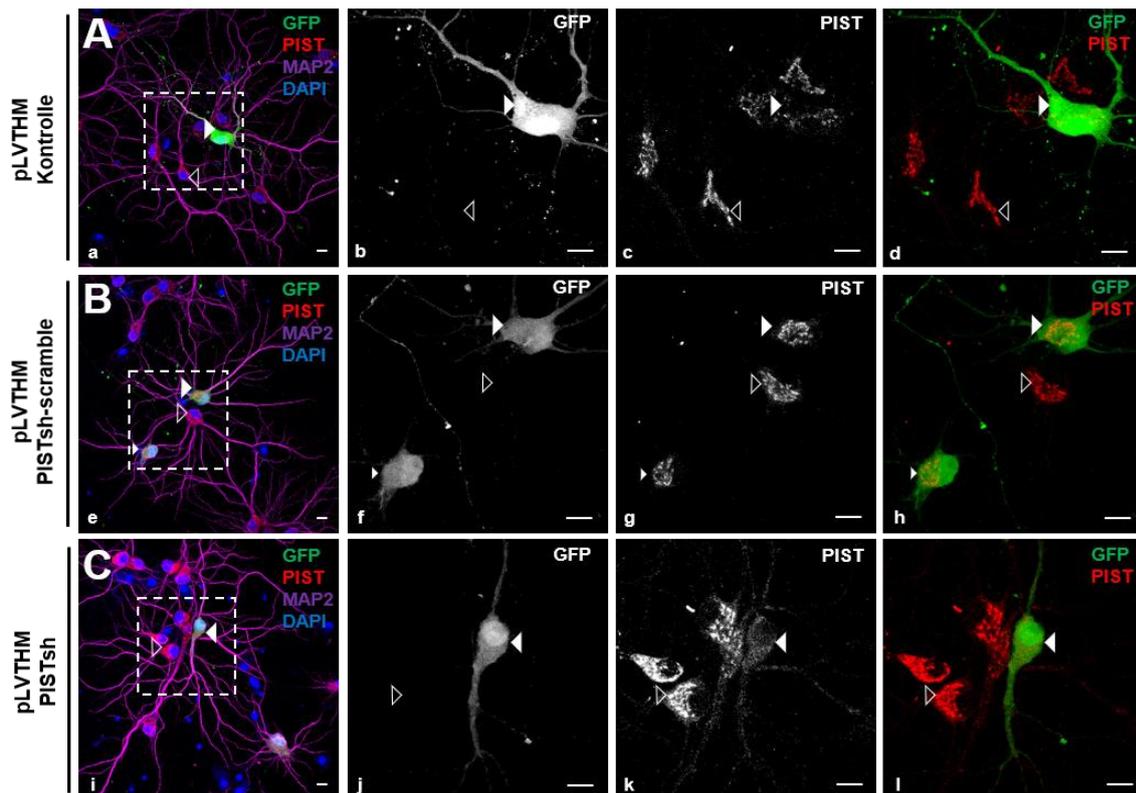
### 5.1.2 Etablierung eines PIST-*knockdown* Modells in primären, kultivierten Rattenneuronen durch modifizierte Lentiviren

Die Effizienz diverser Transfektionsmethoden ist zu gering, um primäre Neuronen in Kultur in quantitativen Maßstab genetisch zu verändern. Deswegen wurde für die proteinbiochemischen Assays dieser Arbeit die Transduktion von Neuronen mittels genetisch

modifizierter Lentiviren gewählt. Hierbei wird die virale RNA durch eine hohe Infektionsrate sehr effizient in die Neuronen eingebracht, dort in DNA umgeschrieben und diese stabil in das Genom der infizierten Neurone integriert, wodurch deren genetische Veränderung erreicht wird. Die für die Erzeugung von lentiviralen Partikeln benötigten Plasmide standen in der Arbeitsgruppe von Prof. Kreienkamp zur Verfügung. Für den *Knockdown* von PIST wurden in HEK293T-Zellen lentivirale Partikel produziert, die zur Expression einer gegen PIST gerichteten shRNA und GFP führten. Diese Partikel wurden für die Infektion von primären Rattenneuronen verwendet. In infizierten Neuronen wird die shRNA von der zelleigenen RNA-Interferenzmaschinerie zu siRNA prozessiert, wodurch ein siRNA vermittelter *Knockdown* von PIST erreicht wird. Als Kontrolle dienten Lentiviren, die mit dem Leervektor (pLVTHM Kontrolle) oder mit dem Plasmid pLVTHM PISTsh-*scramble* produziert wurden, welches für eine randomisierte shRNA kodiert. Dieses Plasmid stand erst im späteren experimentellen Verlauf zur Verfügung, weswegen der Kontroll-Lentivirus häufiger verwendet wurde. Der PISTsh-*scramble*-Lentivirus wurde jedoch in einigen der Experimente eingesetzt um sicherzustellen, dass beobachtete Effekte nicht allein aufgrund der Transkription der gegen PIST gerichteten shRNA auftraten, sondern Ursache des resultierenden PIST-*knockdown* waren.

Zunächst wurden primäre, kultivierte, hippocampale Rattenneurone an DIV 7 mit den genannten Plasmiden transfiziert und an DIV 14 fixiert. Anschließend wurde eine immunzytochemische Färbung durchgeführt (Abbildung 5-4). Erfolgreich transfizierte Neuronen wurden durch die grüne Fluoreszenz des exprimierten GFP identifiziert. Außerdem wurden die Neuronen für PIST (rot), für das dendritische Protein MAP2 (magenta) und die nukleäre DNA mittels DAPI (blau) angefärbt.

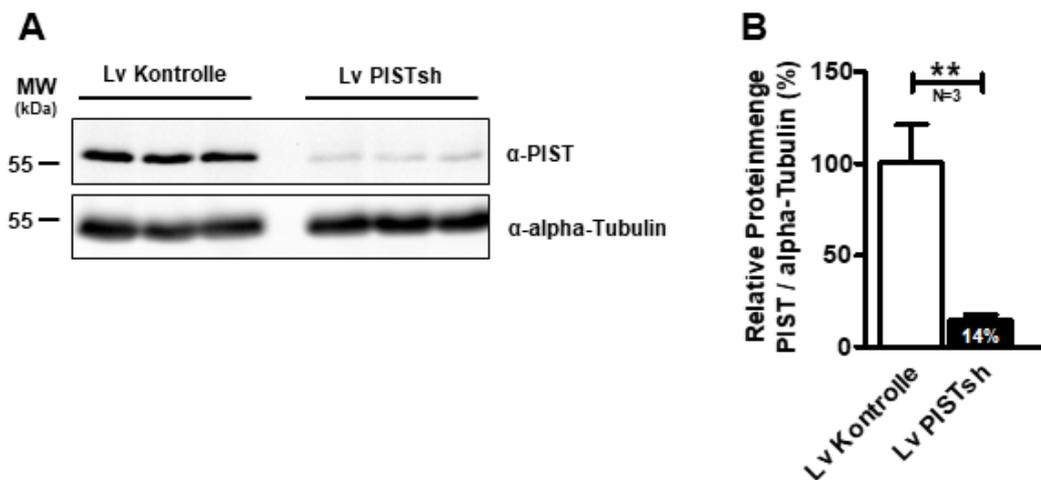
Hierbei wurde für MAP2 bei allen Bedingungen eine gleichmäßige Färbung entlang der Dendriten detektiert. Außerdem war die nukleäre DNA in allen Präparaten gleichmäßig durch DAPI angefärbt. Zusammen genommen sprach dies dafür, dass sowohl untransfizierte sowie transfizierte Neurone vital waren (Abbildung 5-4; Vergleich offener und geschlossener Pfeil). PIST wurde, wie bereits von anderen beschrieben, in einem perinukleären Netzwerk detektiert (Abbildung 5-4 A-C)<sup>[53]</sup>. Die Transfektion mit dem pLVTHM PISTsh-Plasmid, nicht aber mit dem pLVTHM Kontroll-, oder PISTsh-*scramble*-Plasmid führte zu einer deutlich sichtbaren Reduzierung des PIST-Signals im perinukleären Bereich, im Vergleich zu untransfizierten Neuronen (Abbildung 5-4; d, h und i; Vergleich offener und geschlossener Pfeil). Des Weiteren waren auf den Übersichtsbildern (Abbildung 5-4; a+e+i) keine offensichtlichen morphologischen Veränderungen zwischen transfizierten und untransfizierten Neuronen zu erkennen (Vergleich offener und geschlossener Pfeil).



**Abbildung 5-4: Die Transfektion mit dem pLVTHM PISTsh-Plasmid führte zu einem deutlich reduzierten Signal von PIST in primären, kultivierten, hippocampalen Neuronen**

**A+B+C** Primäre, kultivierte, hippocampale Rattenneuronen wurden an DIV 7 mit dem pLVTHM Kontroll- (A), PISTsh-scramble- (B), oder dem PISTsh-Plasmid (C) transfiziert und an DIV 14 fixiert. Anschließend wurden die Neuronen immunzytochemisch für PIST (rot), MAP2 (magenta) und nukleäre DNA durch DAPI (blau) gefärbt. Transfizierte Zellen exprimierten GFP (grün). Dargestellt sind Maximumintensitätsprojektionen, deren Ebenen sich über den Zellkörper erstrecken (A=9, B=8, C=9 Ebenen; Schichtdicke 0,5  $\mu\text{M}$ ). **a+e+i** Überlagerung des GFP-, PIST-, MAP2- und DAPI-Kanals. **b+c, f+g und j+k** 2,5-fache Vergrößerung des umrahmten Bereichs aus a, e bzw. i. Einzeldarstellung des GFP- (b, f und j) und PIST-Kanals (c, g und k). **d+h+l** Überlagerung des GFP- und PIST-Kanals aus b+c, f+g und j+k. Die Transfektion mit dem pLVTHM PISTsh-Plasmid (C; i-l, geschlossener Pfeil) führt zu einer deutlichen Reduzierung des PIST-Signals, im Vergleich zu untransfizierten Neuronen (C; i-l, offener Pfeil). Außerdem hat die Transfektion mit dem pLVTHM Kontroll- (A; a-d, geschlossener Pfeil) und PISTsh-scramble-Plasmid (B; e-h, geschlossener Pfeil) keinen sichtlichen Einfluss auf das PIST Signal, im Vergleich zu untransfizierten Neuronen (A; a-d, B; e-h und C; j-l, offener Pfeil). Skala 10  $\mu\text{M}$ .

Für die Analyse der Effizienz der mit dem pLVTHM PISTsh-Plasmid erzeugten lentiviralen Partikel im quantitativen Maßstab wurden primäre, kultivierte, kortikale Rattenneuronen mit PISTsh- oder Kontroll-Lentivirus infiziert. Hier führte der PISTsh-Lentivirus zu einer Reduzierung der PIST-Proteinmenge auf 14 %, im Vergleich zu Neuronen die mit dem Kontroll-Lentivirus infiziert waren (Abbildung 5-5 B).



**Abbildung 5-5: Die Transduktion von primären, kultivierten, kortikalen Rattenneuronen durch den PISTsh-Lentivirus führte zu einer effizienten Reduktion der PIST-Expression.**

**A** Primäre, kultivierte, kortikale Rattenneuronen wurden an DIV 7 mit gleichen Mengen an transduzierenden Einheiten von dem PISTsh- (Lv PISTsh) oder dem Kontroll-Lentivirus (Lv Kontrolle) infiziert. Die Zellen wurden an DIV 14 lysiert und die PIST-Proteinmenge in den Lysaten durch *Western Blot* unter Einsatz gleicher Proteinkonzentrationen analysiert. Für die Detektion von PIST und alpha-Tubulin wurden spezifische Antikörper verwendet. **B** Quantifizierung der *Western Blot* Daten aus A. Dargestellt ist das Verhältnis von PIST zu alpha-Tubulin (PIST / alpha-Tubulin; Lv Kontrolle = 100 %). Die Balken stellen das arithmetische Mittel  $\pm$  SD dar. Signifikanzlevel: \*\*,  $p \leq 0,01$  ungepaarter t-Test, 2 Seiten,  $N=3$ .

## 5.2 Analyse des Einflusses von PIST auf die zelluläre sowie die an der Zelloberfläche lokalisierte Proteinmenge von Interaktionspartnern, die im zentralen Nervensystem eine Rolle spielen

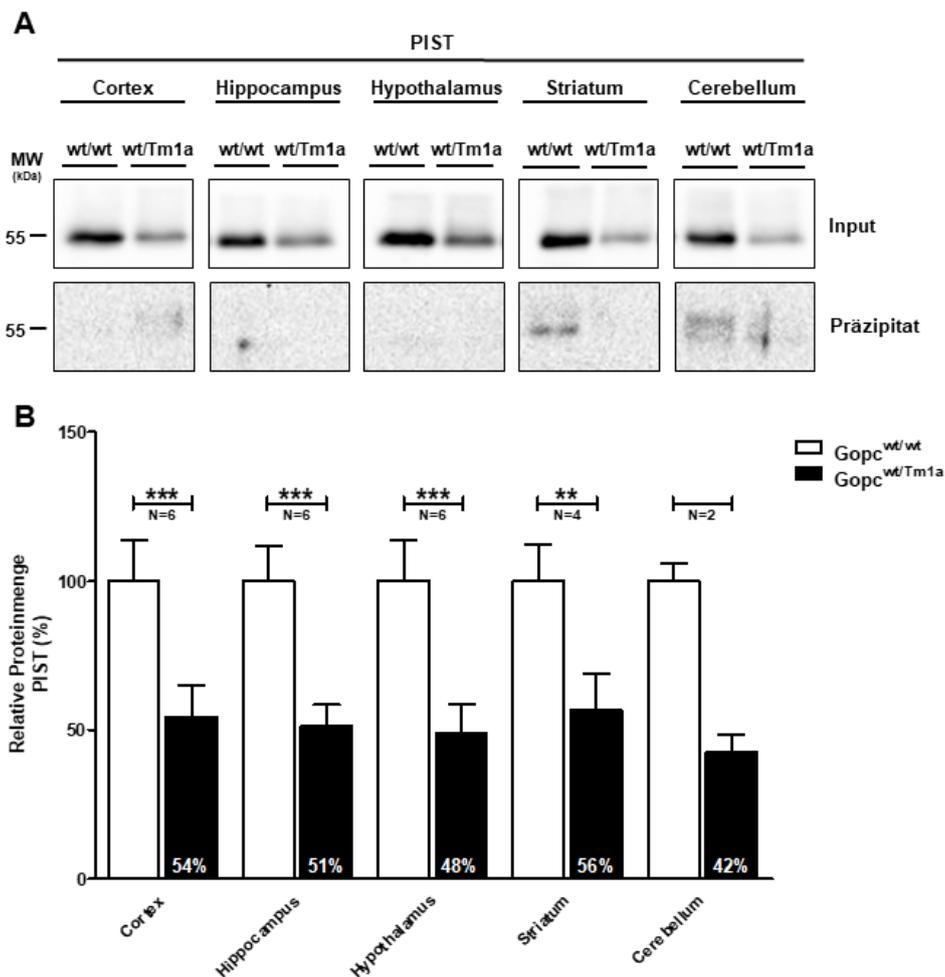
Um den Einfluss von PIST auf die Lokalisierung von Interaktionspartnern im ZNS zu untersuchen, wurden die zellulären sowie die an der Zelloberfläche lokalisierten Proteinmengen einiger Interaktionspartner durch Zelloberflächenbiotinylierung von Mausgewebeschnitten (Abschnitt 5.2.1) oder Kulturen von primären, kortikalen Rattenneuronen (Abschnitt 5.2.2) analysiert.

### 5.2.1 Analyse des Einflusses von PIST auf die Lokalisierung von Interaktionspartnern in heterozygoten PIST *knockout*-Mäusen aus der *knockout-first*-Mauslinie durch Zelloberflächenbiotinylierung

Für die Zelloberflächenbiotinylierungen an akuten Gehirngewebeschnitten wurden Wildtyp- ( $Gopc^{wt/wt}$ ) und heterozygoten PIST *knockout*-Mäusen ( $Gopc^{wt/Tm1a}$ ) aus der *knockout-first*-Mauslinie (C57BL/6- $Gopc^{Tm1a}$ ) verwendet. Als Interaktionspartner von PIST wurden mGluR5, Stargazin und AMPA-Rezeptoren ausgewählt. Die AMPA-Rezeptoruntereinheiten interagieren nicht direkt mit PIST, sondern indirekt durch Stargazin<sup>[50]</sup>. Die Analyse der Proteinmengen im Zelllysate und Präzipitat erfolgte durch *Western Blot*. Die Abbildungen 5-6 A und 5-7 A zeigen als Beispiel die *Western Blot*-Daten für PIST und den Interaktionspartner mGluR5 in den verschiedenen Gehirnregionen.

PIST konnte in allen analysierten Gehirnregionen detektiert werden, wobei die Signalintensität, wie bereits beschrieben, in  $Gopc^{wt/Tm1a}$ -Mäusen im Input, im Vergleich zum  $Gopc^{wt/wt}$ -Mäusen, um etwa 50 % reduziert war. Weiterhin wurde in den Präzipitaten der

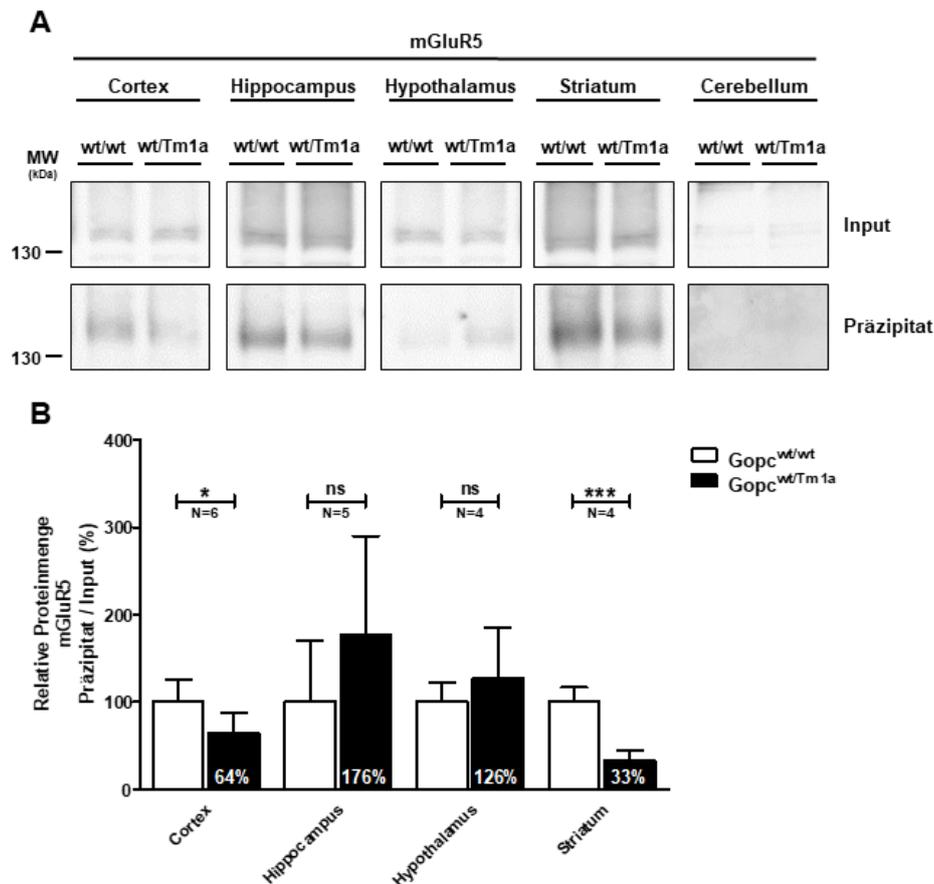
Biotin-markierten Proteine kein oder kaum PIST detektiert (Abbildung 5-6 A). Hingegen resultierten die Detektionen der Interaktionspartner nicht in allen Gehirnregionen in quantifizierbaren Signalintensitäten (Abbildung 5-7 A; exemplarisch für mGluR5). Die Quantifizierung der an der Oberfläche lokalisierten Proteinmenge von mGluR5, GluR1 und Stargazin zeigte eine hohe Variabilität zwischen den einzelnen Experimenten, die sich in den zum Teil sehr großen Fehlern widerspiegelte (Abbildung 5-7 B und 5-8 A+B).



**Abbildung 5-6: Die Proteinmenge von PIST in Gopc<sup>wt/Tm1a</sup>-Mäusen ist in verschiedenen Gehirnregionen auf ca. 50% der Proteinmenge in Wildtyp-Mäusen reduziert.**

**A** Von Gehirnen adulter ca. 12 Wochen alter Wildtyp- (Gopc<sup>wt/wt</sup>) und heterozygoter PIST *knockout*-Mäuse (Gopc<sup>wt/Tm1a</sup>) wurden koronal 300 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt und eine Zelloberflächenbiotinylierung durchgeführt. Anschließend wurden die Gehirnregionen Cortex (N=6), Hippocampus (N=6), Hypothalamus (N=6), Striatum (N=4) und Cerebellum (N=2) getrennt und separat lysiert. Aus dem gesamten Lysat (Input) wurden die Biotin-markierten Proteine durch Streptavidin, das an Agarosekügelchen gekoppelt war, präzipitiert (Präzipitat). Die Analyse der gesamten Proteinmenge von PIST im Input und im Präzipitat erfolgte durch *Western Blot* unter Einsatz gleicher Probenvolumina. Für die Detektion von PIST kam ein spezifischer Antikörper zum Einsatz. **B** Quantifizierung der *Western Blot*-Daten aus A. Dargestellt ist der Mittelwert von PIST in den Gewebelysaten der Gopc<sup>wt/Tm1a</sup>-Mäuse bezogen auf den Mittelwert der Gopc<sup>wt/wt</sup>-Mäuse in Prozent (Gopc<sup>wt/wt</sup> = 100 %). Die Balken stellen das arithmetische Mittel ± SD dar; ungepaarter t-Test, 2 Seiten; Signifikanzlevel: \*\* p ≤ 0,01, \*\*\* p ≤ 0,001.

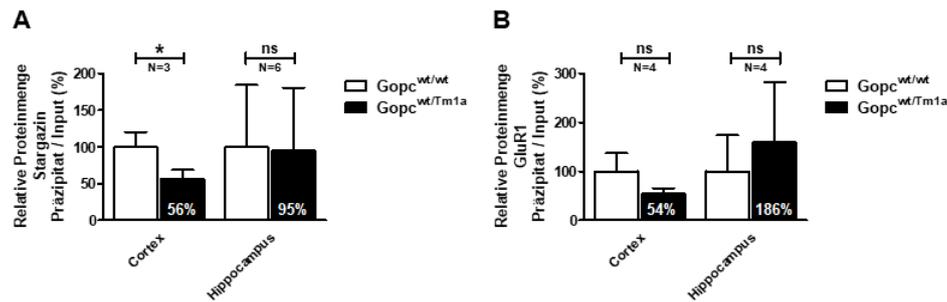
Der metabotrope Glutamatrezeptor mGluR5 konnte mit Ausnahme des Cerebellums, in allen Gehirnregionen detektiert werden. Dabei war die Proteinmenge von mGluR5 an der Zelloberfläche im Cortex und Striatum von Gopc<sup>wt/Tm1a</sup>-Mäusen im Vergleich zu den Gopc<sup>wt/wt</sup>-Mäusen reduziert. Die Proteinmenge an der Oberfläche in Hippocampus und Hypothalamus war unverändert (Abbildung 5-7 B).



**Abbildung 5-7: In Gopc<sup>wt/Tm1a</sup>-Mäusen war die Proteinmenge von mGluR5 an der Zelloberfläche im Cortex und Striatum im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen reduziert.**

**A** Proben aus Zelloberflächen-Biotinylierungsexperimenten wurden mit einem mGluR5-spezifischen Antikörper analysiert. mGluR5 konnte sowohl im Input wie auch im Präzipitat detektiert werden, aber nicht in allen Gehirnregionen mit einer quantifizierbaren Intensität. **B** Quantifizierung der *Western Blot*-Daten aus A. Dargestellt ist das Verhältnis von mGluR5 im Präzipitat zum Input (Präzipitat / Input) in den Lysaten von Gopc<sup>wt/Tm1a</sup>-Mäusen bezogen auf das Verhältnis in den Lysaten von Gopc<sup>wt/wt</sup>-Mäusen in Prozent (Gopc<sup>wt/wt</sup> = 100 %). Cortex (N=6), Striatum (N=4), Hippocampus (N=5), Hypothalamus (N=4). Im Cerebellum konnte mGluR5 nicht in quantitativen Mengen detektiert werden. Die Balken stellen das arithmetische Mittel  $\pm$  SD dar; ungepaarter t-Test, 2 Seiten; Signifikanzlevel: \*  $p \leq 0,05$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$  (ns = nicht-signifikant).

Stargazin konnte im Cortex und Hippocampus detektiert werden. Die Proteinmenge an der Zelloberfläche war im Cortex von Gopc<sup>wt/Tm1a</sup>-Mäusen, im Vergleich zu den Gopc<sup>wt/wt</sup>-Mäusen, signifikant reduziert. Im Hippocampus konnte keine Veränderung beobachtet werden (Abbildung 5-8 A). Die mit Stargazin interagierende GluR1-Untereinheit des AMPA-Rezeptors konnte im Cortex und Hippocampus detektiert werden und war in beiden Regionen nicht signifikant verändert. Jedoch war die Proteinmenge von GluR1 im Cortex von Gopc<sup>wt/Tm1a</sup>-Mäusen tendenziell auf das gleiche Level wie Stargazin reduziert (Abbildung 5-8 B).



