

**Interaktionspartner des  
Neuronalen Calcium-Sensors-1 (NCS-1)  
in der Maus (*Mus musculus*)**

Dissertation

Zur Erlangung  
des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
am Department Chemie  
der Universität Hamburg

vorgelegt von  
Malte Cord Stockebrand

Hamburg  
2009

Diese Arbeit wurde am Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH) im Institut für Neurale Signalverarbeitung bei Prof. Dr. O. Pongs angefertigt.

Hiermit versichere ich an Eides statt, die Arbeit selbständig angefertigt zu haben, wörtlich oder inhaltlich aus anderen Quellen übernommene Stellen als solche kenntlich gemacht zu haben, die Inanspruchnahme fremder Hilfe namentlich aufgeführt zu haben und ausschließlich die angegebenen Hilfsmittel und Quellen in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe keine früheren Promotionsversuche unternommen, keine andere Promotion begonnen und auch keinen Promotionsversuch abgebrochen.

1. Gutachter: Prof. Dr. U. Hahn  
2. Gutachter: Prof. Dr. O. Pongs  
Datum der Disputation: 04.12.2009

Hamburg, 9.12.2009

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Neuronale Ca <sup>2+</sup> -Signale	1
1.2	NCS-1, Neuronaler Ca <sup>2+</sup> - Sensor 1	1
1.2.1	Ca <sup>2+</sup> -Bindungseigenschaften von NCS-1	4
1.2.2	Die konservierte Struktur der NCS-1-Orthologen geht teilweise mit einer konservierten Funktion einher	5
1.2.3	Zusammenfassung der NCS-1-Funktionen	9
1.2.4	NCS-1-Protein-Protein Wechselwirkungen	10
1.3	Ziele der Arbeit	10
<b>2</b>	<b>Material</b>	<b>11</b>
2.1	Chemikalien und Enzyme	11
2.2	Lösungen und Puffer	11
2.3	Bakterienstämme und Zelllinien	16
2.4	Nährmedien	17
2.5	Zellkultur: Medien und Lösungen	17
2.6	Molekulargewichtsstandards	18
2.7	Vektoren	18
2.8	Mauslinien	19
2.9	Antikörper	20
2.10	Floureszenzfarbstoffe	23
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>24</b>
3.1	Molekularbiologische Methoden	24
3.1.1	Handhabung von Bakterienstämmen	24
3.1.2	Präparation von DNA	25
3.1.3	Mikrodialyse von DNA	27
3.1.4	Enzymatische Modifikationen von DNA	27
3.1.5	DNA-Agarosegelelektrophorese	28
3.1.6	DNA-Isolierung aus Agarosegelen	29
3.1.7	Aufreinigung von DNA für Pronukleusinjektion	29
3.1.8	Konzentrationsbestimmungen von DNA-Lösungen	30
3.1.9	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	30
3.1.10	RNA-Techniken	32
3.1.11	RNA <i>in situ</i> Hybridisierung an Gewebeschnitten	33

3.2	Proteinbiochemische Methoden	34
3.2.1	Präparation von cytosolischem und Membran-Protein aus kultivierten Zellen	34
3.2.2	Präparation von cytosolischem und Membran-Protein aus Gehirnextrakten	34
3.2.3	Protein-Präparation für die Identifikation von NCS-1-Bindepartnern aus Gehirnextrakten (S2-Fraktion)	35
3.2.4	Gelchromatographie zur Präfraktionierung der löslichen Proteinfraktion S2	35
3.2.5	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	35
3.2.6	Aufkonzentrieren von Proteinlösungen durch Ultrafiltration	36
3.2.7	Immunpräzipitation	36
3.2.8	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	39
3.2.9	Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen	39
3.2.10	Western Blot-Analyse	39
3.2.11	Flüssigchromatographie-gekoppelte Tandem-Massenspektroskopie (LC-MS/MS)	40
3.3	Zellbiologische Methoden	41
3.3.1	Kultivierung von Zellen	41
3.3.2	Generierung stabiler Zelllinien mit dem <i>Flp-In</i> <sup>TM</sup> -System	42
3.3.3	Immunfluoreszenz, Zellfärbungen, Fluoreszenzmikroskopie	43
3.4	Physiologie	45
3.4.1	Maushaltung	45
3.4.2	Entnahme von Schwanzbiopsien und Präparation von Mäusegehirn	45
3.5	Histologie	45
3.5.1	Perfusion von Mäusen	45
3.5.2	Präparation von Vibratomschnitten	46
3.5.3	Nissl-Färbung mit Kresylviolett	46
3.5.4	Immunhistochemie mit biotinylierten Antikörpern und DAB-Färbung	47
3.5.5	Immunhistologie mit fluoreszierenden Antikörpern (Immunhistofluoreszenz)	47
3.5.6	Fluoreszenzmikroskopie und Durchlichtmikroskopie	48
3.5.7	Elektronenmikroskopie	48