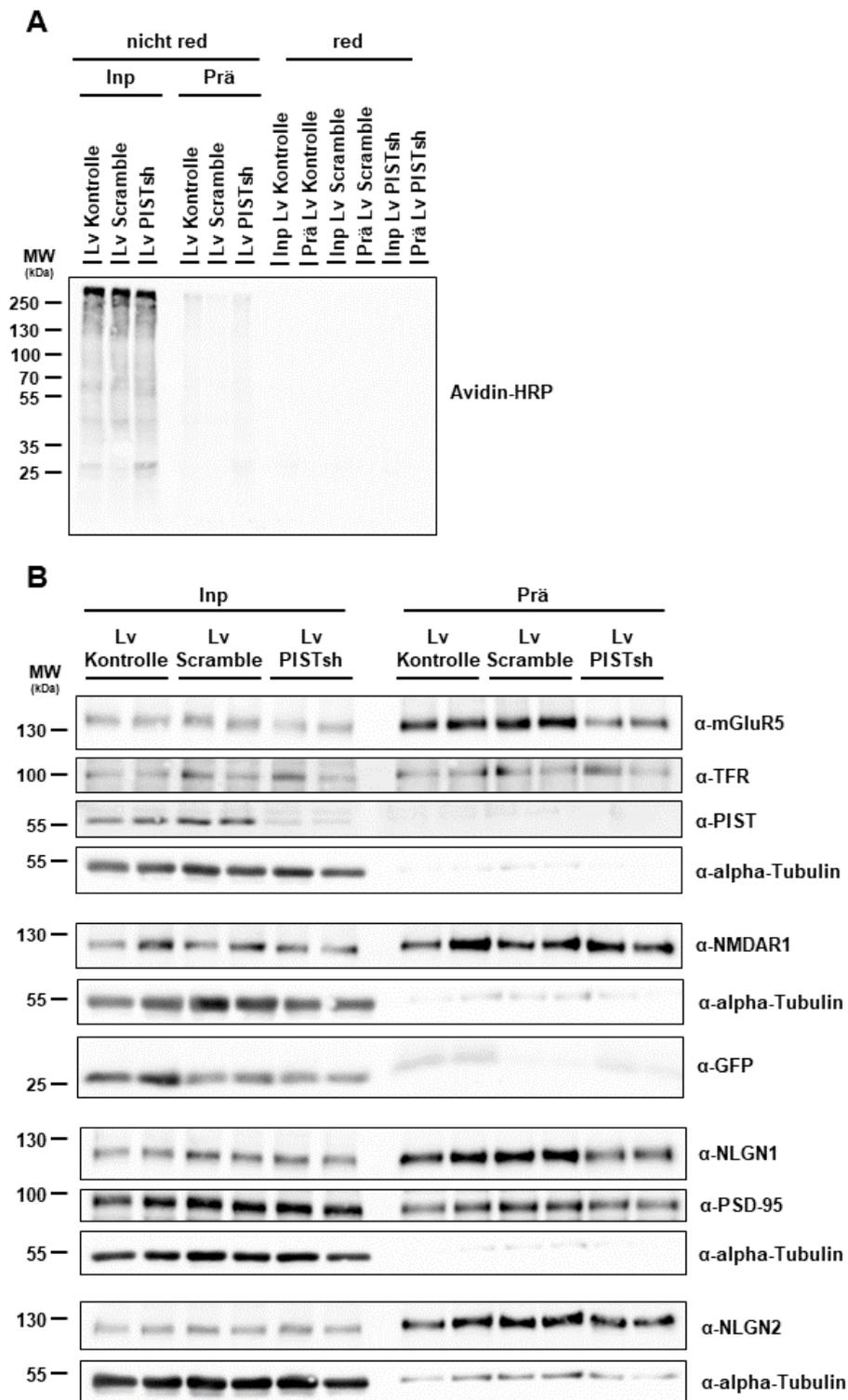
**Abbildung 5-8:** Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen waren in  $Gopc^{wt/Tm1a}$ -Mäusen die Proteinmenge von Stargazin und AMPA-Rezeptoren an der Zelloberfläche im Cortex reduziert.

Es wurde genauso verfahren wie unter Abbildung 5-7 beschrieben. Für die Detektion von Stargazin kam ein spezifischer Antikörper zum Einsatz. Für AMPA-Rezeptoren wurde ein gegen die Untereinheit GluR1 gerichteter Antikörper verwendet. Stargazin und GluR1 konnten sowohl im Input, wie auch im Präzipitat detektiert werden, allerdings nur im Cortex und Hippocampus mit einer quantifizierbaren Intensität (*Western Blot*-Daten nicht gezeigt). **A+B** Die Darstellung der *Western Blot*-Daten erfolgte wie unter Abbildung 5-7 beschrieben. A Cortex N=3, Hippocampus N=6. B Cortex N=4, Hippocampus N=4. Die Balken stellen das arithmetische Mittel  $\pm$  SD dar; ungepaarter t-Test, 2 Seiten; Signifikanzlevel: \*  $p \leq 0,05$  (ns = nicht-signifikant).

### 5.2.2 Analyse des Einflusses von PIST auf die Lokalisierung von Interaktionspartnern in primären, kultivierten, kortikalen Rattenneuronen durch Zelloberflächenbiotinylierung

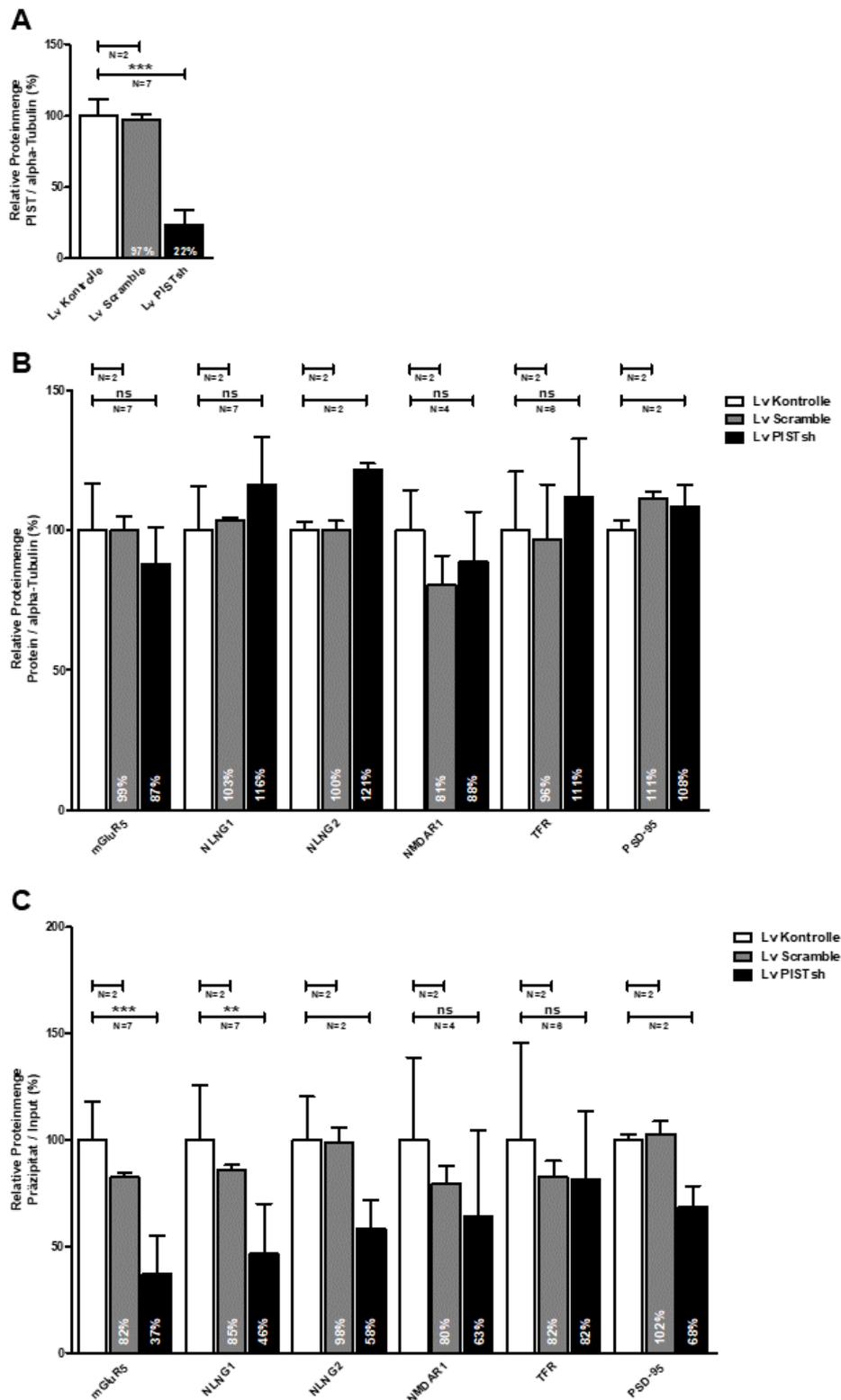
Die effiziente Reduktion von PIST in primären, kultivierten, kortikalen Rattenneuronen durch die Infektion mit lentiviralen Partikeln erlaubte es den Einfluss von PIST auf die subzelluläre Verteilung seiner Interaktionspartner ebenfalls durch Zelloberflächenbiotinylierung zu analysieren. Dazu wurden primäre, kultivierte, kortikale Rattenneurone wie oben beschrieben mit PISTsh-, PISTsh-scramble oder Kontroll-Lentivirus infiziert und an DIV 14 mit Sulfo-NHS-SS-Biotin die Zelloberflächenbiotinylierung durchgeführt. Nach der Zellyse (Input) wurden die Biotin-markierten Membranproteine durch Streptavidin-Agarose präzipitiert und anschließend durch einen reduzierenden Puffer wieder von der Agarose abgespalten (Präzipitat). Als Kontrolle für die Freisetzung wurde zusätzlich eine Probe mit nicht-reduzierendem Puffer behandelt. Die Detektion der Biotin-markierten Proteine mit einem HRP-konjugierten Avidin zeigte, dass unter nicht-reduzierenden Bedingungen nur im Input Biotin-markierte Proteine detektiert werden können, wohingegen unter reduzierenden Bedingungen sowohl im Input wie auch im Präzipitat keine Biotin-markierten Proteine detektierbar waren (Abbildung 5-9 A). Dies zeigt zum einen, dass die Biotin-Markierung von Membranproteinen effizient ablief und zum anderen die Präzipitation der Proteine von der Markierung abhängig war. Für die Kontrolle der Effizienz des PIST-*knockdown* sowie der Spezifität der Oberflächenmarkierung wurde PIST detektiert. Um den Infektionserfolg beurteilen zu können wurde GFP detektiert (Abbildung 5-9 B).

Die Infektion mit dem PISTsh-Lentivirus führte in diesen Experimenten zur Reduktion der PIST-Proteinmenge auf 22 %, im Vergleich zu Neuronen, die mit dem Kontroll- oder PISTsh-scramble-Lentivirus infiziert waren (Abbildung 5-10 A).



**Abbildung 5-9: Western Blot Analyse verschiedener Membranproteine im Input und Präzipitat nach der Zelloberflächenbiotinylierung von primären, kultivierten, kortikalen Rattenneuronen.**

**A+B** Primäre, kultivierte, kortikale Rattenneuronen wurden an DIV 7 entweder mit gleichen Mengen an transduzierenden Einheiten des PISTsh- (Lv PISTsh), Kontroll- (Lv Kontrolle) oder des PISTsh-*scramble*-Lentivirus (Lv Scramble) infiziert. An DIV 14 wurde eine Zelloberflächenbiotinylierung durchgeführt und die in der Abbildung angegebenen Proteine durch *Western Blot* unter Einsatz gleicher Proteinmengen im Input (Inp) und Präzipitat (Prä) analysiert. **A** Kontrolle der Biotin-Markierung und Freisetzung der präzipitieren Proteine durch ein HRP-konjugiertes Avidin (Avidin-HRP) im Input und Präzipitat unter nicht-reduzierenden (nicht red) und reduzierenden (red) Bedingungen. **B** Detektion der angegebenen Proteine im Input und Präzipitat unter reduzierenden Bedingungen. Die Detektion von mGluR5, NLGN1, NLGN2, TFR, PSD-95, PIST und alpha-Tubulin erfolgte durch spezifische Antikörper. Für NMDA-Rezeptoren wurde ein gegen die Untereinheit NMDAR1 gerichteter Antikörper verwendet.



**Abbildung 5-10: Der Knockdown von PIST in primären, kortikalen Rattenneuronen führte zur Reduktion der Proteinmenge einiger PIST-Interaktionspartner an der Zelloberfläche.**

Quantifizierung der Western Blot-Daten aus Abbildung 5-9. **A+B** Dargestellt ist das Verhältnis der angegebenen Proteine zu alpha-Tubulin (Protein / alpha-Tubulin; Lv Kontrolle = 100 %) **A** Quantifizierung der zellulären Proteinmenge von PIST (N=7). **B** Quantifizierung der zellulären Proteinmengen von mGluR5 (N=7), NLGN1 (N=7), NLGN2 (N=2) und NMDAR1 (N=4), TFR (N=6), und PSD-95 (N=2). **C** Quantifizierung der an der Zelloberfläche lokalisierten Proteinmengen im Präzipitat von mGluR5 (N=7), NLGN1 (N=7), NLGN2 (N=2) und NMDAR1 (N=4), TFR (N=6), und PSD-95 (N=2). Dargestellt ist Verhältnis der angegebenen Proteine im Präzipitat zu denen im Input (Präzipitat / Input; Lv Kontrolle = 100 %) Dieses Verhältnis wurde als Maß für die Proteinmenge an der Zelloberfläche angesehen. Die Balken stellen das arithmetische Mittel  $\pm$  SD dar, ungepaarter t-Test, 2 Seiten; Signifikanzlevel: \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$  (ns = nicht-signifikant).

Der *Knockdown* von PIST in Neuronen hatte keinen Einfluss auf die zellulären Proteinmengen von mGluR5, NLGN1, NLGN2, NMDAR1; ebenso waren der Transferrinrezeptor TFR (der keinen PDZ-Liganden besitzt und somit nicht durch PIST beeinflusst sein sollte) und PSD-95 im Vergleich zu Neuronen, die mit dem Kontroll- oder PISTsh-*scramble*-Lentivirus infiziert waren, unverändert (Abbildung 5-10 B).

Der *Knockdown* von PIST führte zu einer signifikanten Reduzierung der Proteinmengen von mGluR5 und NLGN1 an der Zelloberfläche von Neuronen, die Menge von NMDAR1 war nur tendenziell reduziert. Die Menge des TFR war nicht verändert. Für NLGN2 wurde eine tendenzielle Reduktion an der Zelloberfläche von Neuronen nach dem *Knockdown* von PIST detektiert. Da hierfür aber nicht genug Datenpunkte vorhanden waren, konnte kein statistischer Test durchgeführt werden (Abbildung 5-10 C).

PSD-95 ist ein Gerüstprotein der PSD, das mehrere PDZ-Domänen besitzt und auch mit einigen der Interaktionspartner von PIST interagieren kann. Da die Reduzierung der Proteinmenge einiger Interaktionspartner an der Zelloberfläche, bedingt durch den PIST-*knockdown*, auch die Menge an PSD-95, das mit diesen Membranproteinen co-präzipitiert, verändern könnte, wurde dieses Protein ebenfalls detektiert. Es zeigte sich hier jedoch nur eine leichte Reduzierung.

### 5.3 Analyse des Einflusses von PIST auf Signalwege im zentralen Nervensystem

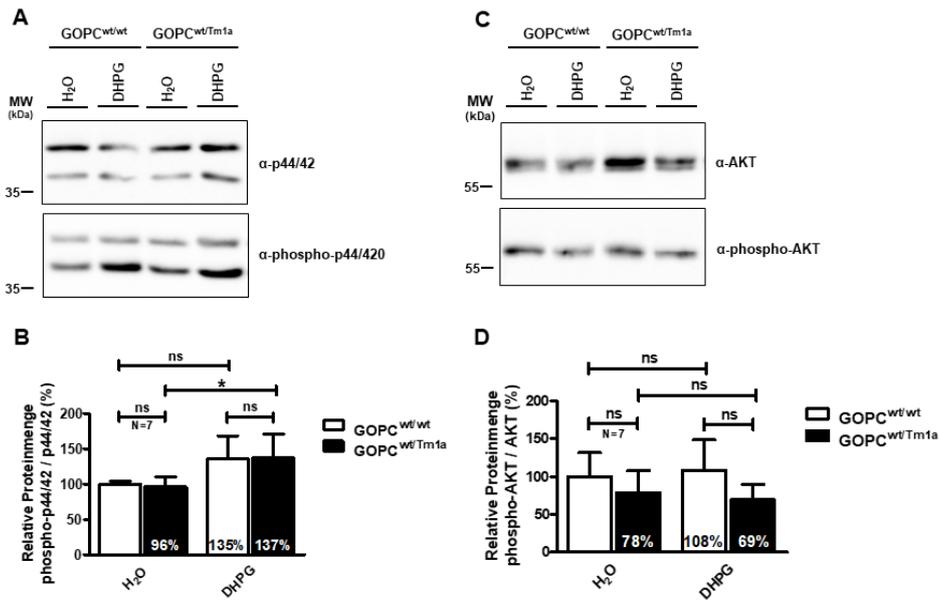
Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Reduktion der Verfügbarkeit von Rezeptoren an der Zelloberfläche sich auch in der Aktivität der von diesen Rezeptoren aktivierten Signalwege widerspiegelt. Dazu wurden Stimulationsexperimente an akuten Hippocampusschnitten von Wildtyp- ( $Gopc^{wt/wt}$ ) und heterozygoten PIST *knockout*-Mäusen ( $Gopc^{wt/Tm1a}$ ) aus der *knockout-first*-Mauslinie (C57BL/6- $Gopc^{Tm1a}$ ) durchgeführt. Die Aktivität des ras/raf/MAP- und AKT-Kinase Signalwegs wurde nach Behandlung von akuten Hippocampusschnitten mit DHPG (Osterweil *et al.* 2012) oder Forskolin und Rolipram (Otmakhov *et al.* 2004) analysiert.<sup>[118,119]</sup>

Für DHPG ist bekannt, dass die Applikation dieses selektiven Agonisten des metabotropen Glutamaterezeptors mGluR5 genutzt werden kann, um LTD in Synapsen chemisch zu induzieren. LTD ist eine experimentell messbare Form der synaptischen Plastizität. Durch Aktivierung von mGluR5 wird die Aktivität der nachgeschalteten PI3K- und MAPK-Signalwege moduliert. Dadurch wird die Synthese synaptischer Proteine gefördert, was einen Einfluss auf die Plastizität der Synapse hat.<sup>[118]</sup> Hingegen wurde für Forskolin und Rolipram gezeigt, dass die Applikation beider Substanzen zu einer durch NMDA-Rezeptoren induzierten LTP führt, einer weiteren Form der synaptischen Plastizität. Forskolin ist ein Aktivator der Adenylatcyclase, durch den die Menge an intrazellulärem cAMP gesteigert wird. Rolipram ist ein Inhibitor der Phosphodiesterase, durch den der Abbau von cAMP

verhindert wird. Der durch die Kombination der beiden Substanzen vermittelte Anstieg der cAMP-Konzentration moduliert nachgeschaltete Signalwege, wodurch LTP induziert werden kann. Dies setzt jedoch voraus, dass bei der Applikation Bedingungen vorherrschen, bei denen NMDA-Rezeptoren nicht blockiert sind.<sup>[119]</sup>

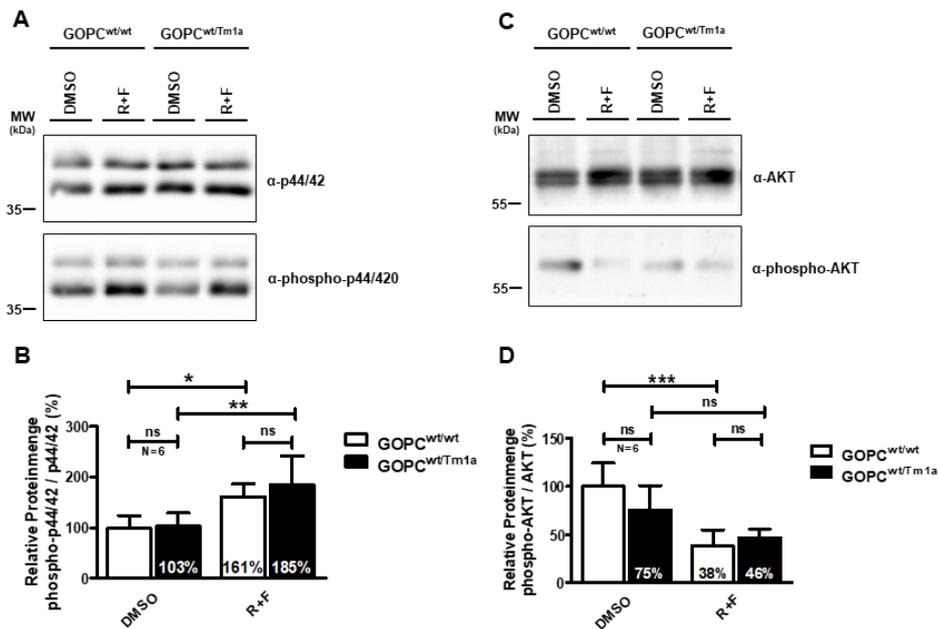
Für die Analyse wurden aus den Gehirnen von vier bis sechs Wochen alten Wildtyp- ( $Gopc^{wt/wt}$ ) und heterozygoten PIST *knockout*-Mäusen ( $Gopc^{wt/Tm1a}$ ) aus der *knockout-first*-Mauslinie (C57BL/6- $Gopc^{Tm1a}$ ) 300  $\mu$ m dicke koronale Gewebeschnitte angefertigt. Nach einer mehrstündigen Erholungszeit wurden die Schnitte im Puffer-Bad mit DHPG oder mit Rolipram und Forskolin behandelt. Zur Kontrolle wurde ein Teil der Schnitte nur mit dem Lösungsmittel der jeweiligen Stimulanzen behandelt. Die Applikation der Substanzen im Puffer-Bad hat, gegenüber der elektrischen Stimulation den Vorteil, dass eine Vielzahl an Synapsen der Hippocampusschnitte beeinflusst werden kann. Dadurch werden LTP oder LTD in einer Vielzahl der Synapsen induziert, so dass die molekularen Veränderungen in den Synapsen einer biochemischen Analyse zugänglich gemacht werden. Nach dem Angleichen der Proteinmengen in den Lysaten wurde die Aktivität des MAP- und AKT-Kinase-Signalwegs im *Western Blot* quantifiziert. Dazu wurden Antikörper gegen die phosphorylierten/aktiven Formen der Proteinkinasen ERK (p44/42) und AKT eingesetzt. Der Quotient aus den Signalintensitäten von phospho-ERK zu ERK bzw. phospho-AKT zu Akt diente als Maß für die Aktivität von ERK und AKT (Abbildung 5-11 und 5-12).

Die Reduktion der PIST-Proteinmenge in  $Gopc^{wt/Tm1a}$ -Mäusen auf ca. 50 % der Menge im Wildtyp hatte keinen Einfluss auf die basale Phosphorylierung von ERK in unbehandelten Hippocampusschnitten. Nach der Behandlung mit DHPG oder mit Rolipram und Forskolin konnte in beiden Fällen eine erhöhte Menge an phospho-ERK in Neuronen detektiert werden. In der Aktivität von ERK wurde kein Unterschied zwischen  $Gopc^{wt/Tm1a}$ -Mäusen und Wildtyp-Tieren beobachtet. (Abbildung 5-11 A+B und 5-12 A+B). Für die Phosphorylierung von AKT hingegen wurde unter basalen Bedingungen eine leichte Reduktion der Aktivität von AKT in  $Gopc^{wt/Tm1a}$ -Mäusen beobachtet (Abbildung 5-11 C+D und 5-12 C+D). Die Behandlung mit DHPG hatte keinen Einfluss auf die phospho-Akt Menge in Hippocampusschnitten von Wildtyp- sowie  $Gopc^{wt/Tm1a}$ -Mäusen (Abbildung 5-11 D). Im Gegensatz zur DHPG Behandlung, führte die Behandlung mit Rolipram und Forskolin zu einer Reduktion der phospho-Akt Menge in Hippocampusschnitten. Hier wurde kein Unterschied in der Reduktion zwischen den Schnitten von Wildtyp- und  $Gopc^{wt/Tm1a}$ -Mäusen detektiert (Abbildung 5-12 C+D).



**Abbildung 5-11: Die Aktivität der AKT-Proteinkinase war unter basalen Bedingungen und der Behandlung mit DHPG in *Gopc<sup>wt/Tm1a</sup>*-Mäusen, im Vergleich zum Wildtyp, tendenziell leicht reduziert.**

**A+C** Koronale Gewebeschnitte aus dem Hippocampus von Wildtyp- (*Gopc<sup>wt/wt</sup>*) und heterozygoten *knockout*-Mäusen (*Gopc<sup>wt/Tm1a</sup>*) wurden entweder nur mit dem Lösungsmittel H<sub>2</sub>O oder mit DHPG behandelt. Anschließend wurde die Aktivität des ERK- und AKT-Signalweges durch *Western Blot* unter Einsatz spezifischer Antikörper für die Proteinkinasen ERK (p44/22) (A) und AKT (C) sowie deren aktiveren phosphorylierteren Formen verwendet. **B+D** Quantifizierung der *Western Blot*-Daten aus A bzw. C. Dargestellt ist das Verhältnis von phospho- ERK bzw. phospho-AKT zu ERK bzw. AKT (phospho-p44/42 / p44/42 bzw. phospho-AKT / AKT) von behandelten und unbehandelten Schnitten bezogen auf das Verhältnis der unbehandelten Schnitte von *Gopc<sup>wt/wt</sup>*-Mäusen in Prozent (*Gopc<sup>wt/wt</sup>* H<sub>2</sub>O-Behandlung = 100 %). Die Balken stellen das arithmetische Mittel  $\pm$  SD dar; *one-way* ANOVA mit *post-hoc* Vergleich nach Tukey, N=7; Signifikanzlevel: \*  $p \leq 0,05$  (ns = nicht-signifikant).