3.6	Elektrophysiologische Experimente	49
3.6.1	Präparation von Maushirnschnitten	49
3.6.1	Extrazelluläre Ableitung exzitatorischer postsynaptischer Feldpotentiale und Bestimmung der Doppelpuls-Fazilitierung	49
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>51</b>
4.1	Einfluss der N-Myristylierbarkeit auf die intrazelluläre NCS-1-Lokalisation	51
	Expression von NCS-1-EGFP und nicht-myristylierbarem NCS-1(G2A)-EGFP in stabilen Zelllinien	51
4.1.1	Fluoreszenzmikroskopische Analyse der intrazellulären Lokalisation	52
4.1.2	Biochemische Analyse der Membranassoziation	57
4.2	NCS-1-EGFP-Expression im Vorderhirn transgener Mäuse	58
4.3	Zentralnervöses Expressionsmuster von NCS-1-EGFP	60
4.4	Hirn-Morphologie NCS-1-EGFP exprimierender transgener Mäuse	62
4.5.1	Fluoreszenzmikroskopische Charakterisierung der NCS-1-EGFP-Expression im Hirn adulter doppelt-transgener Mäuse	64
4.5.2	Intrazelluläre NCS-1-EGFP-Lokalisation im Hirn adulter doppelt-transgener Mäuse	65
4.5.3	Ultrastrukturelle Analyse der Lokalisation der NCS-1-Proteine	67
4.6	Identifikation NCS-1-EGFP-bindender Proteine	70
4.6.1	Größenausschluss-Chromatographie der löslichen Fraktion des Hirnlysats zur Entfernung freien NCS-1-EGFP- und NCS-1-Proteins	72
4.6.2	Anti-GFP-Co-Immunpräzipitation	74
	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese des Immunpräzipitats	75
4.6.3	Massenspektroskopische Analyse der präzipitierten Proteine	76
4.6.4	Bestätigung der NCS-1-EGFP-Interaktionen mit Bet3 und SNAP-47	81
4.7	Protein-Interaktionen von NCS-1 in Wildtyp-Tieren	82
4.8	Subzelluläre Lokalisation von NCS-1 und neu identifizierten NCS-1-bindenden Proteinen	84
4.9	Elektrophysiologische Charakterisierung der hippocampalen Kurzzeit-Plastizität	89

<b>5 Diskussion</b>	<b>92</b>
5.1 Einfluss der Myristylierbarkeit auf die NCS-1-Lokalisation	92
5.2 NCS-1-EGFP Expression in transgenen Mäusen	96
5.3 Protein-Protein-Interaktionen von NCS-1-EGFP und NCS-1	97
5.4 Modell der NCS-1-Funktion im vesikulären Transport	101
5.5 Veränderte Kurzzeit-Plastizität in transgenen Mäusen	107
5.6 Ausblick	110
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>111</b>
<b>7 Abstract</b>	<b>113</b>
<b>8 Literaturverzeichnis</b>	<b>115</b>
<b>Anhang</b>	<b>132</b>
A Abkürzungsverzeichnis	132
B Plasmid-Konstrukte	138
C Oligonucleotide	141
D In der nano-LC-MS/MS-Analyse identifizierte Proteine	142
E Gefahrstoffliste	145
F Publikationen und Kongressbeiträge	147