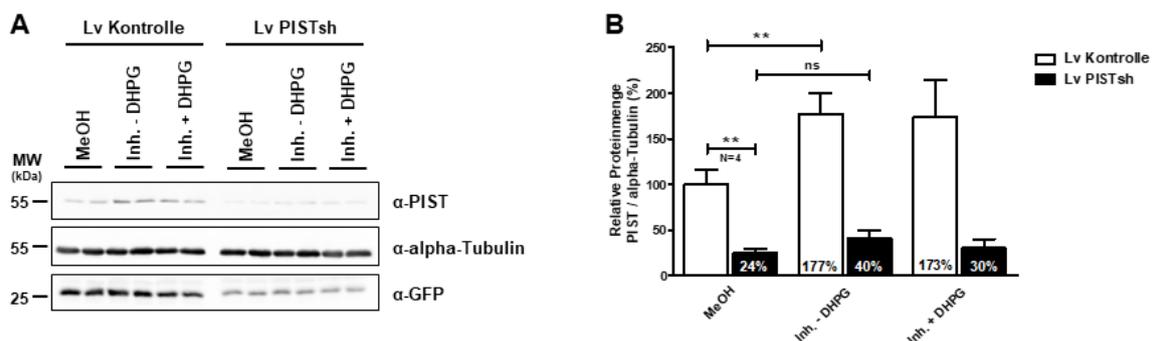


**Abbildung 5-12: Die Aktivität von ERK und AKT war nach der Behandlung mit Rolipram und Forskolin in *Gopc<sup>wt/Tm1a</sup>*-Mäusen, im Vergleich zum Wildtyp, unverändert.**

Koronale Gewebeschnitte aus dem Hippocampus wurden mit Rolipram und Forskolin (R+F) stimuliert oder nur mit dem Lösungsmittel der Stimulanzien (2,5  $\mu$ L / mL DMSO) behandelt; die Messung der Aktivität der Proteinkinasen ERK (p44/42) und AKT erfolgte wie unter Abbildung 5-11 beschrieben. **A+C** *Western Blot*-Analyse. **B+D** Die Quantifizierung erfolgte wie unter Abbildung 5-11 beschrieben. Die Balken stellen das arithmetische Mittel  $\pm$  SD dar; *one-way* ANOVA mit *post-hoc* Vergleich nach Tukey, N=7; Signifikanzlevel: \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$  (ns = nicht-signifikant).

Ähnliche Stimulationsexperimente wurden nach lentiviralem *Knockdown* von PIST auch in kultivierten Neuronen aus dem Cortex von Ratten durchgeführt. In Bezug auf den metabotropen Rezeptor mGluR5 wurde die selektive Aktivierung durch DHPG untersucht. Dazu wurden die Neuronen an DIV 7 entweder mit PISTsh- oder Kontroll-Lentivirus infiziert und an DIV 14 zunächst für vier Stunden mit einem Inhibitorgemisch, bestehend aus TTX (blockiert spannungsaktivierte Natriumkanäle), CNQX (ein kompetitiver AMPA/Kainat-Rezeptor-Antagonist), AP-5 (ein kompetitiver NMDA-Rezeptor-Antagonist) und Nimodipin (blockiert Calciumkanäle) behandelt. Dies ist notwendig, um selektiv nur die mGluR5 Aktivierung zu detektieren. Anschließend wurde ein Teil der infizierten Neuronen für fünf Minuten mit dem selektiven mGluR5 Agonisten DHPG behandelt. Um die basale Aktivität der Signalwege bestimmen zu können wurde zusätzlich ein weiterer Teil der infizierten Neuronen mit Methanol (MeOH) behandelt (das Lösungsmittel in dem Nimodipin gelöst war). Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Proteinmengen in den Lysaten einander angeglichen. Um den Infektionserfolg und die Effizienz des PIST-*knockdown* beurteilen zu können wurde durch *Western Blot* neben GFP die Proteinmenge von PIST in Relation zum Haushaltsprotein alpha-Tubulin bestimmt (Abbildung 5-13 A).

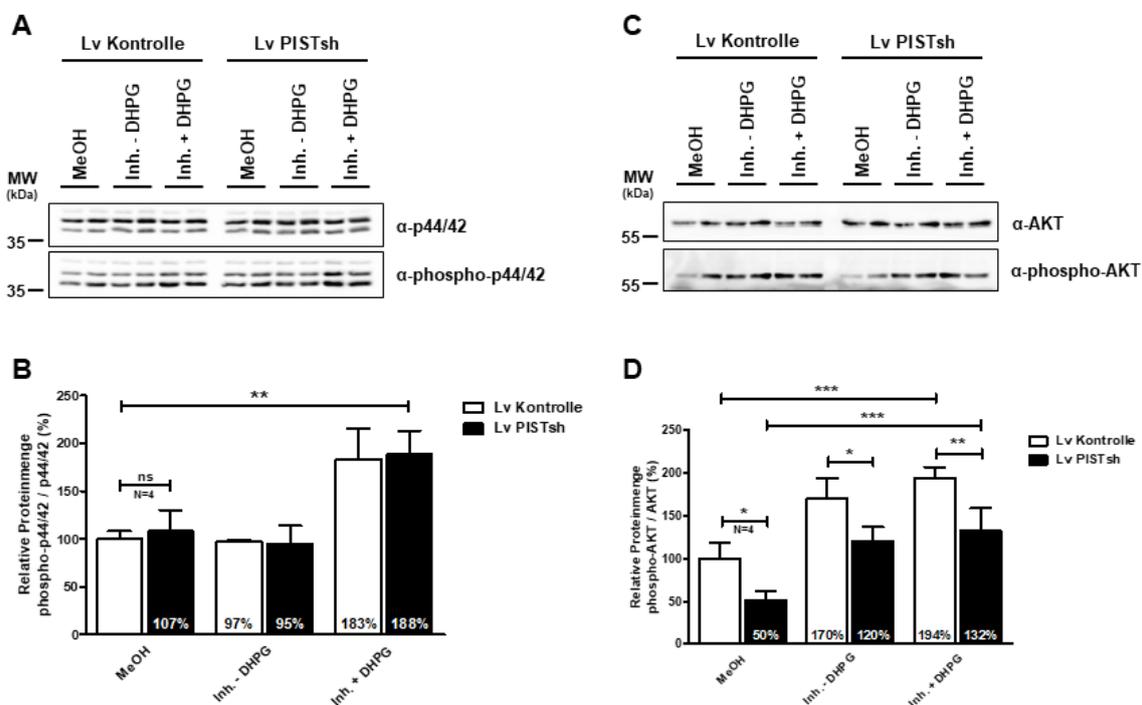
Der lentivirale Knockdown führte hier zu einer Reduzierung der PIST-Proteinmenge auf ca. 24 %, im Vergleich zu Neuronen, die mit dem Kontroll-Lentivirus infiziert waren. Weiterhin wurde beobachtet, dass die Behandlung der Neuronen nur mit dem Inhibitorgemisch zu einer erhöhten PIST-Proteinmenge im Vergleich zu unbehandelten Zellen führte. Die zusätzliche Behandlung mit DHPG hatte keinen weiteren Effekt auf die PIST-Menge in inhibierten Neuronen (Abbildung 5-13 B).



**Abbildung 5-13: Die Behandlung von primären, kortikalen Rattenneuronen mit dem Inhibitorgemisch führte zu einer erhöhten Proteinmenge von PIST.**

**A** Primäre, kultivierte, kortikale Rattenneuronen wurden an DIV 7 entweder mit gleichen Mengen an PISTsh- (Lv PISTsh) oder Kontroll-Lentivirus (Lv Kontrolle) infiziert. An DIV 14 wurden die Neuronen zunächst für 4 Stunden mit den Inhibitoren TTX (1  $\mu$ M), CNQX (40  $\mu$ M), AP-5 (100  $\mu$ M) und Nimodipin (5  $\mu$ M) behandelt (Inh. -DHPG), anschließend wurde ein Teil der behandelten Neuronen für 5 Minuten mit 100  $\mu$ M DHPG behandelt (Inh. + DHPG). Kontrollneuronen wurden nur mit 2  $\mu$ L / mL MeOH behandelt (dem Lösungsmittel, in dem Nimodipin gelöst war). Nach der Lyse der Zellen wurden die Proteinmengen von PIST, GFP und alpha-Tubulin durch *Western Blot*, unter Einsatz gleicher Proteinkonzentrationen, analysiert. **B** Quantifizierung der *Western Blot* Daten aus A. Dargestellt ist das Verhältnis PIST / alpha-Tubulin, bezogen auf das Verhältnis von unbehandelten Neuronen, die mit dem Kontroll-Lentivirus infiziert waren, in Prozent (Lv Kontrolle = 100 %). Die Balken stellen das arithmetische Mittel  $\pm$  SD dar; *one-way* ANOVA mit *post-hoc* Vergleich nach Tukey, N=4; Signifikanzlevel: \*\*  $p \leq 0,01$  (ns = nicht-signifikant).

Die Analyse der Aktivität der ras/raf/MAP- und AKT-Kinase-Signalwege erfolgte wieder durch *Western Blot*, unter Einsatz gleicher Proteinkonzentrationen, mit spezifischen Antikörpern für ERK (p44/42) und AKT sowie deren phosphorylierten Formen (Abbildung 5-14 A und 5-14 C). Hierbei konnte beobachtet werden, dass der *Knockdown* von PIST keinen Einfluss auf die basale Phosphorylierung sowie auf die Aktivität von ERK nach der Behandlung mit DHPG hatte (Abbildung 5-14 B). Im Gegensatz dazu führte der PIST-*knockdown* in Neuronen zu einer signifikant um 50 % verminderten basalen Aktivität von AKT, im Vergleich zur Kontrolle. Die Behandlung von Neuronen mit DHPG hatte keinen Einfluss auf die Aktivität von AKT. Durch die Inhibitorbehandlung war die Menge der phosphorylierten, aktivierten AKT-Proteinkinase erhöht (Abbildung 5-14 D).

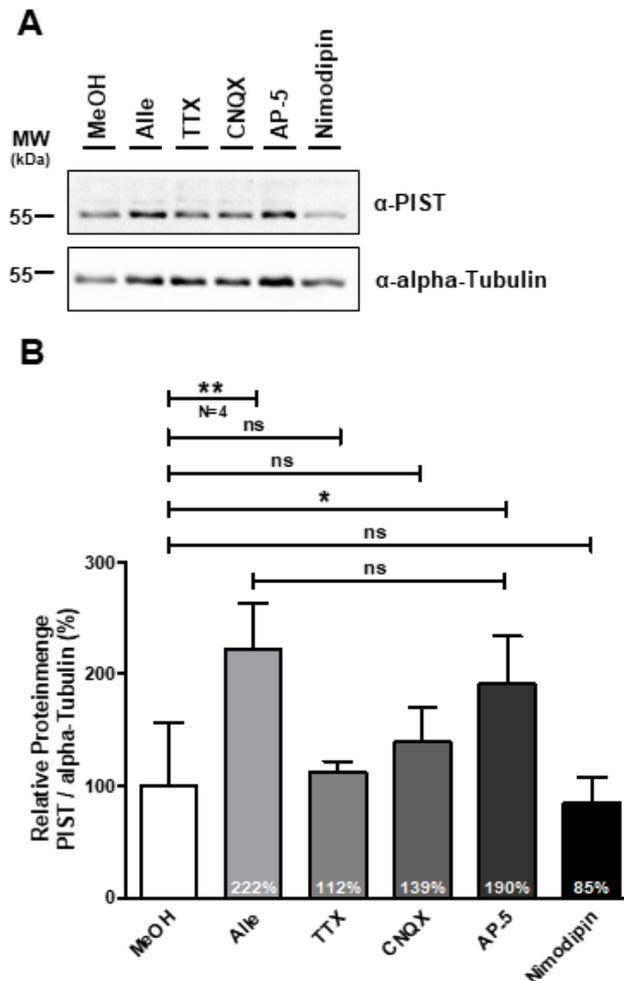


**Abbildung 5-14: ERK- und AKT-Aktivität in primären, kortikalen Neuronen nach PIST-*knockdown*.**

**A+C** Nach lentiviralem PIST-*knockdown* wurden die Neuronen mit den Inhibitoren sowie anschließend mit DHPG behandelt; die Aktivität von ERK und Akt wurde wie in Abbildung 5-11 beschrieben im *Western Blot* analysiert. **B+D** Quantifizierung der *Western Blot* Daten aus A bzw. C. Dargestellt ist das Verhältnis von ERK bzw. AKT zu phospho-ERK bzw. phospho-AKT (phospho-p44/42/p44/42 bzw. phospho-AKT/AKT) normalisiert auf das Verhältnis in unbehandelten Zellen (Lv Kontrolle MeOH-Behandlung = 100 %). Die Balken stellen das arithmetische Mittel  $\pm$  SD dar; *one-way ANOVA* mit *post-hoc* Vergleich nach, N=4; Signifikanzlevel: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$  (ns = nicht-signifikant).

Der Einfluss der Inhibitorbehandlung auf die zelluläre Gesamtmenge von PIST in Neuronen war sehr interessant, da hier zum ersten Mal ein Hinweis auf eine Regulation von PIST beobachtet werden konnte. Um diesen Effekt genauer zu untersuchen, wurde zunächst analysiert, welcher der verwendeten Inhibitoren dazu führte, dass die Proteinmenge von PIST erhöht war. Dafür wurden die Neuronen an DIV14 entweder mit dem Inhibitorgemisch oder mit den einzelnen Inhibitoren behandelt. Zum Vergleich dienten mit MeOH (dem Lösungsmittel von Nimodipin) behandelte Neuronen. Anschließend wurden die Neuronen lysiert und die Proteinkonzentration in den Lysaten einander angeglichen. Die

Quantifizierung der PIST-Proteinmenge in den Lysaten erfolgte wie zuvor beschrieben durch *Western Blot* (Abbildung 5-15 A). Hier wurde ersichtlich, dass AP-5 für die erhöhte PIST-Menge verantwortlich war. Im Vergleich zu unbehandelten Neuronen war nur nach der AP-5-Behandlung, genauso wie nach der Behandlung mit allen Inhibitoren, die Menge an PIST signifikant erhöht (Abbildung 5-15 B).

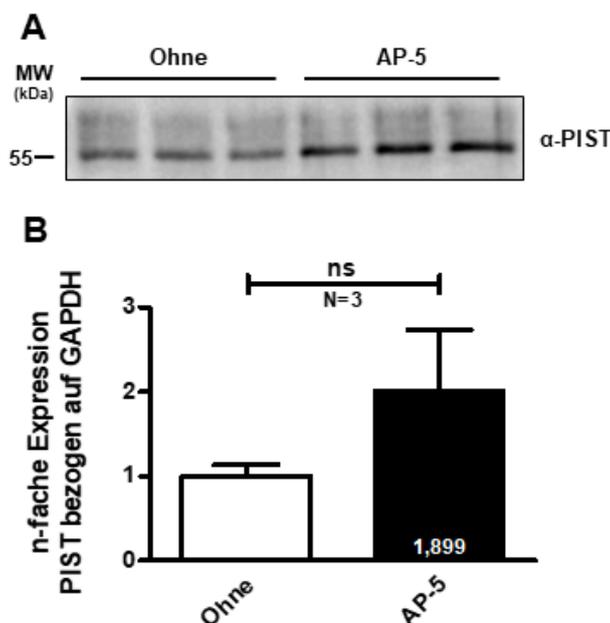


**Abbildung 5-15: Die Behandlung mit AP-5 führte zu einer erhöhten Proteinmenge von PIST in Neuronen.**

**A** Primäre, kortikale Ratteneuronen wurden an DIV 14 für vier Stunden entweder mit dem Inhibitorgemisch (1  $\mu$ M TTX, 40  $\mu$ M CNQX, 100  $\mu$ M AP-5 und 5  $\mu$ M Nimodipin) oder mit den einzelnen Inhibitoren behandelt. Zum Vergleich wurden Neuronen mit 2  $\mu$ L / mL MeOH (dem Lösungsmittel von Nimodipin) behandelt. Nach der Behandlung wurden die Zellen lysiert und PIST und  $\alpha$ -Tubulin im *Western Blot* detektiert. **B** Quantifizierung der *Western Blot*-Daten aus **A** (MeOH-Behandlung = 100 %). Die Balken stellen das arithmetische Mittel  $\pm$  SD dar; *one-way* ANOVA mit *post-hoc* Vergleich nach Tukey, N=4; Signifikanzlevel: \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  (ns = nicht-signifikant).

Die beobachtete Erhöhung der PIST-Proteinmenge in Neuronen durch die AP-5-Behandlung kann durch verschiedene Mechanismen hervorgerufen worden sein. Die Inhibierung der NMDA-Rezeptoren durch AP-5 könnte einen Einfluss auf die Stabilität von PIST haben, oder auf transkriptioneller oder translationaler Ebene einen Effekt ausüben. Um eine mögliche Änderung der PIST-mRNA zu untersuchen, wurde, durch quantitative *real time*-PCR (Echtzeit-PCR), die auf ein Referenzgen normierte mRNA-Expression des PIST-Gens (*Gopc*) in Neuronen nach AP-5 Behandlung bestimmt.

Dafür wurden mit AP-5 behandelte Neuronen lysiert und nach dem Angleichen der Proteinkonzentrationen der Erfolg der AP-5-Behandlung durch Detektion der Menge an PIST in den Lysaten im *Western Blot* kontrolliert (Abbildung 5-16 A). Aus dem anderen Teil der behandelten Neurone wurde zunächst die gesamte mRNA isoliert und diese durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde mit der cDNA als *Template* mit Fluorophor-markierten TaqMan-Sonden für das Transkript von *Gopc* sowie als Referenz für das Transkript der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*Gapdh*) eine *real time*-PCR durchgeführt. Die *real time*-PCR erlaubt eine Quantifizierung der Menge der jeweiligen mRNA durch Bestimmung des *threshold cycle*-Wertes; dies ist der Zyklus, bei dem die Menge des gebildeten PCR-Produktes einen bestimmten Schwellenwert überschreitet ( $C_T$ -Wert). Dadurch wurde hier die relative PIST mRNA-Menge in unbehandelten und AP-5 behandelten Neuronen bestimmt (Abbildung 5-16 B).



**Abbildung 5-16: Die Behandlung von primären, kortikalen Rattenneuronen mit AP-5 führte zu einer 1,9-fach stärkeren mRNA-Expression des PIST-Gens.**

**A+B** Primäre, kortikale Rattenneuronen wurden an DIV 14 für 4 Stunden mit AP-5 behandelt (Kontrolle: nur Lösungsmittel H<sub>2</sub>O). **A** Ein Teil der Neuronen wurde lysiert und zur Kontrolle des Behandlungserfolges die Proteinmenge von PIST in den Lysaten durch *Western Blot*, unter Einsatz gleicher Proteinkonzentrationen, beurteilt. Für die Detektion von PIST wurde ein spezifischer Antikörper verwendet. **B** Aus dem anderen Teil der Neuronen wurde die gesamte RNA isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde mit der cDNA als *Template* und Fluorophor-markierten TaqMan-Sonden für das Transkript des von *Gopc* (PIST wird durch das *Gopc*-Gen kodiert) und des Gens der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*Gapdh*), als Referenz, eine *real time*-PCR durchgeführt. Die Quantifizierung der n-fachen PIST mRNA-Expression erfolgte durch die dd $C_T$ -Methode. Die Balken stellen das arithmetische Mittel  $\pm$  SD dar; ungepaarter t-Test, 2 Seiten, N=3 (ns = nicht-signifikant).

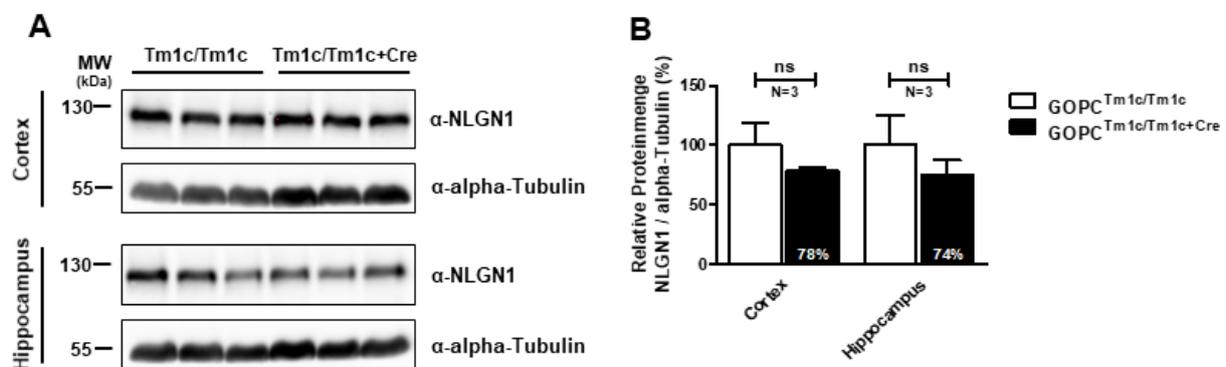
Die relative PIST mRNA-Expression war in AP-5 behandelten Neuronen, im Vergleich zu unbehandelten Neuronen, tendenziell um das ca. 1,9-Fache erhöht (Abbildung 5-16 B). Dieser Anstieg entsprach in etwa der beobachteten Erhöhung der PIST-Proteinmenge in mit AP-5 behandelten Neuronen (Abbildung 5-15). Allerdings war, vermutlich aufgrund der relativ geringen Zahl der durchgeführten Experimente, der Unterschied nicht statistisch signifikant.

## 5.4 Analyse des Einflusses von PIST in konditionalen, gehirnspezifischen PIST *knockout*-Mäusen

### 5.4.1 Analyse des Einflusses von PIST auf die Stabilität von Interaktionspartnern

Da ein Einfluss von PIST auf die Stabilität einiger seiner Interaktionspartner vorgeschlagen wurde, wurde hier analysiert, ob der Verlust von PIST in Neuronen des Vorderhirns von konditionalen PIST *knockout*-Mäusen einen Einfluss auf die Proteinmenge von verschiedenen Interaktionspartnern hat. Dafür wurden die Menge von mGluR5, NLGN1, NMDA-Rezeptoren, Stargazin und AMPA-Rezeptoren in Gewebelysaten von konditionalen PIST *knockout*-Mäusen, wie zuvor beschrieben (Abschnitt 5.1.1), durch *Western Blot* analysiert. AMPA-Rezeptoren interagieren zwar nicht direkt mit PIST, jedoch wird eine Interaktion durch Stargazin vermittelt. Stargazin ist dafür bekannt AMPA-Rezeptoren in der PSD zu verankern.<sup>[50]</sup> Die Abbildung 5-17 A zeigt exemplarisch anhand von NLGN1 die Detektion der Proteine in den Gewebelysaten.

Die Quantifizierung der Signale für NLGN1 (Abbildung 5-17 B) sowie der anderen analysierten Proteine (Abbildung 5-18 A bis F) zeigte, dass die Proteinmengen in den Gehirngewebelysaten der konditionalen *knockout*-Mäuse ( $Gopc^{Tm1c/Tm1c+Cre}$ ) im Vergleich zu den Lysaten der Kontrolltiere ( $Gopc^{Tm1c/Tm1c}$ ), unverändert war.

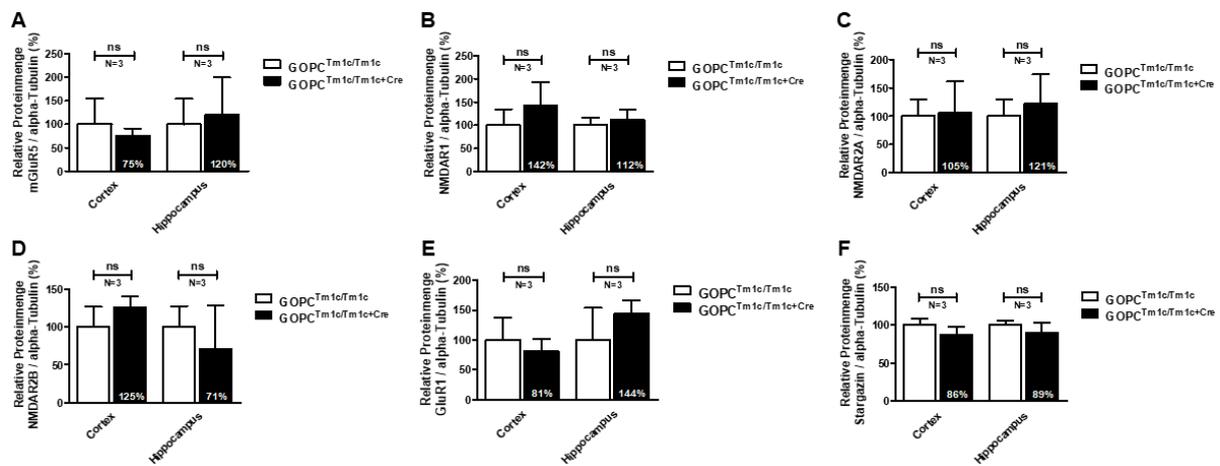


**Abbildung 5-17: Die zelluläre Menge von NLGN1 war im Cortex und Hippocampus von  $Gopc^{Tm1c/Tm1c+Cre}$ -Mäusen unverändert.**

**A** Lysate aus Cortex und Hippocampus wurden im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen NLGN1 und alpha-Tubulin analysiert. **B** Quantifizierung der *Western Blot*-Daten aus A. Dargestellt ist das Verhältnis NLGN1 / alpha-Tubulin in den Lysaten von  $Gopc^{Tm1c/Tm1c+Cre}$ -Mäusen, bezogen auf das Verhältnis in den Lysaten von  $Gopc^{Tm1c/Tm1c}$ -Mäusen in Prozent ( $Gopc^{Tm1c/Tm1c} = 100\%$ ). Die Balken stellen das arithmetische Mittel ± SD dar; ungepaarter t-Test; 2 Seiten, N=3 (ns = nicht-signifikant).

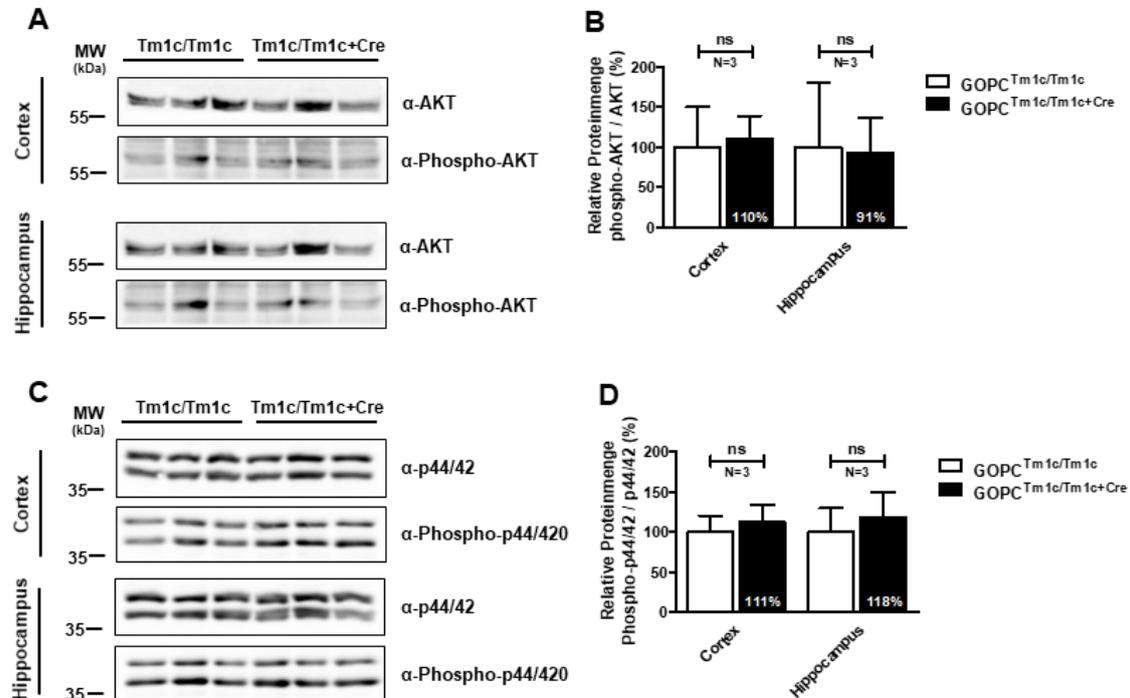
Neben der Proteinmenge der mit PIST assoziierten Rezeptoren, wurde auch die Aktivität verschiedener Signalwege in konditionalen homozygoten PIST *knockout*-Mäusen gemessen. Dazu wurden in Cortex- und Hippocampuslysaten von  $Gopc^{Tm1c/Tm1c+Cre}$ -Mäusen und Kontrolltieren die Aktivität dieser Signalwege im *Western Blot* analysiert. Wie oben beschrieben wurde die Menge der phosphorylierten Proteinkinasen ERK oder AKT in Relation zu der gesamten Proteinmenge von ERK oder AKT gesetzt. Hierbei zeigte sich, dass die Phosphorylierung von ERK und AKT in Cortex- und Hippocampuslysaten von

Gopc<sup>Tm1c/Tm1c+Cre</sup>-Mäusen, im Vergleich zu Gopc<sup>Tm1c/Tm1c</sup>-Mäusen, unverändert war (Abbildung 5-19).



**Abbildung 5-18: Die zelluläre Proteinmenge verschiedener PIST-Interaktionspartner war in Cortex- und Hippocampuslysaten von Gopc<sup>Tm1c/Tm1c+Cre</sup>-Mäusen unverändert.**

**A-F** Es wurde genauso verfahren wie unter Abbildung 5-17 beschrieben. Für die Detektion von mGluR5 (A) und Stargazin (F) kam ein spezifischer Antikörper zum Einsatz. Für die Detektion von NMDAR-Rezeptoren wurden spezifische Antikörper für die Untereinheiten NMDAR1 (B), NMDAR2A (C) und NMDAR2B (D) verwendet. Die Detektion von AMPA-Rezeptoren erfolgte durch einen Antikörper gegen die Untereinheit GluR1 (E). *Western Blot*-Daten nicht gezeigt. Dargestellt ist das Verhältnis von den angegebenen Proteinen zu alpha-Tubulin (Protein / alpha-Tubulin) in den Lysaten von Gopc<sup>Tm1c/Tm1c+Cre</sup>-Mäusen, bezogen auf das Verhältnis in den Lysaten von Gopc<sup>Tm1c/Tm1c</sup>-Mäusen, in Prozent (Gopc<sup>Tm1c/Tm1c</sup> = 100 %). Die Balken stellen das arithmetische Mittel  $\pm$  SD dar; ungepaarter t-Test, 2 Seiten, N=3 (ns = nicht-signifikant).

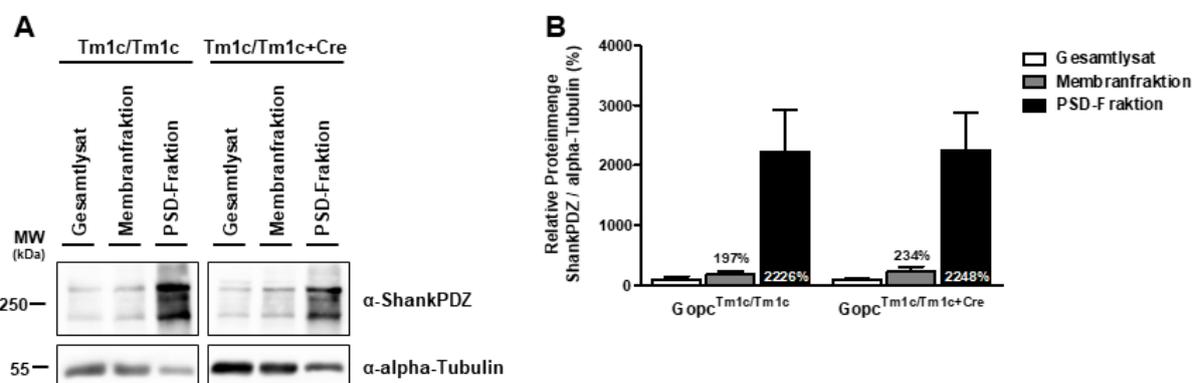


**Abbildung 5-19: Die Aktivität der Proteinkinasen ERK und AKT waren in Cortex- und Hippocampuslysaten von Gopc<sup>Tm1c/Tm1c+Cre</sup>-Mäusen unverändert.**

**A+C** Für die Detektion von der Proteinkinasen ERK (p44/22) (C) und AKT (A) sowie deren aktiver phosphorylierter Form wurden spezifische Antikörper verwendet. **B+D** Quantifizierung der *Western Blot*-Daten aus A bzw. C. Dargestellt ist das Verhältnis von ERK bzw. AKT zu phospho-ERK bzw. phospho-AKT (phospho-p44/42 / p44/42 bzw. phospho-AKT / AKT) in Gewebelysaten von Gopc<sup>Tm1c/Tm1c+Cre</sup>-Mäusen, bezogen auf das Verhältnis von Gopc<sup>Tm1c/Tm1c</sup>-Mäusen, in Prozent (Gopc<sup>Tm1c/Tm1c</sup> = 100 %). Das Verhältnis aus den Signalintensitäten von phospho-ERK zu ERK bzw. phospho-AKT zu Akt wurde als Maß für die Aktivität von ERK und AKT angesehen. Die Balken stellen das arithmetische Mittel  $\pm$  SD dar; ungepaarter t-Test; 2 Seiten, N=3 (ns = nicht-signifikant).

## 5.4.2 Analyse des Einflusses von PIST auf die Lokalisierung von einigen Interaktionspartnern

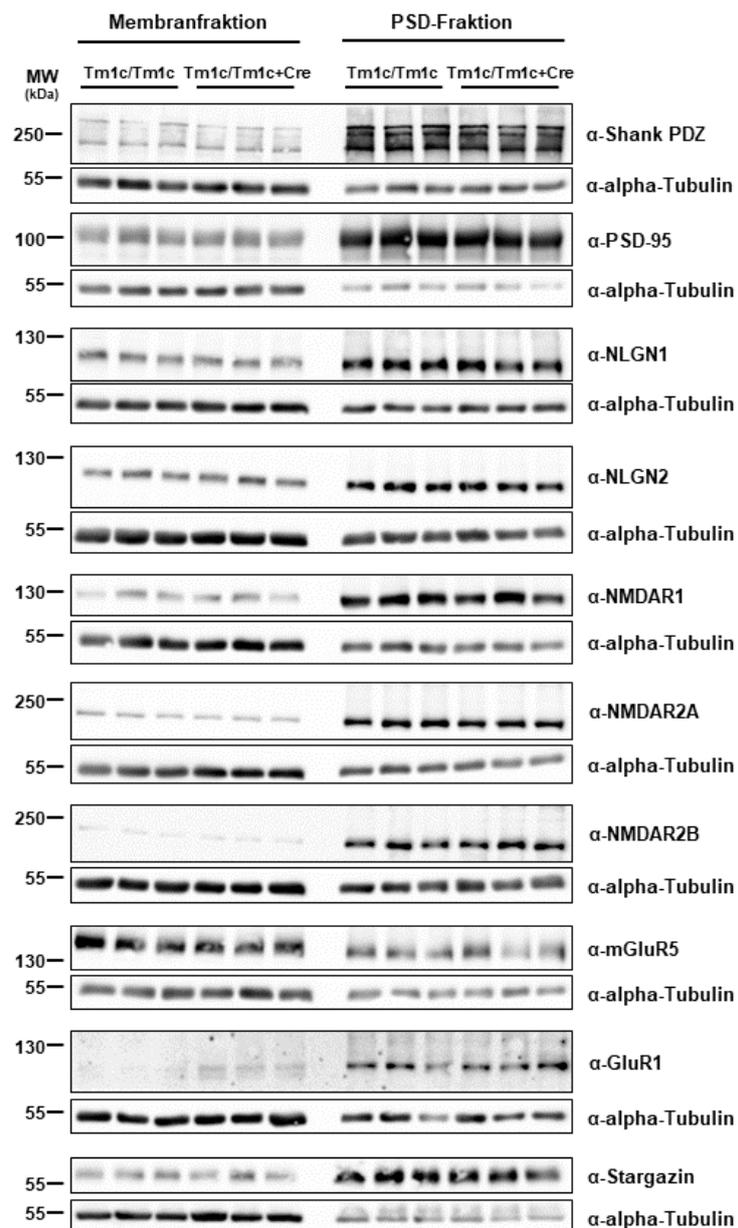
Neben dem Einfluss von PIST auf die Stabilität von einigen Interaktionspartnern wurde auch beschrieben, dass PIST an der Steuerung der subzellulären Verteilung von einigen wichtigen Membranproteinen der glutamatergen Synapsen beteiligt ist.<sup>[50,109]</sup> Daher wurde die Zusammensetzung der PSD im Vorderhirn von konditionalen PIST *knockout*-Mäusen analysiert. Hierfür wurden die Gehirne von adulten konditionalen *knockout*-Mäusen ( $Gopc^{Tm1c/Tm1c+Cre}$ ) und entsprechenden Kontrolltieren ( $Gopc^{Tm1c/Tm1c}$ ) isoliert und die Vorderhirne nach dem Abtrennen des Cerebellums sowie des Hirnstamms für die Präparation der PSD verwendet. Bei der PSD-Präparation wird die geringe Löslichkeit dieses Proteinnetzwerkes ausgenutzt, um dieses gezielt durch Dichtegradientenzentrifugation anzureichern. Bei diesem mehrstufigen Prozess wurden verschiedene zelluläre Fraktionen generiert. Um den Erfolg der PSD-Anreicherung zu beurteilen, wurde das Gesamtlysate, die Membranfraktion und die PSD-Fraktion im *Western Blot* auf die Menge des Gerüstproteins Shank untersucht. Für die Detektion von Shank wurde ein Antikörper verwendet, der gegen die in allen Isoformen enthaltenen PDZ-Domäne gerichtet war (Abbildung 5-20 A). Sowohl in den konditionalen PIST *knockout*-Tieren sowie den Kontrolltieren konnte Shank, ausgehend vom Gesamtlysate über die Membranfraktion hin zur PSD-Fraktion, deutlich angereichert werden (Abbildung 5-20 B).



**Abbildung 5-20: Das postsynaptische Gerüstprotein Shank konnte in der PSD-Präparation sehr stark angereichert werden.**

**A** Die Vorderhirne von adulten konditionalen PIST *knockout*-Mäusen ( $Gopc^{Tm1c/Tm1c+Cre}$ ) und Kontrolltieren ( $Gopc^{Tm1c/Tm1c}$ ) wurde isoliert, lysiert und anschließend die PSD durch Dichtegradientenzentrifugation präpariert. Nach dem Angleichen der Proteinkonzentrationen in den dabei erhaltenen Fraktionen (Gesamtlysate, Membranfraktion und PSD-Fraktion) wurden die Anreicherung von Shank durch *Western Blot* unter Einsatz gleicher Probenvolumina analysiert. Für die Detektion von Shank wurde ein gegen die PDZ-Domäne von Shank gerichteter Antikörper verwendet. **B** Quantifizierung der *Western Blot* Daten aus A. Dargestellt ist das Verhältnis Shank / alpha-Tubulin in der Membran- und PSD-Fraktion, bezogen auf das Verhältnis im Gesamtlysate in Prozent (%). Die Balken stellen das arithmetisch Mittel  $\pm$  SD dar; N=3.

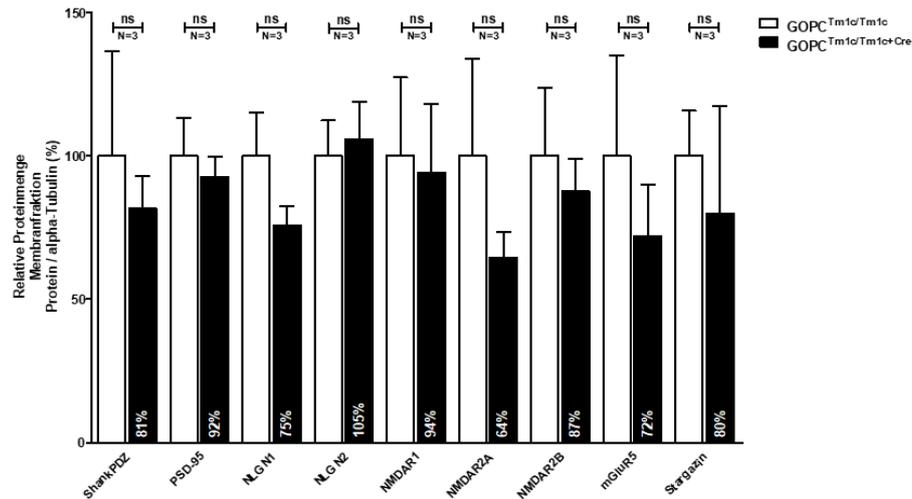
Um Veränderungen in der Zusammensetzung der PSD im Vorderhirn von konditionalen PIST *knockout*-Tieren zu analysieren, wurden die gleichen Proteine in der Membran- sowie in der PSD-Fraktion analysiert, die auch schon in den Cortex- und Hippocampuslysaten von konditionalen PIST *knockout*-Tieren analysiert wurden (Abschnitt 5.4.1).



**Abbildung 5-21: Western Blot Analyse verschiedener Proteine in der Membran- und PSD-Fraktion von  $Gopc^{Tm1c/Tm1c+Cre}$ -Mäusen und Kontrolltieren.**

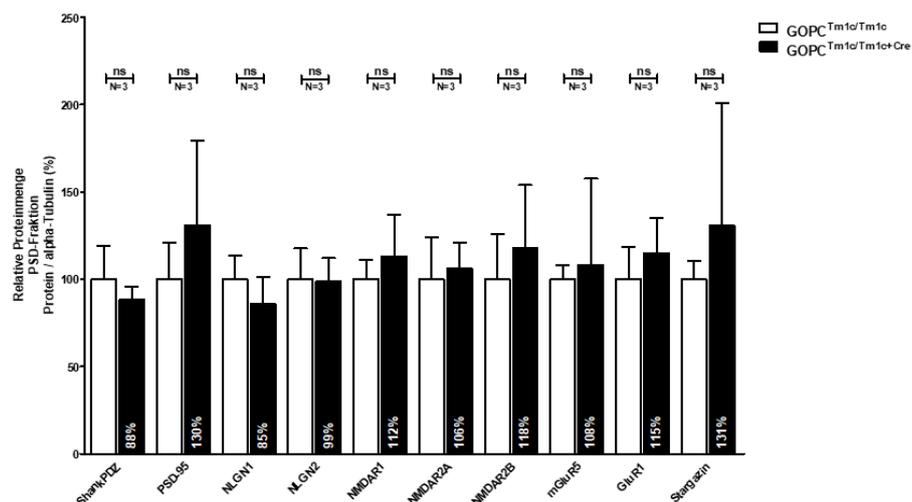
Die Membran- und PSD-Fraktionen wurde durch *Western Blot*, unter Einsatz der angegebenen Antikörper, analysiert.

Die in der Membran- und PSD-Fraktion für die analysierten Proteine detektierten Signalintensitäten (Abbildung 5-21) wurden auf die Menge des Haushaltproteins alpha-Tubulin bezogen. Die resultierenden normierten Werte der  $Gopc^{Tm1c/Tm1c+Cre}$ -Mäuse wurden auf die Werte der  $Gopc^{Tm1c/Tm1c}$ -Mäuse bezogen (Abbildung 5-22 und 5-23). Für die beiden analysierten postsynaptischen Gerüstproteine Shank und PSD-95, die beide nicht mit PIST interagieren, wurde keine Veränderung der Proteinmengen in der Membran- sowie in der PSD-Fraktion der  $Gopc^{Tm1c/Tm1c+Cre}$ -Mäuse, im Vergleich zu den Fraktionen der Kontrolltiere, beobachtet. Genauso wurde für die analysierten PIST-Interaktionspartner keine signifikante Veränderung der Proteinmengen in den beiden Fraktionen detektiert (Abbildung 5-22 und 5-23).



**Abbildung 5-22: Proteinmengen verschiedener postsynaptischer Proteine waren in der Membranfraktion von Gopc<sup>Tm1c/Tm1c+Cre</sup>-Mäusen, im Vergleich zu Kontrolltieren, unverändert.**

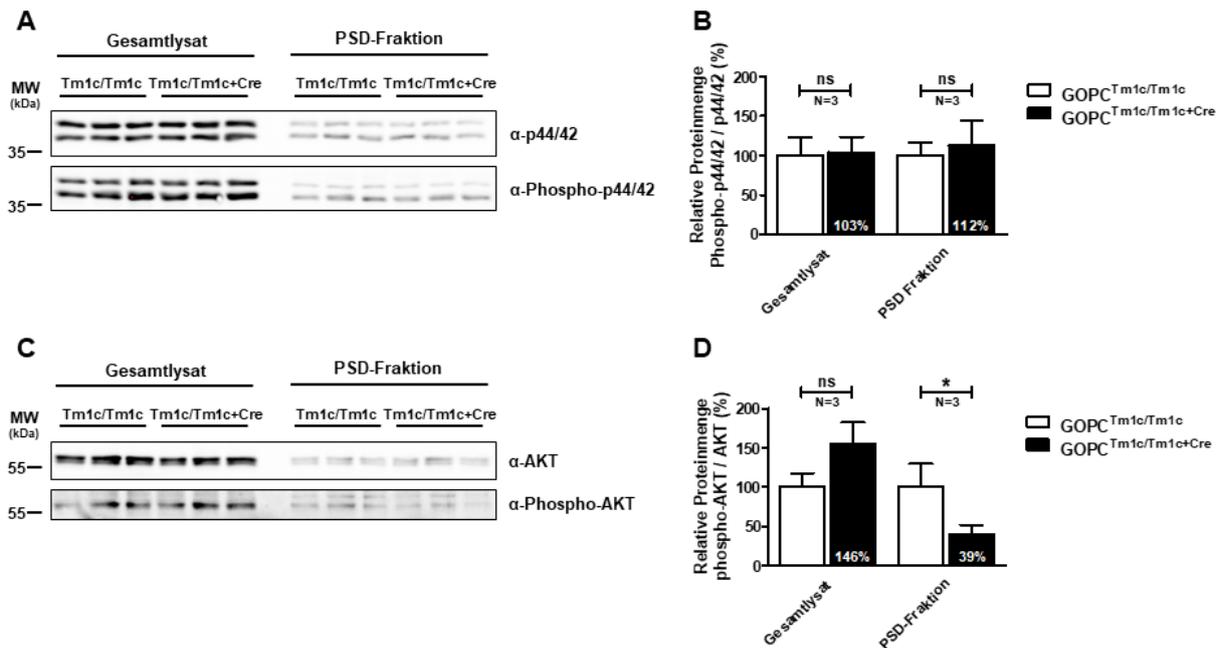
Quantifizierung der *Western Blot*-Daten der Membranfraktion aus Abbildung 5-21. Dargestellt ist das Verhältnis der angegebenen Proteine zu alpha-Tubulin (Protein/alpha-Tubulin) in der Membranfraktion von konditionalen PIST *knockout*-Mäusen (Gopc<sup>Tm1c/Tm1c+Cre</sup>), bezogen auf das Verhältnis in der Membranfraktion von Kontrolltieren (Gopc<sup>Tm1c/Tm1c</sup>); Gopc<sup>Tm1c/Tm1c</sup> = 100 %. Die Balken stellen das arithmetische Mittel  $\pm$  SD dar, ungepaarter t-Test, 2 Seiten, N=3 (ns = nicht-signifikant).



**Abbildung 5-23: Proteinmengen verschiedener postsynaptischer Proteine waren in der PSD-Fraktion von Gopc<sup>Tm1c/Tm1c+Cre</sup>-Mäusen, im Vergleich zu Kontrolltieren, unverändert.**

Quantifizierung der *Western Blot*-Daten der PSD Fraktion aus Abbildung 5-21. Dargestellt ist das Verhältnis der angegebenen Proteine zu alpha-Tubulin (Protein/alpha-Tubulin) in der PSD-Fraktion von konditionalen PIST *knockout*-Mäusen (Gopc<sup>Tm1c/Tm1c+Cre</sup>), bezogen auf das Verhältnis in der PSD-Fraktion von Kontrolltieren (Gopc<sup>Tm1c/Tm1c</sup>); Gopc<sup>Tm1c/Tm1c</sup> = 100 %. Die Balken stellen das arithmetische Mittel  $\pm$  SD dar, ungepaarter t-Test, 2 Seiten, N=3 (ns = nicht-signifikant).

Im Gesamtlysat und in den PSD-Proben wurde zusätzlich die Aktivität des ras/raf/MAP- und des AKT-Kinase-Signalwegs untersucht. Dafür wurden wieder die in den Fraktionen durch *Western Blot* detektierten Signalintensitäten der phosphorylierten Proteinkinasen ERK oder AKT in Relation zu der gesamten Proteinmenge von ERK oder AKT gesetzt. Die Phosphorylierung von ERK und AKT war, wie schon zuvor beobachtet, in den Gesamtlysaten von Gopc<sup>Tm1c/Tm1c+Cre</sup>-Mäusen, im Vergleich zu Kontrolltieren, nicht verändert. Unverändert war auch die Aktivität von ERK in der PSD-Fraktion. Im Gegensatz dazu war die Aktivität von AKT in der PSD-Fraktion von Gopc<sup>Tm1c/Tm1c+Cre</sup>-Mäusen signifikant reduziert (Abbildung 5-24 B+D).



**Abbildung 5-24: Die Aktivität der AKT-Proteinkinase war in der PSD-Fraktion von konditionalen PIST *knockout*-Mäusen, im Vergleich zu Kontrolltieren, reduziert.**

**A+C** Die Bestimmung der Aktivität der Proteinkinasen ERK und AKT im Gesamtlysat und der PSD-Fraktion erfolgte durch *Western Blot* unter Einsatz gleicher Probenvolumina. Für die Detektion wurden spezifische Antikörper für die Proteinkinasen ERK (p44/22) (A) und AKT (C) sowie deren aktiven phosphorylierten Formen verwendet. **B+D** Quantifizierung der *Western Blot*-Daten aus A bzw. C. Dargestellt ist das Verhältnis von ERK bzw. AKT zu phospho-ERK bzw. phospho-AKT (phospho-p44/42 / p44/42 bzw. phospho-AKT / AKT) im Gesamtlysat oder der PSD-Fraktion von konditionalen PIST *knockout*-Mäusen (Gopc<sup>Tm1c/Tm1c+Cre</sup>), bezogen auf das Verhältnis in der PSD-Fraktion von Kontrolltieren (Gopc<sup>Tm1c/Tm1c</sup>), in Prozent (Gopc<sup>Tm1c/Tm1c</sup> = 100 %). Die Balken stellen das arithmetische Mittel  $\pm$  SD dar; ungepaarter t-Test, 2 Seiten; Signifikanzlevel: \*  $p \leq 0,05$  (ns = nicht-signifikant).

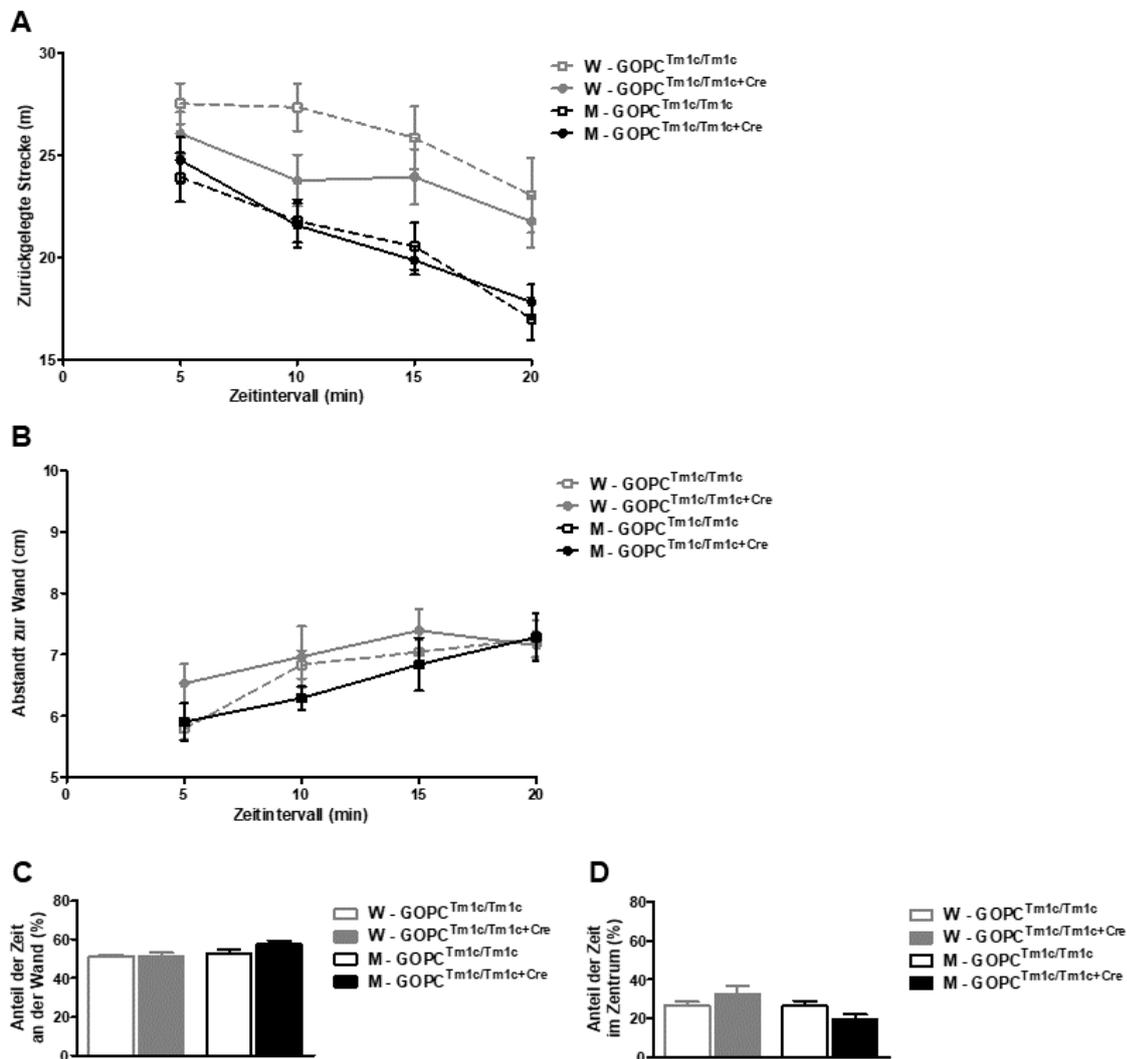
## 5.5 Verhaltensanalyse von konditionalen, gehirnspezifischen PIST *knockout*-Mäusen

Um zu überprüfen, ob sich durch den Verlust von PIST Veränderungen in Lern- und Gedächtnisvorgängen von PIST-defizienten Mäusen ergeben, wurden einige standardisierte Verhaltensanalysen, in Kooperation mit Dr. Fabio Morellini und Lynn Schau von der Forschergruppe Verhaltensbiologie am Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg, durchgeführt.