# 1 Einleitung

## 1.1 Neuronale $\text{Ca}^{2+}$ -Signale

Signalwege, in denen intrazelluläre Calciumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) als sekundärer Botenstoff wirken, regulieren vielfältige Zellfunktionen. In Nervenzellen regulieren Calcium-Signalwege z. B. die Ausschüttung von Neurotransmittern und Exocytose, Genexpression, Zytoskelettdynamik und Zelltod. Die extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration beträgt 1 – 3 mM. Die basale cytoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration beträgt 10 – 100 nM und steigt je nach Art der Zellaktivierung durch Einstrom extrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen oder durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern in den mikro- bis milli-molaren Bereich. Der Diversität der durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen regulierten Vorgänge liegt zum einen die Verschiedenartigkeit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale, zum anderen die Vielfalt der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Signal-Moleküle zu Grunde.  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Lokalisation und räumlichen Ausdehnung (von  $\text{Ca}^{2+}$ -Nano-Domänen über  $\text{Ca}^{2+}$ -Mikro-Domänen, bis hin zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Welle bzw. zum globalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal über die gesamte Zelle), ihrer zeitlichen Ausdehnung bzw. Kinetik und Frequenz, sowie der Intensität bzw. des Ausmaßes der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsänderung. Entsprechend vielfältig sind auch die Proteine, die als  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensoren fungieren. Sie unterscheiden sich hinsichtlich der  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität, der Bindungs-Kinetik, der subzellulären Lokalisation und des Expressionsmusters (Augustine *et al.*, 2003; Berridge *et al.*, 2000; Berridge *et al.*, 2003; Burgoyne, 2007; Ikura *et al.*, 2006).

## 1.2 NCS-1, Neuronaler $\text{Ca}^{2+}$ - Sensor 1

Neuronale Calcium Sensor (NCS) –Proteine gehören zu der großen Familie der Calmodulin-verwandten  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Proteine, deren Mitglieder vier EF-Hand- $\text{Ca}^{2+}$ -Bindemotive enthalten (Kretsinger und Nockolds, 1973). Die NCS-Proteine bilden einen eigenen Familienzweig, der sich aufgrund von Sequenzhomologien in fünf Unterfamilien (Frequenin, VILIP / Neurocalcin / Hippocalcin, Recoverin, GCAP, KChIP) weiter einteilen lässt (Braunewell und Gundelfinger, 1999; Burgoyne, 2007). Bei den NCS-Proteinen sind ein bis zwei der EF-Hand-Motive so verändert, dass

## Einleitung

---

zwar das charakteristische *Helix-Loop-Helix*-Motiv ausgebildet wird, jedoch kein  $\text{Ca}^{2+}$  an diese Motive gebunden werden kann.

Der Neuronale Calcium Sensor-1 (NCS-1) wird im Säugetier am stärksten im zentralen Nervensystem exprimiert. Allerdings wird NCS-1 auch im peripheren Nervensystem und in der Niere exprimiert und darüber hinaus, obgleich deutlich schwächer, auch im Herzen, im Pankreas, sowie in den Keimdrüsen. Während der Embryonal-Entwicklung wird NCS-1 nahezu ubiquitär exprimiert, wobei die stärkste Expression ebenfalls im Hirn erfolgt (Gierke *et al.*, 2004).

Eine veränderte NCS-1-Expression wurde bei verschiedenen Krankheiten beschrieben, darunter Schizophrenie und bipolare Störungen (Koh *et al.*, 2003), X-chromosomale geistige Retardierung (Bahi *et al.*, 2003), Kolitis (Lourenssen *et al.*, 2002) und, z. T. als Nebenwirkung des chemotherapeutisch eingesetzten Paclitaxels (Markenname Taxol<sup>®</sup>) auftretende, periphere Neuropathien (Boehmerle *et al.*, 2007). Inwieweit ein kausaler Zusammenhang zwischen veränderter NCS-1-Expression und der Pathogenese der erwähnten Krankheiten besteht, ist allerdings ungeklärt.

Ursprünglich wurde das NCS-1-Ortholog Frequenin in *Drosophila melanogaster* beschrieben (Pongs *et al.*, 1993). Die Aminosäuresequenz der NCS-1-Orthologen ist über Artgrenzen hinweg hochkonserviert. Die Aminosäuresequenzen der Säugetier-NCS-1-Proteine sind identisch, die Aminosäuresequenz von Säugetier-NCS-1 und Amphibien-Frequenin ist nahezu identisch (99% Sequenz-Identität für *Xenopus laevis*-Frequenin, Olafsson *et al.*, 1995). Die Aminosäuresequenzen von Invertebraten-Frequenin und Säugetier-NCS-1 sind etwa zu 75% identisch (Pongs *et al.*, 1993; De Castro *et al.*, 1995) und die Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen von Hefe-Frq1 und Säugetier-NCS-1 beträgt etwa 60% (Hendricks *et al.*, 1999).

Erwartungsgemäß geht die starke Ähnlichkeit zwischen der Aminosäuresequenz von Säugetier-NCS-1 und Hefe-Frq1 einher mit einer großen strukturellen Ähnlichkeit. Das NCS-1 besteht aus 190 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 22 kDa. Es enthält, wie die anderen NCS-Proteine mit Ausnahme der KChIPs, eine aminoterminalen Konsensussequenz für co-translationale Acylierung, an der es durch N-Myristyltransferasen myristyliert wird (Hendricks *et al.*, 1999; McFerran *et al.*, 1999). Die Struktur von Säugetier-NCS-1 wurde Röntgen-kristallografisch mit einer Auflösung von 1,9 Å bestimmt (Bourne *et al.*, 2001). Sie weist große Ähnlichkeit zu der NMR-Struktur von Hefe-Frq1 (Ames *et al.*, 2000) auf (Abb.1).

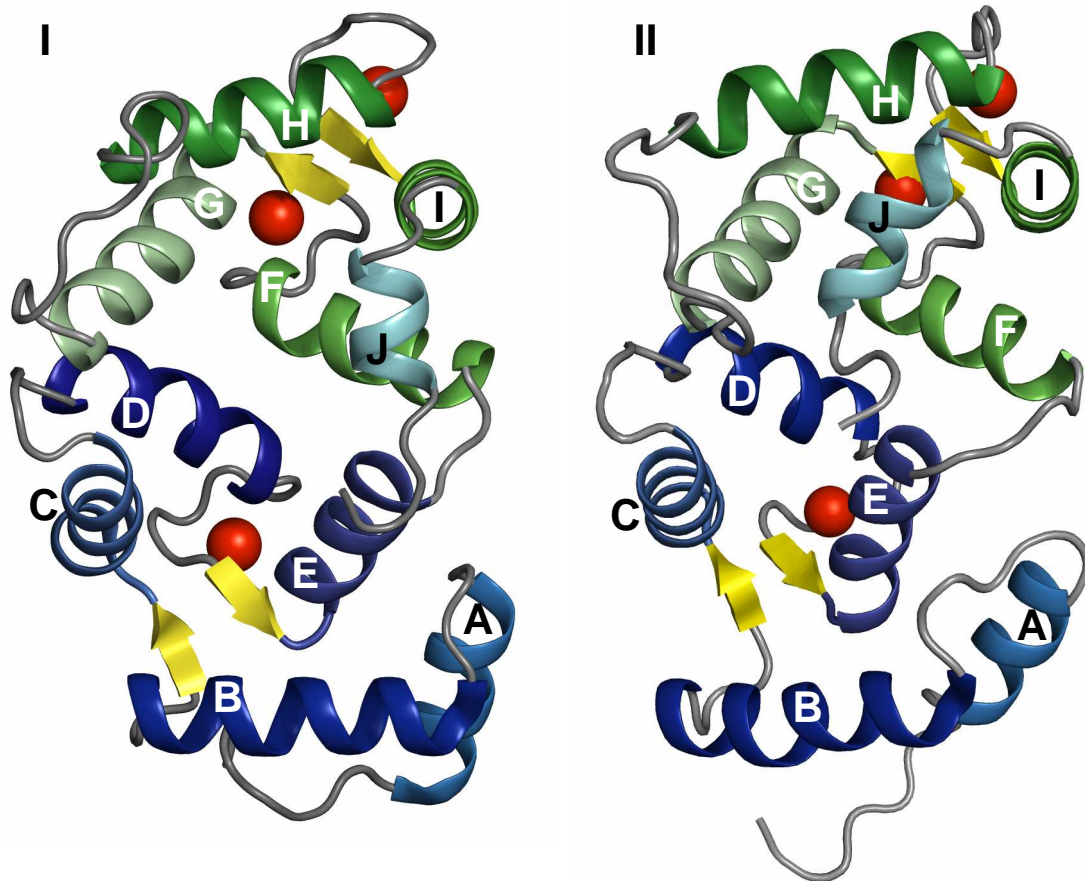


## Einleitung

---

Das Protein enthält 10  $\alpha$ -Helices (A-J). Die vier EF-Hand-Motive sind paarweise angeordnet, wobei jeweils zwei Schlaufen (*Loops*) der *Helix-Loop-Helix*-Motive, wie für paarweise orientierte EF-Hände typisch, kurze antiparallele  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen bilden. Anders als im hantelförmigen Calmodulin-Molekül, in dem die zwei, jeweils aus einem EF-Hand-Paar bestehenden, globulären Domänen durch eine lange  $\alpha$ -Helix verbunden (bzw. getrennt) sind (Babu *et al.*, 1988), bilden die beiden globulären EF-Hand-Paare in NCS-Proteinen in direktem Kontakt miteinander eine kompakte ovale Struktur. Während die bekannten NCS-Proteinstrukturen einen vergleichbaren hydrophoben Bereich auf der Oberfläche der amino-terminalen Hälfte besitzen, ist einzig im NCS-1-Protein auch auf der Oberfläche der carboxy-terminalen Hälfte des Proteins ein exponierter hydrophober Bereich vorhanden. Durch eine im Vergleich mit den übrigen NCS-Proteinen andersartige Orientierung der Helix J ergibt sich auf der einen Seite des Proteins eine durchgängige hydrophobe Furche von 30 x 15 x 15 Å. 46 der 190 Aminosäuren des Proteins sind an der Ausbildung dieser hydrophoben Furche beteiligt.