### 5.5.1 *Open field*-Test

Im *open field*-Test (Test im offenen Gelände) wurde das Erkundungs- und Vermeidungsverhalten der Mäuse quantitativ erfasst. Der *open field*-Test beruht auf der verhaltensbiologischen Beobachtung, dass Mäuse und andere Nagetiere das Betreten einer ihnen unbekannt, hell erleuchteten, offenen Fläche ohne Deckungsmöglichkeiten vermeiden. Die Mäuse wurden in einer Ecke der quadratischen Arena positioniert und 20 Minuten videoüberwacht. Dabei wurden als Messparameter die zurückgelegte Strecke, die mittlere minimale Distanz zur Wand, der Anteil der Zeit an der Wand und der Anteil der Zeit im Zentrum (eine imaginäre Fläche von 25 x 25 cm in der Mitte der Arena) analysiert

(Abbildung 5-25). Für diese Parameter wurde kein Unterschied zwischen Wildtyp- und konditionalen PIST *knockout*-Mäusen beider Geschlechter beobachtet.



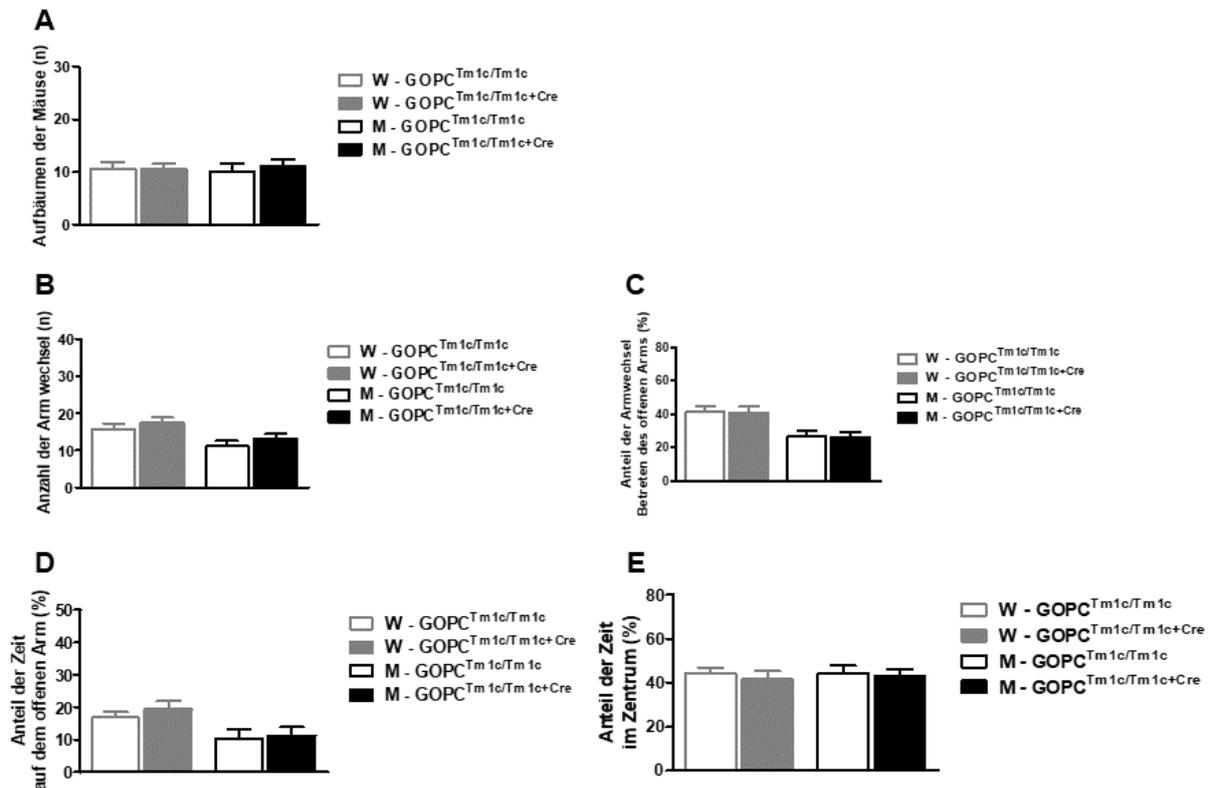
**Abbildung 5-25: Im open field-Test verhielten sich die konditionalen PIST *knockout*-Mäuse wie die Wildtyp-Tiere.**

Die Mäuse wurden in einer Ecke einer mit Weißlicht (50 Lux) erleuchteten Box positioniert und die Bewegung der Mäuse für 20 Minuten analysiert (WT(Weibchen)=14, WT(Männchen)=15, KO(Weibchen)=14, KO(Männchen)=15 Mäuse aus zwei unterschiedlichen Kohorten; WT =  $Gopc^{Tm1c/Tm1c}$ , KO =  $Gopc^{Tm1c/Tm1c+Cre}$ ; W = Weibchen, M = Männchen). **A** Zurückgelegte Strecke im 5 Minuten Zeitintervall in Metern (m); *two-way* ANOVA, kein Effekt des Genotyps (W:  $F_{1,10} = 4,81$ ,  $p = 0,03$ ; M:  $F_{1,11} = 0,07$ ,  $p = 0,79$ ). **B** Mittlerer minimaler Abstand zur Wand im 5 Minuten Zeitintervall in Zentimetern (cm); *two-way* ANOVA, kein Effekt des Genotyps (W:  $F_{1,10} = 1,69$ ,  $p = 0,19$ ; M:  $F_{1,11} = 0,00$ ,  $p > 0,99$ ). **C** Anteil der Zeit, die von den Mäusen an der Wand verbracht wurde in Prozent (%); *two-way* ANOVA, kein Effekt des Genotyps ( $F_{1,54} = 1,61$ ,  $p = 0,21$ ). **D** Anteil der Zeit, die von den Mäusen im Zentrum verbracht wurde in Prozent (%); *two-way* ANOVA, kein Effekt des Genotyps ( $F_{1,54} = 0,03$ ,  $p = 0,87$ ). Die Balken und Linien stellen das arithmetische Mittel  $\pm$  SEM dar.

### 5.5.2 Elevated plus maze-Test

Weiter wurde das angstbezogene Verhalten der konditionalen PIST *knockout*-Mäuse im *elevated plus maze*-Test (Test in einem erhöhten plusförmigen Labyrinth) untersucht. Dieser Test beruht auf der Aversion von Mäusen gegenüber offenen Flächen. Das über den Boden angehobene Labyrinth hatte die Form eines Pluszeichens mit vier Armen (zwei offenen und zwei geschlossenen), die durch ein quadratisches Zentrum verbunden waren. Dabei drückt sich das Angstverhalten dadurch aus, dass die Mäuse mehr Zeit in geschlossenen

Bereichen des Labyrinthes verbringen. In diesem Versuchsaufbau wurden innerhalb von fünf Minuten die Parameter Anzahl der gesamten Armwechsel (gezählt wenn alle vier Pfoten auf dem Arm waren), Anteil der Armwechsel zu einem offenen Arm, Anteil der Zeit auf dem offenen Armen, Anteil der Zeit im Zentrum und das Aufbäumen der Mäuse analysiert (Abbildung 5-26).



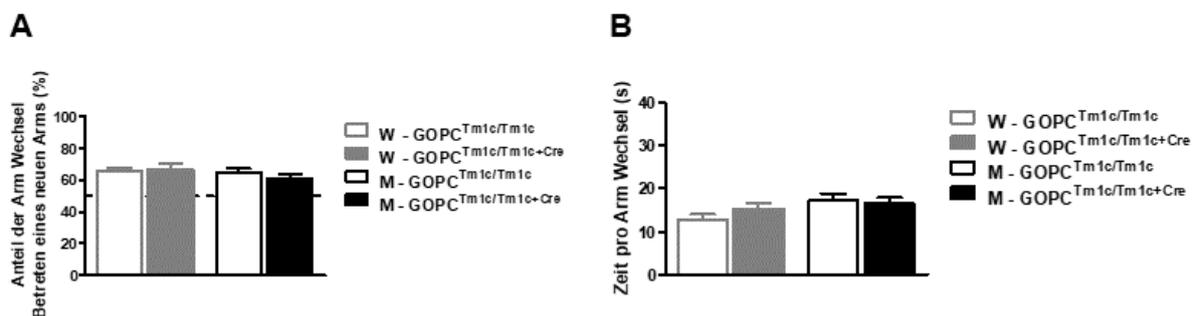
**Abbildung 5-26: Im *elevated plus maze*-Test verhielten sich die konditionalen PIST *knockout*-Mäuse wie die Wildtyp-Tiere.**

Die Mäuse wurden in einem plusförmigen Labyrinth positioniert, wobei die Schnauze in Richtung einer der offenen Arme zeigte. Die Bewegung der Mäuse in dem Labyrinth wurde für 5 Minuten, mit einer Infrarotkamera bei kompletter Dunkelheit videoüberwacht (WT(Weibchen)=14, WT(Männchen)=15, KO(Weibchen)=14, KO(Männchen)=15 Mäuse aus zwei unterschiedlichen Kohorten; WT = Gopc<sup>Tm1c/Tm1c</sup>, KO = Gopc<sup>Tm1c/Tm1c+Cre</sup>; W = Weibchen, M = Männchen). **A** Die Anzahl der Aufbäumungen (n); *two-way* ANOVA, kein Effekt des Genotyps ( $F_{1,54} = 0,13$ ,  $p = 0,71$ ). **B** Anzahl aller Armwechsel (betreten eines offenen oder geschlossenen Arms) (n); *two-way* ANOVA, kein Effekt des Genotyps ( $F_{1,54} = 0,13$ ,  $p = 0,71$ ). **C** Anteil der Armwechsel bei dem ein offener Arm betreten wurde in Prozent (%); *two-way* ANOVA, kein Effekt des Genotyps ( $F_{1,54} = 0,07$ ,  $p = 0,79$ ). **D** Anteil der Zeit, die auf einem offenen Arm verbracht wurde in Prozent (%); *two-way* ANOVA, kein Effekt des Genotyps ( $F_{1,54} = 0,46$ ,  $p = 0,50$ ). **E** Anteil der Zeit, die im Zentrum verbracht wurde in Prozent (%); *two-way* ANOVA, kein Effekt des Genotyps ( $F_{1,54} = 0,37$ ,  $p = 0,54$ ). Die Balken stellen das arithmetische Mittel  $\pm$  SEM dar.

Hierbei waren die weiblichen und männlichen konditionalen PIST *knockout*-Mäuse genauso aktiv und zeigten ein ähnliches Erkundungsverhalten, wie die Wildtyp-Tiere. Weibliche und männliche konditionale PIST *knockout*-Mäuse betraten genauso häufig den offenen Arm, wie die Wildtyp-Tiere (Abbildung 5-26 C). Außerdem verbrachten konditionale *knockout*-Mäuse während den fünf Minuten in dem Labyrinth gleich viel Zeit auf dem offenen Arm (Abbildung 5-26 D) oder in dem Zentrum (Abbildung 5-26 E), wie die Kontrolltiere.

### 5.5.3 Y-maze-Test

Das Arbeitsgedächtnis und das Erkundungsverhalten wurden im Y-maze-Test (Test in einem Ypsilon-förmigen Labyrinth) untersucht. Dieser Test basiert auf der generellen Bereitschaft von Nagetieren für sie neue Bereiche zu erkunden. Normalerweise suchen Nagetiere eher neue Bereiche auf, als in zuvor besuchte zurückzukehren. Das Y-Labyrinth bestand aus drei gleichförmigen Armen, die so miteinander verbunden waren, dass sie ein Ypsilon bildeten. Die Mäuse wurden in der Mitte des Labyrinthes positioniert und solange dort belassen und videoüberwacht, bis sie 27 Armwechsel absolviert hatten oder die gegebene Zeit von 20 Minuten verstrichen war. Dabei wurde das Betreten eines Armes gezählt, wenn sich alle vier Pfoten auf dem Arm befanden. Das Betreten eines neuen Armes nachdem die andere Arme besucht wurden, wurde als Wechsel angesehen. Dabei wurde der Anteil der Armwechsel, bei denen ein neuer Arm betreten wurde (Wechsel) und die durchschnittliche Zeit pro Wechsel analysiert. Die weiblichen und männlichen konditionalen PIST *knockout*-Mäuse betraten während der Beobachtungszeit genauso häufig einen neuen Arm (Wechsel), wie die Wildtyp-Tiere. Außerdem war die durchschnittliche Zeit pro Wechsel ebenfalls unverändert (Abbildung 5-27).



**Abbildung 5-27: Im Y-maze-Test verhielten sich die konditionalen PIST *knockout*-Mäuse wie die Wildtyp-Tiere.**

Die Mäuse wurden in dem Zentrum eines Ypsilon-förmigen Labyrinths positioniert und solange dort belassen und videoüberwacht bis sie 27 Armwechsel absolviert hatten oder die Zeit von 20 Minuten verstrichen war. (WT(Weibchen)=14, WT(Männchen)=15, KO(Weibchen)=14, KO(Männchen)=15 Mäuse aus zwei unterschiedlichen Kohorten; WT = Gopc<sup>Tm1c/Tm1c</sup>, KO = Gopc<sup>Tm1c/Tm1c+Cre</sup>; W = Weibchen, M = Männchen). **A** Die Anzahl der Armwechsel, bei denen ein neuer Arm betreten wurde (Wechsel) in Prozent (%); gestrichelte Linie 50 % Chance eines zufälligen Events, *two-way* ANOVA, kein Effekt des Genotyps ( $F_{1,54} = 0,17$ ,  $p = 0,68$ ). **B** Die durchschnittliche Zeit, die für einen Wechsel benötigt wurde in Sekunden (s); *two-way* ANOVA, kein Effekt des Genotyps ( $F_{1,54} = 0,45$ ,  $p = 0,51$ ). Die Balken stellen das arithmetische Mittel  $\pm$  SEM dar.

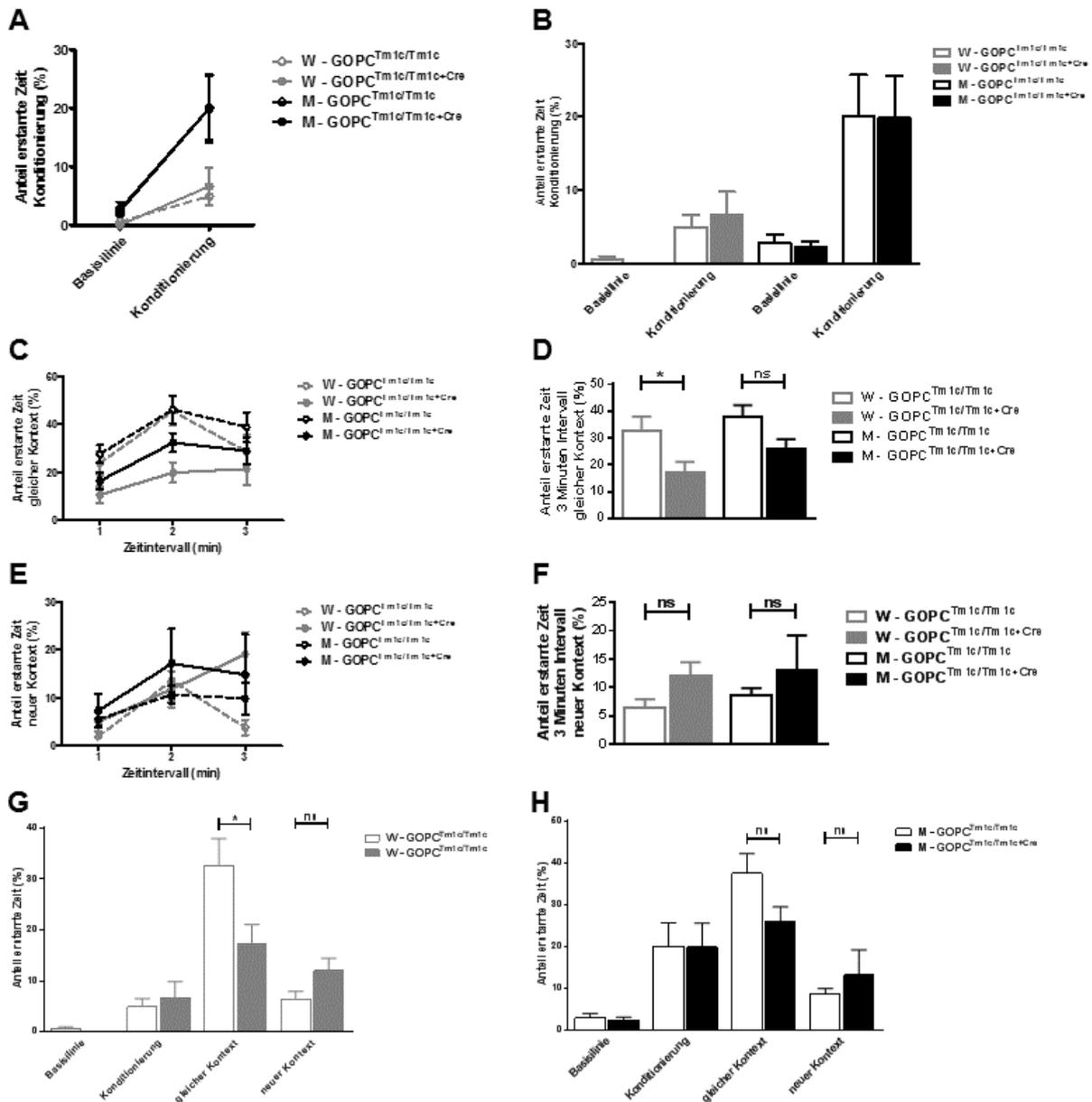
### 5.5.4 Contextual fear-conditioning-Test

Das Langzeitgedächtnis von emotional relevanten Informationen und die Fähigkeit diese wieder abzurufen wurde durch den *contextual fear-conditioning*-Test (Angstkonditionierungstest) analysiert. Dieser Test basiert auf einer klassischen Konditionierung und dient der Untersuchung der Fähigkeit des Lernens und Erstellens einer Assoziation zwischen einer aversiven Erfahrung (z. B. leichter elektrischer Impuls) und einem neutralen Kontext (z. B. der Käfig), in dem diese Erfahrung gesammelt wurde. Die Konditionierung führt normalerweise dazu, dass konditionierte Mäuse zu einem späteren Zeitpunkt in dem Kontext, in dem die Konditionierung stattfand, auch ohne den aversiven Stimulus ein

Angstverhalten zeigen. Dabei kann das Angstverhalten bzw. das Angstgedächtnis durch das sogenannte *Freezing* (Angststarre) der Mäuse quantifiziert werden, ein Verhalten, bei dem Mäuse bis auf die Atembewegung völlig bewegungslos sind. Für den *contextual fear-conditioning*-Test mussten die Mäuse zunächst lernen den aversiven Stimulus (leichter elektrischer Schock) mit dem neutralen Kontext (dem Käfig) zu assoziieren (Kontextgedächtnis). Dafür wurden die Mäuse in dem Kontext einer Plexiglaskammer mit einem Stahlgitterboden, über den ein milder elektrischer Impuls vermittelt werden konnte, konditioniert. Das Langzeitangstgedächtnis der Mäuse wurde einen Tag nach der Konditionierung getestet, indem die Mäuse wieder in die Kammer eingebracht wurden, in der die Konditionierung stattgefunden hatte. Hier wurden sie für drei Minuten beobachtet, wobei das Erstarrungsverhalten aufgezeichnet wurde. Um zu testen, ob die Mäuse zwischen dem Kontext, in dem die Konditionierung stattfand und einem neutralen Kontext unterscheiden können, wurden Sie am zweiten Tag nach der Konditionierung in eine Kammer gesetzt, die der ersten ähnlich war, sich aber durch ein anderes Muster unterschied. Die Mäuse wurden ebenfalls für drei Minuten beobachtet und das Erstarrungsverhalten aufgezeichnet. Dabei wurde das Angstgedächtnis analysiert, indem der Anteil der Zeit quantifiziert wurde, die die Mäuse in Erstarrung verbrachten.

Die Konditionierung der Mäuse durch die leichten elektrischen Impulse führte in weiblichen und männlichen Mäusen zu einem Anstieg der in Erstarrung verbrachten Zeit. Männliche Tiere erstarrten länger als die weiblichen Tiere. Dabei gab es keinen Unterschied zwischen konditionalen *knockout*-Mäusen und Wildtyp-Tieren (Abbildung 5-28 A und 5-28 B). Beim Test des Angstgedächtnisses am ersten Tag nach der Konditionierung im gleichen Kontext ohne elektrische Impulse erstarrten die weiblichen und männlichen konditionalen PIST *knockout*-Mäuse weniger lang, als die Kontrolltiere (Abbildung 5-28 C und 5-28 D).

Während des Tests der Fähigkeit der Mäuse zwischen dem Kontext, in dem die Konditionierung stattfand und einem neuen Kontext zu unterscheiden zeigte sich, dass weibliche sowie männliche konditionale PIST *knockout*-Mäuse eine längere Zeit erstarrten als die Wildtyp-Tiere (Abbildung 5-28 E und 5-28 F). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass konditionale PIST *knockout*-Mäuse Defizite im Lernen von kontextbezogenen Erinnerungen haben. Weiterhin weisen diese Mäuse Defizite in der Fähigkeit auf, zwischen dem Kontext der Konditionierung und einem neuen Kontext zu unterscheiden.

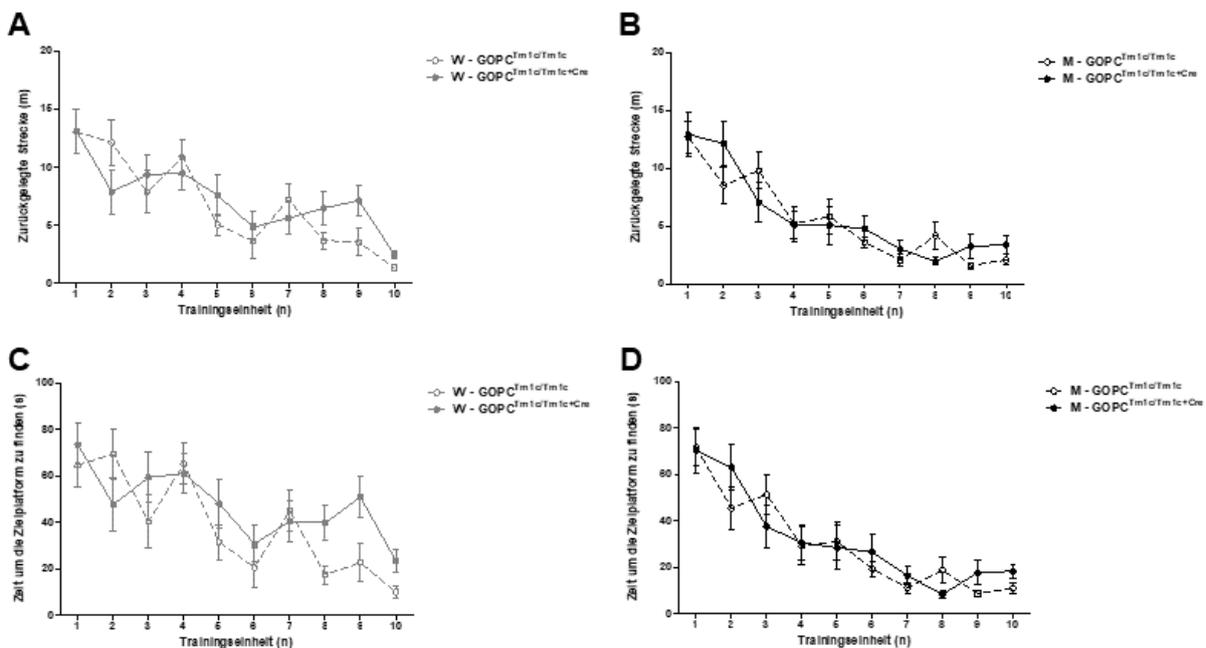


**Abbildung 5-28: Konditionale PIST *knockout*-Mäuse beider Geschlechter zeigten Defizite im Erlernen von kontextbezogenen Erinnerungen sowie in der Fähigkeit, den Kontext der Konditionierung und einem neuen Kontext zu unterscheiden.**

**A+B** Konditionierung der Mäuse. Dargestellt ist der Anteil der erstarnten Zeit in Prozent (%) während der Aufzeichnung der Basislinie sowie der Konditionierung; *two-way* ANOVA, kein Effekt des Genotyps (W:  $F_{1,52} = 0,09$ ,  $p = 0,76$ ; M:  $F_{1,56} = 0,01$ ,  $p = 0,92$ ). **C+D** Test der Fähigkeit der Mäuse kontextbezogene Erinnerungen zu erlernen. **C** Dargestellt ist der Anteil der erstarnten Zeit in Prozent (%) im Minutenintervall. **D** Dargestellt ist der Anteil der erstarnten Zeit in Prozent (%) über den gesamten Zeitraum. (WT(Weibchen)=14, WT(Männchen)=15, KO(Weibchen)=14, KO(Männchen)=15 Mäuse aus zwei unterschiedlichen Kohorten; WT =  $Gopc^{Tm1c/Tm1c}$ , KO =  $Gopc^{Tm1c/Tm1c+Cre}$ ; W = Weibchen, M = Männchen); *two-way* ANOVA mit *post-hoc* Vergleich nach Bonferroni, ( $F_{1,55} = 10,09$ ,  $p = 0,02$ , W: WT vs. KO  $p < 0,05$ , M: WT vs. KO  $p > 0,05$ ). **E+F** Test der Fähigkeit der Mäuse zwischen dem Kontext, in dem die Konditionierung stattfand und einem neutralen Kontext zu unterscheiden. **E** Dargestellt ist der Anteil der erstarnten Zeit in Prozent (%) im eine Minute Intervall. **F** Dargestellt ist der Anteil der erstarnten Zeit in Prozent (%) über den gesamten Zeitraum. WT(Weibchen)=7, WT(Männchen)=10, KO(Weibchen)=11, KO(Männchen)=10 Mäuse aus zwei unterschiedlichen Kohorten; WT =  $Gopc^{Tm1c/Tm1c}$ , KO =  $Gopc^{Tm1c/Tm1c+Cre}$ ; W = Weibchen, M = Männchen); *two-way* ANOVA mit *post-hoc* Vergleich nach Bonferroni, ( $F_{1,34} = 0,21$ ,  $p = 0,65$ , W: WT vs. KO  $p > 0,05$ , M: WT vs. KO  $p > 0,05$ ). **G+H** Gegenüberstellung von dem Anteil der erstarnten Zeit in Prozent (%) während der Aufzeichnung der Basislinie und der Konditionierung sowie dem Anteil der erstarnten Zeit in Prozent (%) im gleichen und neuen Kontext für die Weibchen (G) und Männchen (H). Die Balken und Linien stellen das arithmetische Mittel  $\pm$  SEM dar; Signifikanzlevel: \*  $p \leq 0,05$  (ns = nicht-signifikant).

### 5.5.5 Morris water maze-Test

Abschließend wurde in dem *Morris water maze*-Test (Morris-Wasserlabyrinth-Test) das räumliche und das Langzeitgedächtnis analysiert, indem die Mäuse schwimmend eine weiße Plattform unter der Wasseroberfläche finden mussten. Nach einer Gewöhnungsphase wurden die Mäuse in insgesamt 10 Trainingseinheiten trainiert die versteckte Plattform zu finden. Hierbei wurde die insgesamt zurückgelegte Strecke, die Zeit um die Plattform zu finden und die mittlere minimale Distanz zur Plattform analysiert. Wie erwartet, reduzierte sich im Verlauf der Trainingseinheiten die Strecke, die die Mäuse zurücklegten um die Plattform zu finden (Abbildung 5-29 A und 5-29 B). Einhergehend damit reduzierte sich auch die Zeit, die die Mäuse brauchten um die versteckte Plattform zu finden (Abbildung 5-29 C und 5-29 D). Dabei zeigten sich zwischen Wildtyp- und konditionalen PIST *knockout*-Mäusen keine Unterschiede.

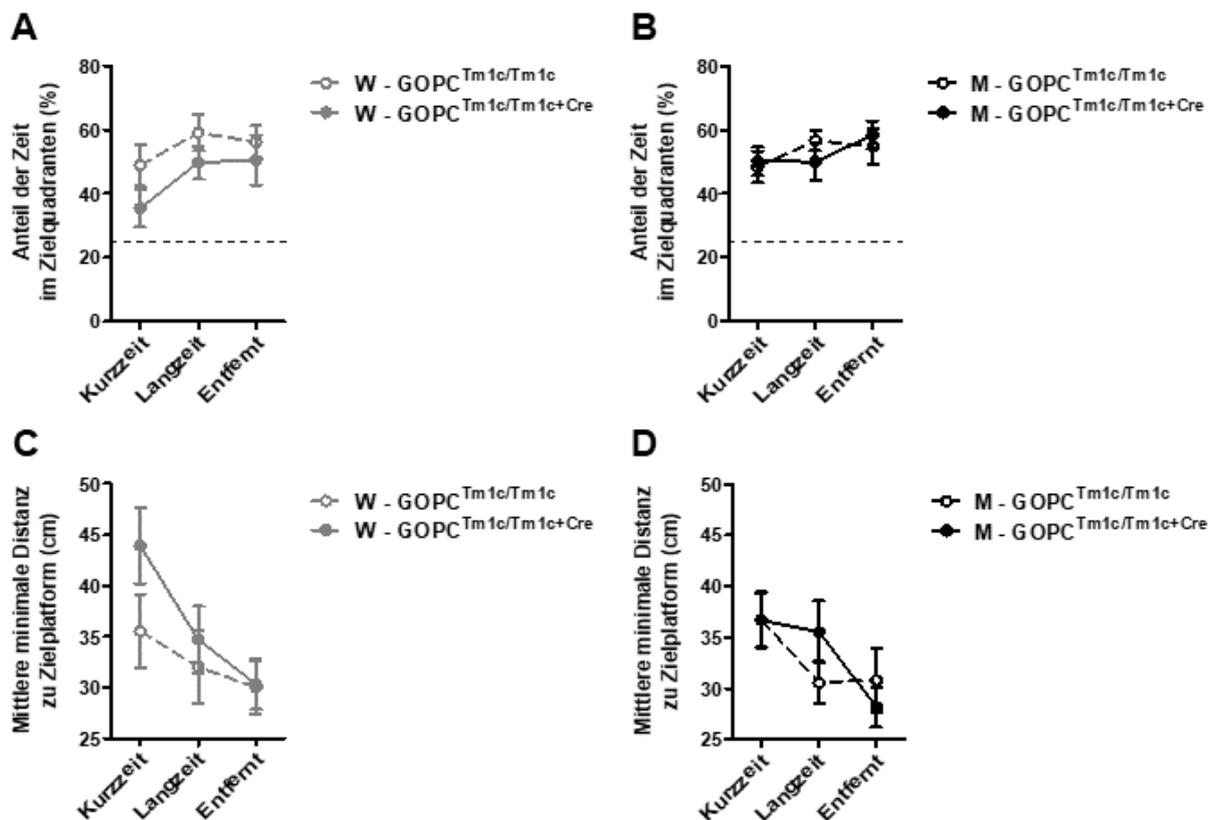


**Abbildung 5-29: Während der Trainingseinheit des Morris water maze-Test wurden keine Unterschiede im Lernen von weiblichen und männlichen konditionalen PIST *knockout*-Mäusen beobachtet.**

Im Anschluss an die Gewöhnungsphase mussten die Mäuse an zwei aufeinander folgenden Tagen jeweils 5 Trainingseinheiten im Wasserlabyrinth absolvieren. Maximale Dauer pro Einheit 90 Sekunden, mit einem Intervall von 10 Minuten zwischen den Einheiten (WT(Weibchen)=10, WT(Männchen)=11, KO(Weibchen)=10, KO(Männchen)=11 Mäuse aus zwei unterschiedlichen Kohorten; WT = Gopc<sup>Tm1c/Tm1c</sup>, KO = Gopc<sup>Tm1c/Tm1c+Cre</sup>, W = Weibchen, M = Männchen). **A+B** Die während der Trainingseinheiten zurückgelegte Strecke in Metern (m). A Weibchen (W) und B Männchen (M); *two-way* ANOVA, kein Effekt des Genotyps (W:  $F_{1,180} = 0,74$ ,  $p = 0,39$ ; M:  $F_{1,200} = 0,33$ ,  $p = 0,57$ ). **C+D** Die benötigte Zeit, um die versteckte Plattform zu finden in Sekunden (s). C Weibchen (W) und D Männchen (M); *two-way* ANOVA, kein Effekt des Genotyps (W:  $F_{1,180} = 2,71$ ,  $p = 0,10$ ; M:  $F_{1,200} = 0,42$ ,  $p = 0,51$ ). Die Linien stellen das arithmetische Mittel  $\pm$  SEM dar.

Um das Kurzzeitgedächtnis zu untersuchen, wurde am zweiten Tag nach der letzten Trainingseinheit ein sogenannter Transferversuch durchgeführt, vor dem die versteckte Plattform aus dem Labyrinth entfernt wurde und die Mäuse für 60 Sekunden in dem Labyrinth frei schwimmen konnten. Auch hier zeigte sich kein Unterschied zwischen konditionalen PIST *knockout*-Mäusen und den Kontrolltieren. Um das Langzeitgedächtnis zu

untersuchen wurde 24 Stunden (Langzeit) und 7 Tage (Entfernt) nach der letzten Trainingseinheit ein Transferversuch durchgeführt. Bei den Transferversuchen wurde zum einen der Anteil der Zeit, die die Mäuse in dem Quadranten verbrachten, in dem sich zuvor die Plattform befand (Zielquadrant) analysiert, zum anderen die mittlere minimale Distanz zu der Position, an der sich die Plattform während der Trainingseinheiten (Abbildung 5-29) und der Transferversuche (Abbildung 5-30) befand. Wiederum wurden keine Unterschiede zwischen konditionalen PIST *knockout*-Mäusen beider Geschlechter, im Vergleich zu den Kontrolltieren, beobachtet.



**Abbildung 5-30:** Während der Transferversuche wurde in Bezug auf das Kurzzeit- und Langzeitgedächtnis von konditionalen PIST *knockout*-Mäusen kein Unterschied beider Geschlechter, im Vergleich zu Wildtyp-Tieren, beobachtet.

Im Anschluss an die letzte Trainingseinheit sowie 24 Stunden und 7 Tage danach wurden Transferversuche durchgeführt, bei denen zuvor die versteckte Plattform aus dem Labyrinth entfernt wurde und die Mäuse für 60 Sekunden in dem Labyrinth frei schwimmen konnten (WT(Weibchen)=10, WT(Männchen)=11, KO(Weibchen)=10, KO(Männchen)=11 Mäuse aus zwei unterschiedlichen Kohorten; WT =  $Gopc^{Tm1c/Tm1c}$ , KO =  $Gopc^{Tm1c/Tm1c+Cre}$ ; W = Weibchen, M = Männchen). **A+B** Der Anteil der Zeit, die sich die Mäuse während der Transferversuche in den Quadranten aufhielten, in dem sich zuvor die Plattform befand (Zielquadrant) in Prozent (%) (A Weibchen und B Männchen). Gestrichelte Linie 25 % Chance eines zufälligen Events; *two-way* ANOVA, kein Effekt des Genotyps (W:  $F_{1,54} = 3,61$ ,  $p = 0,06$ ; M:  $F_{1,60} = 0,01$ ,  $p = 0,92$ ). **C+D** Die mittlere minimale Distanz zu der Position, an der sich in den Trainingseinheiten die Plattform befand in Zentimetern (cm) (C Weibchen und D Männchen); *two-way* ANOVA, kein Effekt des Genotyps (W:  $F_{1,54} = 2,06$ ,  $p = 0,16$ ; M:  $F_{1,60} = 0,12$ ,  $p = 0,73$ ). Die Linien stellen das arithmetische Mittel  $\pm$  SEM dar.

## 6 Diskussion

In den vergangenen Jahrzehnten wurde das ubiquitär exprimierte trans-Golgi-assoziierte PDZ-Domänenprotein PIST als wichtiger Regulator für die intrazelluläre Sortierung von Membranproteinen beschrieben. Dabei wurden, aufgrund von *in vitro*-Untersuchungen zum Teil deutlich abweichende Funktionen in Bezug auf die verschiedenen Interaktionspartner von PIST vorgeschlagen. Die bisher zu der Funktion von PIST publizierten Beobachtungen deuten darauf hin, dass PIST interagierende Membranproteine intrazellulär zurückhält<sup>[33,44,52,56,63,64,68]</sup>, einen Einfluss auf deren lysosomale Degradierung bzw. Stabilität hat<sup>[58,60–62,78]</sup> oder die Assoziation mit Gerüstproteinen fördert.<sup>[33,44,50,56,64,72]</sup> Neben einer Rolle in anterograden Transportprozessen wurden auch Funktionen im retrograden Transport, wie der Internalisierung und dem Recycling beschrieben.<sup>[33,56,72]</sup>

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktion von PIST bei der Sortierung von Interaktionspartnern im ZNS untersucht. Hierbei handelte es sich um verschiedene Neurotransmitterrezeptoren und Zelladhäsionsmoleküle, die in der PSD exzitatorischer, glutamaterger Synapsen angereichert sind und dort eine Rolle bei Synapsen-Bildung und -Stabilität sowie der Signaltransduktion übernehmen. Dazu zählen der metabotrope Glutamaterezeptor mGluR5, die ionotropen NMDA-Rezeptoren sowie die Zelladhäsionsmoleküle NLGN1 und Stargazin.<sup>[50,78,105]</sup> Über die Funktion von PIST im ZNS ist, bis auf eine Rolle bei der durch Stargazin vermittelten Verankerung von AMPA-Rezeptoren in postsynaptischen Signaltransduktionskomplexen, nur wenig bekannt.<sup>[38,50]</sup>

Als Grundlage für diese Untersuchungen dienten Erkenntnisse, die in der Arbeitsgruppe von Prof. Kreienkamp anhand einer PIST *knockout*-Mauslinie (C57BL/6-Gopc<sup>Tm1a</sup>) gewonnen wurden. Diese Mauslinie wurde von Dr. Koliwer mit Hilfe des kommerziellen, embryonalen Stammzellklons EPD0822\_2\_B04 (EUCOMM Konsortium, München, Deutschland) generiert. Mäuse aus dieser Linie, die im *Gopc*-Genlocus die Selektionskassette nach dem *knockout-first*-Prinzip aufweisen, exprimieren von der Embryonalentwicklung an global ein verkürztes Genprodukt von PIST. Dieses Genprodukt besteht aus den ersten 111 Aminosäuren von PIST, die durch die ersten beiden Exons kodiert werden, welche mit dem Genprodukt des *lacZ*-Gens, der  $\beta$ -Galaktosidase, fusioniert sind. Da sich die Aminosäure 111 von PIST in der Mitte der ersten *Coiled-coil*-Domäne befindet, kann davon ausgegangen werden, dass in dem erzeugten Genprodukt keine funktionelle Proteindomäne enthalten ist. Nach der Etablierung dieser Mauslinie stellte sich heraus, dass aus Verpaarungen von heterozygoten PIST *knockout*-Mäusen (Gopc<sup>wt/Tm1a</sup>) nur sehr wenige homozygote *knockout*-Mäuse (Gopc<sup>Tm1a/Tm1a</sup>) hervorgingen. Der Anteil lag mit 2 % weit unter den, nach den Mendelschen Regeln, erwarteten 25 %.<sup>[109]</sup>

Aufgrund der geringen Verfügbarkeit von homozygoten PIST *knockout*-Mäusen konnten zunächst nur heterozygote PIST *knockout*-Mäuse analysiert werden. Diese ersten Analysen

zeigten, dass die um ca. 50 % reduzierte Proteinmenge von PIST in heterozygoten PIST *knockout*-Mäusen zu Effekten in Bezug auf einige synaptisch-lokalisierete Interaktionspartner von PIST führte. So wurde beobachtet, dass die zelluläre Proteinmengen von einigen Interaktionspartnern in Hippocampuslysaten verändert war und es zu Veränderungen in der Ausstattung der PSD mit verschiedenen Glutamatrezeptoren und Zelladhäsionsmolekülen kam. Außerdem war in Hippocampuslysaten die Aktivität des MAP- und AKT-Kinase Signalweges deutlich reduziert.<sup>[109]</sup>

Diese anfänglichen Beobachtungen bildeten mit weiteren zuvor publizierten *in vitro*-Daten die Grundlage für die Hypothese dieser Arbeit. In dieser wird angenommen, dass PIST mit seinen Interaktionspartnern transient am TGN interagiert und diese dort zurückhält und damit den weiteren, durch andere PDZ-Domänenproteine vermittelten, zielgerichteten Transport der Interaktionspartner beeinflusst, wie es z. B. für CFTR,  $\beta$ 1AR, SSTR5, Cadherin23 und AMPA-Rezeptoren beobachtet wurde.<sup>[33,44,50,64,109]</sup> Dabei sollte berücksichtigt werden, dass für PIST, bis auf die intrazelluläre Retention bei Überexpression, kein genereller Effekt auf seine Interaktionspartner bekannt ist und somit die Rolle von PIST für jeden Interaktionspartner differenziert betrachtet werden sollte.

Die beobachtete Verteilung der Genotypen in der frühen Etablierungsphase der C57BL/6-Gopc<sup>Tm1a</sup>-Linie deutete darauf hin, dass der homozygote Verlust von PIST üblicherweise, aber nicht immer embryonal letal ist. Dies steht im Widerspruch zu einer 2002 von Yao *et al.* publizierten PIST-defizienten Mauslinie, für die beschrieben wurde, dass homozygote PIST *knockout*-Mäuse lebensfähig sind.<sup>[106]</sup>

Dass während der frühen Etablierungsphase der C57BL/6-Gopc<sup>Tm1a</sup>-Linie kaum homozygote PIST *knockout*-Mäuse hervorgingen, ist vermutlich auf den genetischen Hintergrund der Mäuse zurückzuführen. Von dem *International Mouse Phenotyping Consortium* (IMPC) nach der *Mammalian Phenotype Ontology* (MP) aufbereitete Daten zeigen, dass es bei ca. 35 % der getesteten Gene (78 von 224) in einem C57BL/6N-Linienhintergrund (BL/6N) bei homozygoten *Knockouts* zum Tod von Embryonen vor der Separation des Herzsatriums kommt. Außerdem kommt es bei ca. 10 % (432 von 4433) der getesteten Gene im BL/6N-Hintergrund, aufgrund des Todes von einigen, aber nicht allen, homozygoten Nachkommen im Zeitraum zwischen der Befruchtung und dem Absetzen, zu einer gegenüber der Mendelschen Regel veränderten Verteilung der Genotypen. Gleiche Phänotypen wurden auch für homozygote PIST *knockout*-Mäuse auf dem BL/6N-Hintergrund, in verschiedenen Phänotypisierungszentren gemacht (entnommen von <https://www.mousephenotype.org>, Stand August 2018).

Auch die für die Generierung der C57BL/6-Gopc<sup>Tm1a</sup>-Linie verwendete genetisch modifizierte embryonale Stammzelle hatte den Linienhintergrund BL/6N. Die damit erzeugten Mäuse wurden sukzessiv auf den C57BL/6J-Hintergrund (BL/6J) zurückgekreuzt. Dieser Umstand

könnte dafür verantwortlich sein, dass in der frühen Etablierungsphase so wenig homozygote PIST *knockout*-Tiere erzeugt wurden. Dafür spricht auch, dass der Anteil an homozygoten *Knockouts*, der aus Verpaarungen homozygoter PIST *knockout*-Tiere ( $Gopc^{Tm1a/Tm1a}$ ) hervorging, über den gesamten Zeitraum auf 6 % anstieg (im Vergleich zu 35 %  $Gopc^{wt/wt}$  und 59 %  $Gopc^{wt/Tm1a}$ ). Betrachtet man nur die Nachkommen aus Verpaarungen, die in der späteren Etablierungsphase angesetzt wurden, beträgt der Anteil an homozygoten *Knockouts* ( $Gopc^{Tm1a/Tm1a}$ ) sogar 12 % (im Vergleich zu 30 %  $Gopc^{wt/wt}$  und 58 %  $Gopc^{wt/Tm1a}$ ). Außerdem muss bei der C57BL/6- $Gopc^{Tm1a}$ -Linie beachtet werden, dass die Selektionskassette das Gen für die Neomycinresistenz und das *exon trap*-Modul enthält, wodurch der Phänotyp beeinflusst werden kann. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit Ansätze verfolgt, um die Verfügbarkeit von homozygoten Mäusen zu erhöhen. Dafür wurden, ausgehend von der C57BL/6- $Gopc^{Tm1a}$ -Linie, zwei weitere Mauslinien generiert.

Zunächst wurden Mäuse aus der C57BL/6- $Gopc^{Tm1a}$ -Linie mit Mäusen verpaart, die ubiquitär das Protein der Cre-Rekombinase exprimieren. Durch Rekombination zwischen zwei loxP-Sequenzmotiven wurden die Selektionselemente der Kassette mit dem Neomycinresistenzgen sowie das dritte Exon von PIST aus dem Genom entfernt. Aufgrund der geringen Effizienz der Rekombination konnte diese Linie (C57BL/6- $Gopc^{Tm1e}$ ) erst spät während dieser Arbeit etabliert werden, wodurch weitere Analysen nicht durchgeführt werden konnten. Im Gegensatz zu der C57BL/6- $Gopc^{Tm1a}$ - gingen in der C57BL/6- $Gopc^{Tm1e}$ -Linie aus Verpaarungen heterozygoter Tiere Nachkommen hervor, deren Verteilung der Genotypen eher den Erwartungen nach den Mendelschen Regeln entsprach (18 %  $Gopc^{wt/wt}$ , 58 %  $Gopc^{wt/Tm1e}$  und 24 %  $Gopc^{Tm1e/Tm1e}$ ). Daten zu dieser Linie wurden in dieser Arbeit nicht gezeigt.

In einem zweiten Ansatz wurde ausgehend von der C57BL/6- $Gopc^{Tm1a}$ -Linie eine konditionale, Vorderhirn-spezifische PIST *knockout*-Mauslinie generiert (C57BL/6- $Gopc^{Tm1c}$ ). Bei konditionalen *knockout*-Mäusen dieser Linie wird PIST postnatal nur in Neuronen des Vorderhirns ausgeschaltet. Durch die Detektion von PIST in verschiedenen Gehirngewebe- und Lebergewebelysaten wurde bestätigt, dass in adulten  $Gopc^{Tm1c/Tm1c}$ -Mäusen, die auch das Gen für die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Cam Kinase II-Promoters besaßen ( $Gopc^{Tm1c/Tm1c+Cre}$ ), PIST wie erwartet nicht mehr exprimiert wurde. Konsistent mit publizierten Daten von Casanova *et al.* (2001), die die hier verwendete CaMKII-Cre-*deleter*-Mauslinie etablierten, wurde PIST nicht mehr im Cortex und Hippocampus detektiert, wohingegen die Expression im Cerebellum (Daten nicht gezeigt) und außerhalb des Gehirns unverändert waren.<sup>[117]</sup> Auch bei der Etablierung der C57BL/6- $Gopc^{Tm1c}$ -Mauslinie zeigte sich, dass die Effizienz der Rekombination des *Tm1a*-Allels durch die FLP-Rekombinase sehr gering war, weswegen konditionale PIST *knockout*-Mäuse erst im späteren Verlauf dieser Arbeit analysiert werden konnte. Um sicherzustellen, dass Mäuse der

C57BL/6-Gopc<sup>Tm1e-</sup>- und C57BL/6-Gopc<sup>Tm1c-</sup>-Linie weitestgehend den C57BL/6J-Hintergrund aufweisen, wurden Zuchttiere in Zusammenarbeit mit PD Dr. Hoffmeister-Ullerich (*Core Facility* Bioanalytik, Zentrums für Molekulare Neurobiologie Hamburg) hinsichtlich Genmutationen untersucht, durch die zwischen dem BL/6N- und BL/6J-Hintergrund differenziert werden kann. Daten hierzu wurden in dieser Arbeit nicht gezeigt.

Bei der biochemischen Analyse der verschiedenen Modellsysteme wurden zum Teil abweichende Effekte, aufgrund des Verlustes von PIST, zwischen kultivierten Rattenneuronen, heterozygoten PIST knockout-(Gopc<sup>wt/Tm1a</sup>) (insbesondere zu vorangegangenen Analysen<sup>[109]</sup>) und konditionalen PIST knockout-Mäusen (Gopc<sup>Tm1c/Tm1c+Cre</sup>) beobachtet.

Da zu Beginn dieser Arbeit nur heterozygote PIST *knockout*-Mäuse aus der C57BL/6-Gopc<sup>Tm1a</sup>-Linie in ausreichenden Mengen zur Verfügung standen und in diesen Mäusen schon Effekte von PIST nachweisbar waren<sup>[109]</sup>, wurden an Gehirngewebeschnitten dieser Tiere Experimente zur Analyse von Zelloberflächenrezeptoren sowie zur Stimulation von Signalwegen durchgeführt. Zum Vergleich wurden primär kultivierte, kortikale Rattenneuronen nach lentiviralem PIST-*knockdown*, in vergleichbaren Experimenten untersucht. Der maßgebliche Unterschied zwischen diesen Modellen ist der Zeitpunkt, an dem es zum Verlust von PIST kommt. In den heterozygoten PIST *knockout*-Mäusen ist die Menge von PIST global und von der Embryonalentwicklung an reduziert. Dadurch eignen sich diese Tiere dazu, schon die Rolle von PIST in der Entwicklung zu analysieren. Im Gegensatz dazu wurde der *Knockdown* von PIST in kultivierten Rattenneuronen erst am siebten Tag *in vitro* induziert. Zu diesem Zeitpunkt sind bereits erste prä- und postsynaptische Strukturen angelegt.<sup>[120]</sup>

Bei den Zelloberflächen-Biotinylierungsexperimenten an Gehirngewebeschnitten wurde ersichtlich, dass der gewählte experimentelle Ansatz teilweise hohe Variabilitäten zwischen den einzelnen Experimenten aufwies. Außerdem konnten nicht alle Interaktionspartner mit ausreichenden Signalintensitäten in den verschiedenen Gehirnregionen detektiert werden, wodurch in einigen Fällen keine Quantifizierung durchgeführt werden konnte. Dies ist möglicherweise auf die geringe Menge an Ausgangsmaterial und/oder auf die differenzielle Expression der Interaktionspartner in den verschiedenen Gehirnarealen zurückzuführen. Die Quantifizierung der membran-assoziierten Proteinmengen von mGluR5, Stargazin und AMPA-Rezeptoren in den verschiedenen Gehirnregionen deutet darauf hin, dass PIST einen Einfluss auf die Proteinmengen dieser Rezeptoren an der Membran hat. So wurde für mGluR5 eine Reduzierung im Cortex und Striatum, aber nicht im Hippocampus und Hypothalamus detektiert. PIST hat also möglicherweise nicht in allen Gehirnregionen die gleiche Rolle. Für Stargazin und die damit assoziierten AMPA-Rezeptoren wurde ebenfalls eine reduzierte Proteinmenge an der Membran im Cortex, aber nicht im Hippocampus

beobachtet. Dies steht, zumindest im Hinblick auf den Cortex, im Einklang mit den von Cuadra *et al.* (2004) publizierten Daten, dass PIST durch die Interaktion mit Stargazin die Verankerung von AMPA-Rezeptoren an der postsynaptischen Membran fördert.<sup>[38,50]</sup>

Da die betrachteten Glutamaterezeptoren sowohl den MAP-Kinase sowie den AKT-Kinase Signalweg aktivieren können, wurden akute organotypische Hippocampuschnitte mittels zweier etablierter Stimulationsprotokolle behandelt, für die bekannt ist, dass sie bestimmte Formen der synaptischen Plastizität induzieren können. Das war zum einen die Stimulation mit Rolipram und Forskolin nach Otmakhov *et al.* (2004). Für diese Art der Stimulation ist bekannt, dass sie zu einer Erhöhung der Menge an cAMP führt, wie sie normalerweise durch den Ca<sup>2+</sup>-Einstrom nach der Aktivierung von NMDA-Rezeptoren beobachtet wird. So kann in Hippocampuschnitten chemisch eine bestimmte Form der synaptischen LTP induziert werden. Obwohl cAMP ein nachgeschaltetes Signalmolekül ist, ist hierbei die Induktion der LTP auch von der Aktivität der NMDA-Rezeptoren abhängig.<sup>[119]</sup> Die Behandlung mit DHPG, einem selektiven Agonisten des mGluR5, führt zur Induktion einer Form der synaptischen LTD.<sup>[118]</sup> Die Behandlung mit Rolipram und Forskolin führte zu einer starken Phosphorylierung der Proteinkinase ERK, wohingegen die Phosphorylierung von AKT deutlich reduziert war. Das hierbei kein Unterschied zwischen heterozygoten PIST *knockout*-Mäusen und den Kontrolltieren beobachtet wurde, deutet darauf hin, dass die durch NMDA-Rezeptoren vermittelte Signaltransduktion durch die Reduktion der Menge von PIST nicht verändert ist. Nach der Behandlung mit DHPG wurde eine starke Phosphorylierung von ERK beobachtet, wohingegen kein Effekt auf die Phosphorylierung von AKT beobachtet wurde. Beide Beobachtungen stehen im Einklang mit den Beobachtungen von Osterweil *et al.* (2012).<sup>[118]</sup> Hier wurde kein Unterschied zwischen den heterozygoten PIST *knockout*-Mäusen und den Kontrolltieren beobachtet. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die reduzierte Menge von mGluR5 keinen Einfluss auf die durch diesen Rezeptor vermittelte Signaltransduktion hat. Da DHPG auch mGluR1a aktivieren kann, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Aktivität von mGluR1a den Verlust von mGluR5 kompensiert. Darüber hinaus ist es auch möglich, dass die verbleibende Proteinmenge des mGluR5 ausreichend ist, um diesen Signalweg zu stimulieren.

Diese Daten stehen zum Teil nicht im Einklang mit Beobachtungen, die in den ersten Analysen von heterozygoten PIST *knockout*-Mäusen gemacht wurden. Damals wurde bei Analysen der Proteinmengen von PIST-Interaktionspartnern in der PSD von heterozygoten PIST *knockout*-Mäusen beobachtet, dass die Menge von AMPA-Rezeptoren erhöht, die Menge von NMDA-Rezeptoren reduziert und die Menge von mGluR5 unverändert war. Darüber hinaus wurde auch ein gravierender Unterschied bei der Analyse von Signalwegen beobachtet.<sup>[109]</sup> Bei den ersten Analysen wurde in Hippocampuslysaten eine starke Reduktion der Menge an phosphorylierten ERK und AKT detektiert, wohingegen in dieser

Arbeit in Stimulationsexperimenten mit akuten Schnitten lediglich eine tendenzielle Reduktion der Menge von phosphoryliertem AKT detektiert wurde. Zusammengenommen deutet dies darauf hin, dass möglicherweise der genetische Hintergrund für den unterschiedlichen Phänotyp verantwortlich ist. Die ersten Analysen wurden an Mäusen während der frühen Etablierungsphase dieser Linie durchgeführt, wohingegen die späteren Analysen mit Mäusen durchgeführt wurden, nachdem sich der genetische Hintergrund möglicherweise stabilisiert hatte.

Bei der Analyse von kultivierten Rattenneuronen in Bezug auf die membran-assoziierten Proteinmengen und die Aktivität von Signalwegen, konnten ähnliche Effekte wie in den akuten Schnitten beobachtet werden. So war auch in kultivierten Neuronen nach dem *PIST-knockdown* die Menge von mGluR5 an der Plasmamembran reduziert, während die Aktivität der ERK und AKT Signalwege im Vergleich zu den Kontrollen unverändert war. Es wurde aber hierbei genauso wie in den Hippocampuschnitten eine leichte Reduktion der Menge an phosphoryliertem AKT beobachtet. Neben der Reduktion der Menge von mGluR5 wurden in diesem System auch eine reduzierte Proteinmenge von NLGN1 beobachtet. Im Gegensatz dazu war die Menge des Transferrin-Rezeptors, der nicht mit PIST interagiert, unverändert. Dies spricht dafür, dass die beobachtete Reduzierung der mit PIST interagierenden Membranproteine durch den Verlust von PIST hervorgerufen wurde. Interessanterweise war auch die Menge von PSD-95 in der Membranfraktion reduziert. PSD-95 ist kein membrandurchspannendes Protein, weswegen angenommen werden kann, dass es nicht aufgrund einer Biotinylierung präzipitiert wurde, sondern mit seinen interagierenden Membranproteinen (z. B. NMDA-Rezeptoren; NLGN1) co-präzipitiert wurde. PSD-95 ist ein postsynaptisches Gerüstprotein, das für die Verankerung von einigen der PIST-Interaktionspartner an der Plasmamembran verantwortlich ist.<sup>[35]</sup> Durch die Reduzierung dieser Interaktionspartner an der Membran könnte auch die Menge von PSD-95, das mit diesen Proteinen an der Membran interagiert, reduziert sein. In diesem Zusammenhang ist auch zu berücksichtigen, dass PIST einen Einfluss auf die Interaktion zwischen PSD-95 und einigen Interaktionspartnern haben könnte. So wurde für den  $\beta$ 1AR gezeigt, dass PIST die Interaktion dieses Rezeptors mit PSD-95 fördert.<sup>[56,109]</sup> Woraus sich das Modell ableiten lässt, dass PIST seine Interaktionspartner im ZNS am TGN zurückhält, bis diese von einem weiteren PDZ-Domänenprotein aus der Verankerung am TGN gelöst und zur Membran transportiert werden. Dafür spricht auch, dass für andere PIST-Interaktionspartner gezeigt wurde, dass sie durch weitere PDZ-Domänenproteine aus der Verankerung durch PIST gelöst werden können.<sup>[33,44,56,64]</sup>

Neben der Proteinmenge an der Plasmamembran wurden in kortikalen Rattenneuronen auch zelluläre Proteinmengen der oben genannten Proteine bestimmt, wobei aber keine Unterschiede in den Mengen festgestellt wurden. Zumindest in diesem Modellsystem

sprechen diese Beobachtungen gegen eine Rolle von PIST bei der Steuerung seiner Interaktionspartner zu den Lysosomen, wie es im Falle des CFTR postuliert wurde.<sup>[44,58]</sup> Die Reduzierung der Rezeptormengen an der Membran wird also nicht durch eine generelle Reduzierung der Rezeptormengen hervorgerufen. Jedoch gab diese Beobachtung einen Hinweis darauf, dass PIST einen Effekt auf seine Interaktionspartner im ZNS hauptsächlich während der Entwicklung hat. In den dieser Arbeit vorangegangenen Analysen wurde im Cortex von heterozygoten PIST *knockout*-Mäusen eine Veränderung der zellulären Proteinmengen von  $\beta$ 1AR, AMPA-Rezeptoren und NMDA-Rezeptoren beobachtet<sup>[109]</sup>, wohingegen die zellulären Mengen in PIST-reduzierten Rattenneuronen unverändert war. Da sich diese Modelle durch den Zeitpunkt des Verlustes von PIST unterscheiden, ergibt sich der Verdacht, dass PIST hauptsächlich bei der Entwicklung von neuronalen Systemen eine Rolle spielt, aber nicht so starke Einflüsse in einem entwickelten System hat.

Die Beobachtungen, die im Rahmen dieser Arbeit an Gehirn-spezifischen konditionalen homozygoten PIST *knockout*-Mäusen ( $Gopc^{Tm1c/Tm1c+Cre}$ ) gemacht wurden, unterstützen diese Theorie. Die Proteinmengen von mGluR5, NLGN11, NMDA- und AMPA-Rezeptoren, Stargazin sowie GluR1 in Cortex- und Hippocampuslysaten waren im Vergleich zu den Kontrolltieren nicht signifikant verändert. Auch die Aktivität der MAPK und AKT-Signalwege, gemessen durch die Phosphorylierung der Proteinkinasen ERK und AKT, war hier unverändert. Darüber hinaus wurden auch die Proteinmengen dieser Proteine an der Membran sowie in der PSD bestimmt, wobei ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in den Mengen festgestellt wurde. Die konditionale PIST *knockout*-Mauslinie unterscheidet sich von der konventionellen *knockout*-Linie C57BL/6- $Gopc^{Tm1a}$  dadurch, dass der Verlust von PIST nach der Embryonalentwicklung und nach der ersten Phase der Synapsenbildung stattfindet. So wurde von Casanova *et al.* (2001) gezeigt, dass die unter der Kontrolle des CamKII-Promotors exprimierte Cre-Rekombinase postnatal ab Tag 3 nachgewiesen werden kann und ihr Expressionsmaximum an Tag 15 erreicht.<sup>[117]</sup> Das heißt, dass die Rekombination des Tm1c-Allels zum Tm1d-Allel in Neuronen von konditionalen *knockout*-Mäusen frühestens postnatal ab Tag 3 stattfinden kann. Es ist also anzunehmen, dass zu dem Zeitpunkt an dem PIST hier verloren geht, sich schon Synapsen ausgebildet haben und Membranrezeptoren korrekt zu den synaptischen Signaltransduktionskomplexen sortiert wurden.

Parallel zu den biochemischen Analysen wurden verschiedene, etablierte, verhaltensbiologische Analysen durchgeführt, um zu untersuchen, ob der Verlust von PIST zu veränderten Lern- und Gedächtnisvorgängen führt. Dafür wurden in Kooperation mit Dr. Fabio Morellini und Lynn Schau von der Forschergruppe Verhaltensbiologie am Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg männliche und weibliche Wildtyp- ( $Gopc^{Tm1c/Tm1c}$ ) und konditionale homozygote PIST *knockout*-Mäuse ( $Gopc^{Tm1c/Tm1c+Cre}$ ) aus der

C57BL/6-Gopc<sup>Tm1c</sup>-Mauslinie analysiert. Dabei wurden die Mäuse im *open field*-, *elevated plus maze*-, *Y-maze*-, *Morris water maze*- und *contextual fear conditioning*-Test beurteilt. In den meisten Tests wurden in den analysierten Parametern keine Unterschiede zwischen homozygoten PIST *knockout*-Mäusen und den Kontrolltieren beobachtet. Jedoch zeigten männliche und weibliche homozygote PIST *knockout*-Mäuse sowohl Defizite im Lernen von kontextbezogenen Erinnerungen, als auch in der Fähigkeit zwischen dem Kontext der Konditionierung und einem neuen Kontext zu unterscheiden.

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass der Verlust von PIST in differenzierten Systemen kaum einen Einfluss auf seine Interaktionspartner hat, während der Verlust von PIST in kultivierten Neuronen und in konventionalen heterozygoten PIST *knockout*-Mäusen zu Veränderungen im ZNS führt. In der von Yao et al. (2002) publizierte PIST *knockout*-Mauslinie hat der Verlust von PIST einen starken Einfluss auf die Ausbildung des Akrosoms während der Spermatogenese. Dies führte in homozygoten PIST *knockout*-Mäusen zur Infertilität von männlichen Mäusen<sup>[106]</sup>. Auch in diesen Mäusen ist ein Prozess betroffen, der während der Entwicklung bzw. Differenzierung stattfindet.

PIST könnte bei der Entwicklung des ZNS, insbesondere bei der Bildung von Synapsen eine Rolle spielen. In kultivierten Rattenneuronen wurde unter Bedingungen der Inhibierung der synaptischen Signaltransduktion eine erhöhte PIST-Proteinmenge detektiert. Durch weitere Analysen zeigte sich, dass diese Erhöhung durch die Inhibierung von NMDA-Rezeptoren mit AP-5 hervorgerufen wurde und vermutlich das Ergebnis einer verstärkten Transkription des PIST-Gens war. Diese Erkenntnis deutet auf einen negativen Einfluss der Aktivität von NMDA-Rezeptoren auf die Aktivität des für PIST kodierenden *Gopc*-Gens hin. Bei der Entwicklung von neuronalen Systemen, bei denen die Aktivität von NMDA-Rezeptoren noch gering oder basal ist, ist PIST also in größeren Mengen vorhanden und kann verstärkt seine Funktionen ausführen. Es ist bekannt, dass es durch die Aktivität der NMDA-Rezeptoren zu Veränderungen der Genexpression kommt und dies wichtig für die normale physiologische Funktion von neuronalen Systemen ist. Hingegen ist für die Funktion von NMDA-Rezeptoren unter basalen Bedingungen bis jetzt nur wenig bekannt. Es wurde aber gezeigt, dass es durch die Suppression der Aktivität von NMDA-Rezeptoren durch AP-5 ebenfalls zu einer veränderten Genexpression kommt.<sup>[121]</sup> Unter anderem werden Gene reguliert, die im Zusammenhang mit der Regulation von Klasse IIa Histondeacetylasen (HDACs), der Apoptose und der synaptischen Signaltransduktion stehen. Dazu gehört z. B. HDAC4. So kann der *Knockdown* von HDAC4 einen Teil der durch AP-5 induzierten Veränderungen der Genexpression verhindern. Daher wurde angenommen, dass die basale, aber nicht die erhöhte Aktivität von NMDA-Rezeptoren die Regulation der Genexpression einiger der betroffenen Gene über HDAC4 vermittelt.<sup>[121]</sup>

Eine weitere Möglichkeit ist, dass die veränderte PIST-Proteinmenge eine Rolle bei dem sogenannten *synaptic scaling* spielt. *Synaptic scaling* beschreibt eine Form der synaptischen Plastizität, die Neuronen und Neuralnetzwerke befähigt ihre Aktivität in einem gewissen dynamischen Bereich konstant zu halten. So wird eine neuronale Hyper- oder Hypoaktivität verhindert. Die chronische Inhibition von exzitatorischen Synapsen führt zu einer Erhöhung der synaptischen Signaltransduktion, wohingegen es durch anhaltende Aktivierung zu einer Reduzierung kommt. Dies wird z. B. durch das hoch- oder runterregulieren von bestimmten AMPA-Rezeptoren erreicht.<sup>[122,123]</sup>

Dass in den verhaltensbiologischen Analysen von konditionalen homozygoten PIST *knockout*-Mäusen Defizite in dem Angst bezogenen Verhalten beobachtet wurden, wie sie zuvor z. B. auch schon in mGluR5 defizienten Mauslinien beobachtet wurde<sup>[82,83]</sup>, führt zu der Frage, ob PIST eine Rolle bei Prozessen der synaptischen Plastizität spielt.

Werden die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse vorsichtig in dem Kontext mit den insgesamt zur Verfügung stehenden Daten betrachtet, lässt sich über die Funktion von PIST im ZNS folgende Hypothese formulieren. In Neuronen wurde PIST hauptsächlich im TGN im Soma sowie in Golgi-Ausläufern beschrieben.<sup>[53,109]</sup> Im Gegensatz zu Cuadra *et al.* (2004) wurde hier jedoch kein PIST in Synapsen detektiert<sup>[50]</sup>. Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde PIST in kultivierten Rattenneuronen in perinukleären Strukturen detektiert, die sich zum Teil in einen Dendriten erstecken. Daher kann angenommen werden, dass PIST mit seinen Interaktionspartnern nur transient am TGN interagiert. Dabei werden die Interaktionspartner höchstwahrscheinlich durch PIST am TGN zurückgehalten, wodurch die weitere Interaktion dieser Proteine mit anderen PDZ-Domänenproteinen beeinflusst wird. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass die Interaktionspartner korrekt transportiert werden. Daraus kann geschlossen werden, dass die Balance zwischen PIST und weiteren PDZ-Domänenproteinen für den Transport entscheidend ist. Durch die Analyse von verschiedenen neuronalen PIST-defizienten Modellen zeigte sich hier nun, dass die von PIST vermittelten Effekte maßgeblich in neuronalen Systemen auftreten, die sich in der Entwicklung befinden oder die einer Veränderung unterzogen werden. In stabilen Systemen sind die Effekte dagegen nur minimal. Dies spricht dafür, dass die Funktion von PIST im Gehirn durch andere Mechanismen kompensiert werden kann. Dies bedarf jedoch weiterer Evaluationen/Untersuchungen in einem geeigneten PIST-defizienten System, wie es jetzt durch die konventionelle C57BL/6-Gopc<sup>Tm1e</sup> PIST *knockout*-Mauslinie zur Verfügung steht.

## 7 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde beobachtet, dass der späte Verlust von PIST kaum einen Einfluss auf einige synaptisch lokalisierte Interaktionspartner im Gehirn von PIST *knockout*-Mäusen hat. Anders verhielt es sich in Modellen, bei denen die Menge von PIST in einer frühen Entwicklungsphase verringert war. In diesen Modellen wurde beobachtet, dass PIST die Verfügbarkeit von einigen Interaktionspartnern (mGluR5, Stargazin, NLGN1 und NLGN2) an der Zellmembran fördert. Hierdurch ergibt sich die Frage, ob PIST hauptsächlich während der Differenzierung und Entwicklung von Synapsen eine Rolle spielt. Deswegen sollte zunächst die entwicklungspezifische Expression von PIST im Gehirn von Mäusen von frühen Embryonalstadien an analysiert werden. Dadurch wird man einen Einblick erhalten, ob PIST möglicherweise in verschiedenen Stadien der Embryonalentwicklung unterschiedlich reguliert ist.

Das in konventionellen PIST *knockout*-Mäusen sowie im vergleichbaren Neuronen-Modell Effekte in Bezug auf die Lokalisierung einiger PIST Interaktionspartner beobachtet wurden, lässt vermuten, dass diese in ähnlicher und verstärkter Form in homozygoten PIST *knockout*-Mäusen auftreten könnten. Da nun auch eine konstitutive PIST *knockout*-Mauslinie (C57BL/6-Gopc<sup>Tm1e</sup>) mit einer höheren Anzahl an homozygoten *Knockouts* zur Verfügung steht, liegt es nahe diese Mäuse als nächstes zu untersuchen. Hier sollte zunächst die Analyse von Interaktionspartnern an der Membran und in der PSD im Fokus stehen.

Da für PIST viele Interaktionspartner bekannt sind, die in unterschiedlichen Systemen unterschiedlich beeinflusst werden, lässt sich vermuten, dass PIST möglicherweise nicht für alle Interaktionspartner gleichermaßen wichtig ist und einige Interaktionen möglicherweise redundant sind. Man sollte daher analysieren, welche Interaktionspartner von PIST im Gehirn relevant sind. Dafür würden sich zunächst Immunpräzipitationsexperimente von PIST aus Gehirngewebelysaten eignen, um einen Einblick zu erhalten, welche Interaktionspartner hauptsächlich interagieren und daher gezielt analysiert werden sollten.

Die Beobachtung, dass PIST nach Inhibition der NMDA-Rezeptoren in kultivierten Neuronen hochreguliert wird, gibt einen Hinweis darauf, dass PIST möglicherweise bei Prozessen der synaptischen Plastizität eine Rolle spielt. Einige elektrophysiologische Untersuchungen an Gehirnschnitten von PIST-defizienten Mäusen wurden von Kooperationspartnern in Magdeburg bereits begonnen. Hier wird untersucht, ob z. B. das *synaptic scaling*, LTP und LTD durch den Verlust von PIST verändert sind. Dies sollte sowohl an konditionalen (später Verlust von PIST) als auch an konstitutiven (früher Verlust von PIST) *knockout*-Mäusen durchgeführt werden.

#### IV. Literaturverzeichnis

1. Hebert, D. N. & Molinari, M. In and Out of the ER: Protein Folding, Quality Control, Degradation, and Related Human Diseases. *Physiol. Rev.* 87, 1377–1408 (2007).
2. Barlowe, C. K. & Miller, E. a. Secretory protein biogenesis and traffic in the early secretory pathway. *Genetics* 193, 383–410 (2013).
3. Appenzeller-Herzog, C. The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function. *J. Cell Sci.* 119, 2173–2183 (2006).
4. Watson, P. & Stephens, D. J. ER-to-Golgi transport: Form and formation of vesicular and tubular carriers. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1744, 304–315 (2005).
5. Martínez-Menárguez, J. A. Intra-Golgi Transport: Roles for Vesicles, Tubules, and Cisternae. *ISRN Cell Biol.* 2013, 1–15 (2013).
6. Potelle, S., Klein, A. & Foulquier, F. Golgi post-translational modifications and associated diseases. *J. Inherit. Metab. Dis.* 38, 741–751 (2015).
7. Jackson, C. L. Mechanisms of transport through the Golgi complex. *J. Cell Sci.* 122, 443–452 (2009).
8. Kienzle, C. & von Blume, J. Secretory cargo sorting at the trans-Golgi network. *Trends Cell Biol.* 24, 584–593 (2014).
9. Doherty, G. J. & McMahon, H. T. Mechanisms of endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 857–902 (2009).
10. Grant, B. D. & Donaldson, J. G. Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 597–608 (2009).
11. Bonifacino, J. S. & Rojas, R. Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 568–579 (2006).
12. Bonifacino, J. S. & Hurley, J. H. Retromer. *20*, 427–436 (2010).
13. Stenmark, H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 513–25 (2009).
14. D'Souza-Schorey, C. & Chavrier, P. ARF proteins: Roles in membrane traffic and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 347–358 (2006).
15. Bonifacino, J. S. & Glick, B. S. The Mechanisms of Vesicle Budding and Fusion. *Cell* 116, 153–166 (2004).
16. Chen, Y. a & Scheller, R. H. SNARE-mediated membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 98–106 (2001).
17. Bonifacino, J. S. Adaptor proteins involved in polarized sorting. *J. Cell Biol.* 204, 7–17 (2014).
18. Cho, K. O., Hunt, C. A. & Kennedy, M. B. The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the drosophila discs-large tumor suppressor protein. *Neuron* 9, 929–942 (1992).
19. Kennedy, M. B. Origin of PDZ (DHR, GLGF) domains. *Trends Biochem. Sci.* 20, 350 (1995).
20. Ponting, C. P. Evidence for PDZ domains in bacteria, yeast, and plants. *Protein Sci.* 6, 464–468 (2008).
21. Liao, D. I., Qian, J., Chisholm, D. A., Jordan, D. B. & Diner, B. A. Crystal structures of the photosystem II D1 C-terminal processing protease. *Nat. Struct. Biol.* 7, 749–753 (2000).
22. Harris, B. Z. & Lim, W. a. Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *J. Cell Sci.* 114, 3219–3231 (2001).

23. Kornau, H. C., Schenker, L. T., Kennedy, M. B. & Seeburg, P. H. Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PDS-95. *Science* (80-. ). 269, 1737–1740 (1995).
24. Kim, E., Niethammer, M., Rothschild, A., Nung Jan, Y. & Sheng, M. Clustering of Shaker-type K<sup>+</sup> channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases. *Nature* 378, 85–88 (1995).
25. Songyang, Z. Recognition of Unique Carboxyl-Terminal Motifs by Distinct PDZ Domains. *Science* (80-. ). 275, 73–77 (1997).
26. Karthikeyan, S., Leung, T. & Ladas, J. A. A. Structural Basis of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger Regulatory Factor PDZ1 Interaction with the Carboxyl-terminal Region of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. *J. Biol. Chem.* 276, 19683–19686 (2001).
27. Doyle, D. A. *et al.* Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein- binding domain: Molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell* 85, 1067–1076 (1996).
28. Tochio, H., Hung, F., Li, M., Bredt, D. S. & Zhang, M. Solution structure and backbone dynamics of the second PDZ domain of postsynaptic density-95. *J. Mol. Biol.* 295, 225–237 (2000).
29. Zeng, M. *et al.* A binding site outside the canonical PDZ domain determines the specific interaction between Shank and SAPAP and their function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201523265 (2016). doi:10.1073/pnas.1523265113
30. Hall, R. A. *et al.* The  $\beta$ 2-adrenergic receptor interacts with the Na(+)/H(+)-exchanger regulatory factor to control Na(+)/H(+) exchange. *Nature* 392, 626–630 (1998).
31. Bjerggaard, C. Surface Targeting of the Dopamine Transporter Involves Discrete Epitopes in the Distal C Terminus But Does Not Require Canonical PDZ Domain Interactions. *J. Neurosci.* 24, 7024–7036 (2004).
32. Doczi, M. A., Damon, D. H. & Morielli, A. D. A C-terminal PDZ binding domain modulates the function and localization of Kv1.3 channels. *Exp. Cell Res.* 317, 2333–2341 (2011).
33. Bauch, C., Koliwer, J., Buck, F., Hönck, H. H. & Kreienkamp, H. J. Subcellular sorting of the G-protein coupled mouse somatostatin receptor 5 by a network of PDZ-domain containing proteins. *PLoS One* 9, 1–10 (2014).
34. Brône, B. & Eggermont, J. PDZ proteins retain and regulate membrane transporters in polarized epithelial cell membranes. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 288, C20–C29 (2005).
35. Feng, W. & Zhang, M. Organization and dynamics of PDZ-domain-related supramodules in the postsynaptic density. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 87–99 (2009).
36. Boeckers, T. M. The postsynaptic density. *Cell Tissue Res.* 326, 409–422 (2006).
37. Irie, M. Binding of Neuroligins to PSD-95. *Science* (80-. ). 277, 1511–1515 (1997).
38. Chen, L. *et al.* Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. *Nature* 408, 936–43 (2000).
39. Malenka, R. C. & Bear, M. F. LTP and LTD: An embarrassment of riches. *Neuron* 44, 5–21 (2004).
40. Kindler, S. & Kreienkamp, H.-J. The Role of the Postsynaptic Density in the Pathology of the Fragile X Syndrome. in *Results and problems in cell differentiation* 54, 61–80 (2012).
41. Grabrucker, A. M., Schmeisser, M. J., Schoen, M. & Boeckers, T. M. Postsynaptic ProSAP/Shank scaffolds in the cross-hair of synaptopathies. *Trends Cell Biol.* 21, 594–603 (2011).

42. Neudauer, C. L., Joberty, G. & Macara, I. G. PIST: a novel PDZ/coiled-coil domain binding partner for the rho-family GTPase TC10. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280, 541–547 (2001).
43. Yao, R., Maeda, T., Takada, S. & Noda, T. Identification of a PDZ domain containing Golgi protein, GOPC, as an interaction partner of frizzled. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286, 771–778 (2001).
44. Cheng, J. *et al.* A golgi-associated PDZ domain protein modulates cystic fibrosis transmembrane regulator plasma membrane expression. *J. Biol. Chem.* 277, 3520–3529 (2002).
45. Charest, A., Lane, K., McMahon, K. & Housman, D. E. Association of a Novel PDZ Domain-containing Peripheral Golgi Protein with the Q-SNARE (Q-soluble N-Ethylmaleimide-sensitive Fusion Protein (NSF) Attachment Protein Receptor) Protein Syntaxin 6. *J. Biol. Chem.* 276, 29456–29465 (2001).
46. Li, X., Zhang, J., Cao, Z., Wu, J. & Shi, Y. Solution structure of GOPC PDZ domain and its interaction with the C-terminal motif of neuroligin. *Protein Sci.* 15, 2149–58 (2006).
47. Bergbrede, T. *et al.* Biophysical analysis of the interaction of Rab6a GTPase with its effector domain. *J. Biol. Chem.* 284, 2628–2635 (2009).
48. Hicks, S. W. & Machamer, C. E. Isoform-specific interaction of golgin-160 with the Golgi-associated protein PIST. *J. Biol. Chem.* 280, 28944–28951 (2005).
49. Yue, Z. *et al.* A novel protein complex linking the  $\delta 2$  glutamate receptor and autophagy: Implications for neurodegeneration in lurcher mice. *Neuron* 35, 921–933 (2002).
50. Cuadra, a. E. AMPA Receptor Synaptic Targeting Regulated by Stargazin Interactions with the Golgi-Resident PDZ Protein nPIST. *J. Neurosci.* 24, 7491–7502 (2004).
51. Ito, H. *et al.* Possible interaction of a Rho effector, Rhotekin, with a PDZ-protein, PIST, at synapses of hippocampal neurons. *Neurosci. Res.* 56, 165–171 (2006).
52. Herrmann, S., Ninkovic, M., Kohl, T. & Pardo, L. a. PIST (GOPC) modulates the oncogenic voltage-gated potassium channel KV10.1. *Front. Physiol.* 4 AUG, 1–10 (2013).
53. Chen, A. *et al.* Regional and subcellular distribution of the receptor-targeting protein PIST in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 520, 889–913 (2012).
54. Horton, A. C. & Ehlers, M. D. Dual modes of endoplasmic reticulum-to-Golgi transport in dendrites revealed by live-cell imaging. *J. Neurosci.* 23, 6188–6199 (2003).
55. Hanus, C. & Ehlers, M. D. Secretory outposts for the local processing of membrane cargo in neuronal dendrites. *Traffic* 9, 1437–1445 (2008).
56. Koliwer, J., Park, M., Bauch, C., Von Zastrow, M. & Kreienkamp, H. J. The golgi-associated PDZ domain protein PIST/GOPC stabilizes the  $\beta 1$ -Adrenergic receptor in intracellular compartments after internalization. *J. Biol. Chem.* 290, 6120–6129 (2015).
57. Cheng, J., Wang, H. & Guggino, W. B. Regulation of cystic fibrosis transmembrane regulator trafficking and protein expression by a rho family small GTPase TC10. *J. Biol. Chem.* 280, 3731–3739 (2005).
58. Cheng, J., Wang, H. & Guggino, W. B. Modulation of Mature Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator Protein by the PDZ Domain Protein CAL. *J. Biol. Chem.* 279, 1892–1898 (2004).
59. Jie Cheng, Valeriu Cebotaru, Liudmila Cebotaru, and W. B. G. Syntaxin 6 and CAL Mediate the Degradation of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. *Mol. Biol. Cell* 21, 1178–1187 (2010).

60. Gentzsch, M. *et al.* The PDZ-binding chloride channel CIC-3B localizes to the Golgi and associates with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-interacting PDZ proteins. *J. Biol. Chem.* 278, 6440–6449 (2003).
61. Li, M., Soroka, C. J., Harry, K. & Boyer, J. L. CFTR-associated ligand is a negative regulator of Mrp2 expression. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 312, C40–C46 (2017).
62. Pelaseyed, T. & Hansson, G. C. CFTR anion channel modulates expression of human transmembrane mucin MUC3 through the PDZ protein GOPC. *J. Cell Sci.* 124, 3074–3083 (2011).
63. Nie, H. *et al.* Plasma Membrane Targeting of Protocadherin 15 Is Regulated by the Golgi-Associated Chaperone Protein PIST. 2016, 1–10 (2016).
64. Xu, Z., Oshima, K. & Heller, S. PIST regulates the intracellular trafficking and plasma membrane expression of Cadherin 23. *BMC Cell Biol.* 11, 80 (2010).
65. Siemens, J. *et al.* Cadherin 23 is a component of the tip link in hair-cell stereocilia. *Nature* 428, 950 (2004).
66. Xu, Z., Peng, A. W., Oshima, K. & Heller, S. MAGI-1, A Candidate Stereociliary Scaffolding Protein, Associates with the Tip-Link Component Cadherin 23. *J. Neurosci.* 28, 11269–11276 (2008).
67. Siemens, J. *et al.* The Usher syndrome proteins cadherin 23 and harmonin form a complex by means of PDZ-domain interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 14946–14951 (2002).
68. Lu, R., Stewart, L. & Wilson, J. M. Scaffolding protein GOPC regulates tight junction structure. *Cell Tissue Res.* 360, 321–332 (2015).
69. Wenthe, W., Stroh, T., Beaudet, A., Richter, D. & Kreienkamp, H. J. Interactions with PDZ domain proteins PIST/GOPC and PDZK1 regulate intracellular sorting of the somatostatin receptor subtype 5. *J. Biol. Chem.* 280, 32419–32425 (2005).
70. Wenthe, W. *et al.* The PDZ/coiled-coil domain containing protein PIST modulates insulin secretion in MIN6 insulinoma cells by interacting with somatostatin receptor subtype 5. *FEBS Lett.* 579, 6305–6310 (2005).
71. He, J., Bellini, M., Xu, J., Castleberry, A. M. & Hall, R. a. Interaction with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-associated ligand (CAL) inhibits  $\alpha$ 1-adrenergic receptor surface expression. *J. Biol. Chem.* 279, 50190–50196 (2004).
72. Hammad, M. M., Dunn, H. a., Walther, C. & Ferguson, S. S. G. Role of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-associated ligand (CAL) in regulating the trafficking and signaling of corticotropin-releasing factor receptor 1. *Cell. Signal.* 27, 2120–2130 (2015).
73. Joubert, P. E. *et al.* Autophagy Induction by the Pathogen Receptor CD46. *Cell Host Microbe* 6, 354–366 (2009).
74. Schumacher, S. *et al.* Chicken acidic leucine-rich EGF-like domain containing brain protein (CALEB), a neural member of the EGF family of differentiation factors, is implicated in neurite formation. *J. Cell Biol.* 136, 895–906 (1997).
75. Hassel, B., Schreff, M., Stübe, E. M., Blauch, U. & Schumacher, S. CALEB/NGC interacts with the Golgi-associated protein PIST. *J. Biol. Chem.* 278, 40136–40143 (2003).
76. Conn, P. J. & Pin, J. P. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37, 205–237 (1997).
77. Zhang, J. *et al.* A novel association of mGluR1a with the PDZ scaffold protein CAL modulates receptor activity. *FEBS Lett.* 582, 4117–4124 (2008).
78. Cheng, S. *et al.* The PDZ domain protein CAL interacts with mGluR5a and modulates receptor expression. *J. Neurochem.* 112, 588–598 (2010).

79. Abe, T. *et al.* Molecular characterization of a novel metabotropic glutamate receptor mGluR5 coupled to inositol phosphate/Ca<sup>2+</sup> signal transduction. *J. Biol. Chem.* 267, 13361–13368 (1992).
80. Niswender, C. M., Jones, C. K. & Conn, P. J. New therapeutic frontiers for metabotropic glutamate receptors. *Curr. Top. Med. Chem.* 5, 847–857 (2005).
81. Huber, K. M. *et al.* Chemical Induction of mGluR5- and Protein Synthesis – Dependent Long-Term Depression in Hippocampal Area CA1 Chemical Induction of mGluR5- and Protein Synthesis – Dependent Long-Term Depression in Hippocampal Area CA1. *J. Neurophysiol.* 86, 321–325 (2001).
82. Lu, Y. M. *et al.* Mice lacking metabotropic glutamate receptor 5 show impaired learning and reduced CA1 long-term potentiation (LTP) but normal CA3 LTP. *J. Neurosci.* 17, 5196–205 (1997).
83. Xu, J., Zhu, Y., Contractor, A. & Heinemann, S. F. mGluR5 Has a Critical Role in Inhibitory Learning. *J. Neurosci.* 29, 3676–3684 (2009).
84. Hou, L. Activation of the Phosphoinositide 3-Kinase-Akt-Mammalian Target of Rapamycin Signaling Pathway Is Required for Metabotropic Glutamate Receptor-Dependent Long-Term Depression. *J. Neurosci.* 24, 6352–6361 (2004).
85. Wang, J. Q., Fibuch, E. E. & Mao, L. Regulation of mitogen-activated protein kinases by glutamate receptors. *J. Neurochem.* 100, 1–11 (2007).
86. Thandi, S., Blank, J. L. & Challiss, R. A. J. Group-I metabotropic glutamate receptors, mGlu1a and mGlu5a, couple to extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation via distinct, but overlapping, signalling pathways. *J. Neurochem.* 83, 1139–1153 (2002).
87. Choe, E. S. & Wang, J. Q. Group I metabotropic glutamate receptors control phosphorylation of CREB, Elk-1 and ERK via a CaMKII-dependent pathway in rat striatum. *Neurosci. Lett.* 313, 129–132 (2001).
88. Xiao, B., Tu, J. C. & Worley, P. F. Homer: a link between neural activity and glutamate receptor function. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 370–374 (2000).
89. Kornau, H. C., Seeburg, P. H. & Kennedy, M. B. Interaction of ion channels and receptors with PDZ domain proteins. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7, 368–373 (1997).
90. Garner, C. C., Nash, J. & Huganir, R. L. PDZ domains in synapse assembly and signalling. *Trends Cell Biol.* 10, 274–280 (2000).
91. Song, I. & Huganir, R. L. Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 25, 578–588 (2002).
92. Tomita, S., Fukata, M., Nicoll, R. A. & Brecht, D. S. Dynamic interaction of stargazin-like TARPs with cycling AMPA receptors at synapses. *Science* 303, 1508–1511 (2004).
93. Letts, V. A. *et al.* The mouse stargazer gene encodes a neuronal Ca<sup>2+</sup>-channel gamma subunit. *Nat. Genet.* 19, 340–347 (1998).
94. Hashimoto, K. *et al.* Impairment of AMPA Receptor Function in Cerebellar Granule Cells of Ataxic Mutant Mouse Stargazer. *J. Neurosci.* 19, 6027–6036 (1999).
95. Liu, X.-B. Switching of NMDA Receptor 2A and 2B Subunits at Thalamic and Cortical Synapses during Early Postnatal Development. *J. Neurosci.* 24, 8885–8895 (2004).
96. English J.D & Sweatt J.D. Activation of p42 Mitogen- activated Protein Kinase in Hippocampal Long Term Potentiation. *J. Biol. Chem.* 271, 24329–24332 (1996).
97. Xilouri, M. & Papazafiri, P. Induction of Akt by endogenous neurosteroids and calcium sequestration in P19 derived neurons. *Neurotox. Res.* 13, 209–219 (2008).
98. Ichtchenko, K. *et al.* Neuroligin 1: A splice site-specific ligand for  $\beta$ -neurexins. *Cell* 81,

- 435–443 (1995).
99. Song, J. Y., Ichtchenko, K., Südhof, T. C. & Brose, N. Neuroligin 1 is a postsynaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 1100–1105 (1999).
  100. Varoqueaux, F., Jamain, S. & Brose, N. Neuroligin 2 is exclusively localized to inhibitory synapses. *Eur. J. Cell Biol.* 83, 449–456 (2004).
  101. Ichtchenko, K., Nguyen, T. & Südhof, T. C. Structures, alternative splicing, and neurexin binding of multiple neuroligins. *J. Biol. Chem.* 271, 2676–2682 (1996).
  102. Jamain, S. *et al.* Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat. Genet.* 34, 27–29 (2003).
  103. Dresbach, T., Neeb, A., Meyer, G., Gundelfinger, E. D. & Brose, N. Synaptic targeting of neuroligin is independent of neurexin and SAP90/PSD95 binding. *Mol. Cell. Neurosci.* 27, 227–235 (2004).
  104. Schapitz, I. U. *et al.* Neuroligin 1 Is Dynamically Exchanged at Postsynaptic Sites. *J. Neurosci.* 30, 12733–12744 (2010).
  105. Meyer, G., Varoqueaux, F., Neeb, A., Oschlies, M. & Brose, N. The complexity of PDZ domain-mediated interactions at glutamatergic synapses: A case study on neuroligin. *Neuropharmacology* 47, 724–733 (2004).
  106. Yao, R. *et al.* Lack of acrosome formation in mice lacking a Golgi protein, GOPC. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 11211–6 (2002).
  107. Ito, C. *et al.* Failure to assemble the peri-nuclear structures in GOPC deficient spermatids as found in round-headed spermatozoa. *Arch. Histol. Cytol.* 67, 349–60 (2004).
  108. Suzuki-Toyota, F. *et al.* The coiled tail of the round-headed spermatozoa appears during epididymal passage in GOPC-deficient mice. *Arch. Histol. Cytol.* 67, 361–71 (2004).
  109. Koliwer, J. Die Rolle des PDZ-Domänenproteins PIST bei der subzellulären Sortierung von Neurotransmitterrezeptoren. *Dissertation* (2014).
  110. Löffler, M. G. *et al.* Enhanced fasting glucose turnover in mice with disrupted action of TUG protein in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 288, 20135–20150 (2013).
  111. Bogan, J. S. *et al.* Endoproteolytic cleavage of TUG protein regulates GLUT4 glucose transporter translocation. *J. Biol. Chem.* 287, 23932–23947 (2012).
  112. Nishiyama, J. *et al.* Reevaluation of neurodegeneration in lurcher mice: constitutive ion fluxes cause cell death with, not by, autophagy. *J. Neurosci.* 30, 2177–2187 (2010).
  113. Charest, A. *et al.* Fusion of FIG to the receptor tyrosine kinase ROS in a glioblastoma with an interstitial del(6)(q21q21). *Genes Chromosom. Cancer* 37, 58–71 (2003).
  114. Suehara, Y. *et al.* Identification of KIF5B-RET and GOPC-ROS1 fusions in lung adenocarcinomas through a comprehensive mRNA-based screen for tyrosine kinase fusions. *Clin. Cancer Res.* 18, 6599–6608 (2012).
  115. Kiehna, E. N. *et al.* Novel GOPC(FIG)-ROS1 fusion in a pediatric high-grade glioma survivor. *J Neurosurg Pediatr* 1–5 (2017). doi:10.3171/2017.2.PEDS16679.
  116. Rodríguez, C. I. *et al.* High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat. Genet.* 25, 139–140 (2000).
  117. Casanova, E. *et al.* A CamKII $\alpha$  iCre BAC allows brain-specific gene inactivation. *Genesis* 31, 37–42 (2001).
  118. Osterweil, E. K., Krueger, D. D., Reinhold, K. & Bear, M. F. Hypersensitivity to mGluR5 and ERK1/2 leads to excessive protein synthesis in the hippocampus of a mouse model of fragile X syndrome. 30, 15616–15627 (2012).

119. Otmakhov, N. *et al.* Forskolin-induced LTP in the CA1 hippocampal region is NMDA receptor dependent. *J. Neurophysiol.* 91, 1955–1962 (2004).
120. Grabrucker, A., Vaida, B., Bockmann, J. & Boeckers, T. M. Synaptogenesis of hippocampal neurons in primary cell culture. *Cell Tissue Res.* 338, 333–341 (2009).
121. Chen, Y., Wang, Y., Modrusan, Z., Sheng, M. & Kaminker, J. S. Regulation of Neuronal Gene Expression and Survival by Basal NMDA Receptor Activity: A Role for Histone Deacetylase 4. *J. Neurosci.* 34, 15327–15339 (2014).
122. Turrigiano, G. G. The Self-Tuning Neuron: Synaptic Scaling of Excitatory Synapses. *Cell* 135, 422–435 (2008).
123. Chowdhury, D. & Hell, J. W. Homeostatic synaptic scaling: molecular regulators of synaptic AMPA-type glutamate receptors. *F1000Research* 7, 234 (2018).

## V. Abbildungsverzeichnis

**Abbildung 1-1:** Modifiziert nach Bonifacino, J. S. & Glick, B. S. The Mechanisms of Vesicle Budding and Fusion. *Cell* 116, 153–166 (2004).

**Abbildung 1-2:** Modifiziert nach Feng, W. & Zhang, M. Organization and dynamics of PDZ-domain-related supramodules in the postsynaptic density. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 87–99 (2009).

**Abbildung 1-3:** Modifiziert nach Fanning, A. S. & Anderson, J. M. Protein-protein interactions: PDZ domain networks. *Curr. Biol.* 6, 1385–1388 (1996).

**Abbildung 5-1:** Modifiziert nach

[http://www.mousephenotype.org/data/alleles/MGI:2149946/tm1a\(EUCOMM\)Wtsi](http://www.mousephenotype.org/data/alleles/MGI:2149946/tm1a(EUCOMM)Wtsi)

Alle weiteren Abbildungen wurden eigens für diese Arbeit erstellt.

## VI. Abkürzungsverzeichnis

Die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen und einige Proteinbezeichnungen sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

**Tabelle V-1: Auflistung der verwendeten Abkürzungen**

Abkürzung	Vollständig
ACSF	<i>artificial cerebrospinal fluid</i> = artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit
AKT	Proteinbezeichnung für die Proteinkinasen B
pAKT	Proteinbezeichnung für die phosphorylierte form von AKT
ANOVA ( <i>one-way / two-way</i> )	<i>analysis of variance</i> = einfaktorielle / zweifaktorielle Varianzanalyse
AMPA	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i> (AMPA)-Rezeptor
APS	Ammoniumperoxodisulfa
AP-5	2-Amino-5-phosphonovaleriansäure
BES	N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-2-amino-ethansulfonsäure
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BSS	<i>Balanced Salt Solution</i> = balancierte Salzlösung
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CAL	<i>CFTR-associated ligand</i>
C <sub>T</sub>	<i>threshold cycle</i> = Zyklus-Schwellenwert
cDNA	<i>complementary DNA</i> = komplementäre DNA
CNQX	6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylidole
dATP	Desoxyadenosintri-phosphat
dCTP	Desoxycytidintri-phosphat
dGTP	Desoxyguanosintri-phosphat
ddNTPs	2',3'-Dideoxyribonukleosidtriphosphate
DHPG	(RS)-3,5-Dihydroxyphenylglycine
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> = Dulbeccos modifiziert Egaes Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotide
DTT	Dithiotreitol
dTTP	Desoxythymidintri-phosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
engl.	Englisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Proteinbezeichnung für die <i>extracellular signal-regulated kinases</i>
pERK	Proteinbezeichnung für die phosphorylierte Form von ERK
FIG	<i>Fused in Glioblastoma</i>
GAPDH	Proteinbezeichnung für Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP / eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i> = Grün-fluoreszierendes Protein
GOPC	<i>Golgi-associated PDZ and coiled-coil motif-containing protein</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> = Durchflusszytometrie
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> = Fetales Kälberserum
g	Erdschwerebeschleunigung
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i> = Hanks balancierte Salzlösung
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	<i>Horse Raddish Peroxidase</i> = Meerrettichperoxidase
IZ	Immunzytochemie
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
KCM	Kalium, Calcium, Magnesium
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
LB-Medium	<i>lysogeny broth</i> -Medium
LTD	<i>long-term depression</i> = Langzeitdepression
LTP	<i>long-term potentiation</i> = Langzeitpotenzierung
MAP2	Proteinbezeichnung für das Mikrotubuli-assozierte Protein 2
MAPK	Bezeichnung für Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MEM	<i>Minimum Essential Media</i> = Minimalmedium

MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
mGluR5	Proteinbezeichnung für den metabotropen Glutamatrezeptor 5
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min	Minute
mRNA	<i>messenger RNA</i> = Boten-RNA
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NCBI	<i>National Center for Biotechnolog Information</i>
NLGN	Neuroigin
NMDAR	<i>N-methyl-D-aspartate</i> (NMDA)-Rezeptor
NP-40	Nonidet P-40
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> = Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase Chain Reaktion</i> = Polymerasekettenreaktion
pDNA	Plasmid-DNA
PDZ-Domäne	<i>postsynaptic density 95/disc large/zonula occludens 1</i> - Domäne
Pen/Strp	Penicillin/Streptomycin
PEG	Polyethylenglycol
PLL	Poly-L-Lysin
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
PIST	Das <i>PDZ protein interacting specifically with Tc10</i>
PSD	<i>postsynaptic density</i> = postsynaptische Dichte
qRT-PCR	<i>quantitativ real time PCR</i> = quantitative Echtzeit-PCR
RNA	Ribonukleinsäure
<i>rpm</i>	<i>revolutions per minute</i> = Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SB	<i>Super Broth</i>
SD	<i>standard deviation</i> = Standardabweichung
SDS	<i>sodium lauryl sulfate</i> = Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>standard error of the mean</i> = Standardfehler
TBS	<i>TRIS-buffered saline</i> = TRIS-gepufferte Salzlösung
TBS-T	TRIS-gepufferte Salzlösung mit Tween20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamine
TFR	Transferrin-Rezeptor
TGN	trans-Golgi Netzwerk
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTX	Tetrodotoxin
v/v	Volumenteil je Volumen
w/v	Gewichtsteil je Volumen
WB	<i>Western Blot</i>
WT	Wildtyp

## **VII. Sicherheit und Entsorgung**

Alle Versuche wurden in Laboren der Sicherheitsstufe 1 und 2 durchgeführt. Der Umgang mit Chemikalien und Reagenzien erfolgte unter der Beachtung der jeweiligen, aktuellen Sicherheitsdatenblätter. Substanzen deren Gefährdungspotenzial noch nicht ermittelt wurde, wurden als potenziell gesundheitsschädlich behandelt. Der Umgang mit Genveränderten Organismen (GVOs) wie z. B. Lentiviren erfolgten entsprechend der Sicherheitsrichtlinien. Alle Chemikalien, Lösungen, Puffer, Materialien und Komponenten der Versuchstiere wurden entsprechend der Entsorgungsrichtlinien des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf entsorgt. Alle Bakterien- und Zellkulturen sowie kontaminierte Materialien wurden vor der Entsorgung autoklaviert.

## **VIII. Lebenslauf**

Lebenslauf aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht enthalten.



## IX. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Hans-Jürgen Kreienkamp für die Möglichkeit, meine Promotion in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen, für die exzellente Betreuung während dieser Zeit sowie den vielen interessanten wissenschaftlichen Diskussionen. Bei meiner Co-Betreuerin Prof. Dr. Susanne Dobler möchte ich mich sehr herzlich für die Unterstützung und die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Kreienkamp, Kindler, Kutsche und Rosenberger sowie allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik neben dem Input in zahlreichen Seminaren und für die tolle Atmosphäre, auch neben der Arbeit, bedanken. Besonders möchte ich mich bei André Friedrich, Edward Pan, Fatemeh Hasani-Nia, Dr. Judith Koliwer und Dr. Victoria Martens für die tolle Zusammenarbeit und Unterstützung in wissenschaftlicher Hinsicht sowie den Spaß, auch neben der Arbeit, bedanken. Ein großer Dank gilt hier im besonderen Dr. Judith Koliwer für die großartige Einarbeitung in dieses Projekt. Mein Dank gilt auch den zahlreichen Personen, die durch Ihre Unterstützung und Hilfe, Teile dieser Arbeit erst ermöglicht haben (willkürliche Reihenfolge): Dr. Fabio Moerellini, Dr. Irm Hermans-Borgmeyer, Dr. Sabine Hoffmeister-Ullrich sowie den Mitarbeitern der Versuchstierhaltung und der Mikroskopie Facility des UKE.

Finanziert wurde dieses Projekt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft, im Rahmen des Graduiertenkollegs 1459 „Sortierung und Interaktionen zwischen Proteinen subzellulärer Kompartimente“. Hier möchte ich mich besonders bei Prof. Dr. Thomas Bräulke und Dr. Dorte Labontè für die Organisation des Graduiertenkollegs bedanken. Der wissenschaftliche Austausch, die zahlreichen Seminare, Exkursionen, Workshops und die Möglichkeit ein Forschungspraktikum im Ausland zu verbringen haben mir geholfen, mich wissenschaftlich und persönlich weiter zu entwickeln.

Ein riesiger Dank gilt meinen Eltern für die bedingungslose Unterstützung, die Sie mir entgegenbringen. Vielen Dank, dass Ihr immer an mich glaubt und mir ohne Einschränkungen mit Rat und Tat zur Seite steht. Ihr habt es mir ermöglicht mein Leben so zu leben wie es für mich richtig ist.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Verlobten Svenja dafür bedanken, dass sie ohne Wenn und Aber an meiner Seite steht. Ich bin glücklich darüber, dass wir gemeinsam unser Leben gestalten und gegenseitig bereichern.

Unerwähnt dürfen hier auch nicht meine Freunde bleiben, mit euch macht es einfach Spaß.

## **X. Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbständig verfasst wurde und ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Diese Arbeit wurde nicht vorher, in gleicher oder ähnlicher Form, in einem anderen Prüfungsverfahren eingereicht. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich bin damit einverstanden, dass die Dissertation veröffentlicht wird.

Hamburg, den 27.08.2018

---

Malte Klüssendorf