Der große hydrophobe Bereich auf der NCS-1-Proteinoberfläche führt dazu, dass das Protein „klebrig“ ist und hydrophobe Substanzen unspezifisch bindet. Einerseits erleichtert dieser Umstand die Aufreinigung von NCS-1 durch hydrophobe Interaktionschromatographie (Fisher *et al.*, 2000; Bourne *et al.*, 2001). Andererseits ist NCS-1 dadurch, besonders bezüglich etwaiger Protein-Protein-Interaktionen, biochemisch schwierig zu untersuchen und die Spezifität der Wechselwirkung mit Bindungspartnern ist nicht einfach zu beurteilen.



**Abb. 1.1, Übersicht über die Sekundärstruktur von Säugetier NCS-1 (I, PDB: 1G8I, Bourne et al., 2001) und Hefe-Frq1 (II, PDB: 1FPW, Ames et al., 2000)**

**I:** NCS-1: Eine hydrophobe Furche wird von 46 Aminosäure-Seitenketten gebildet, die an den Helices D, E und F auf dem Grund der Furche und C und G auf der einen, sowie J auf der anderen Seite lokalisiert sind.

**II:** Frq1: Wie auch im NCS-1-Molekül sind zwei dicht gefaltete Domänen (Met1-Thr92, Helices A-E, in Blautönen dargestellt und Lys100-Ile190, Helices F-J, dargestellt in Grüntönen) so aneinander gefügt, dass sie eine zugängliche Furche bilden, die überwiegend aus hydrophoben Seitenketten besteht.

A-J:  $\alpha$ -Helices A-J; gelbe Pfeile:  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen, die die EF-Hand-Motive formen; rote Sphären:  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen; PDB: protein data base; (modifiziert nach Stockebrand und Pongs, 2006).

### 1.2.1 $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungseigenschaften von NCS-1

Drei der vier EF-Hand-Motive in NCS-1-orthologen Proteinen binden  $\text{Ca}^{2+}$  (Abb.1). Im Säugetier-NCS-1 liegt eine sehr hohe  $\text{Ca}^{2+}$  Affinität vor. Die drei  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden EF-Hand-Motive binden  $\text{Ca}^{2+}$  mit  $K_D$ -Werten zwischen 44 und 188 nM in  $\text{Mg}^{2+}$ -freier Lösung, bzw. mit  $K_D$ -Werten zwischen 300 und 600 nM bei physiologischer  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration von 0,5 - 0,6 mM. Insgesamt bindet NCS-1  $\text{Ca}^{2+}$  mit einem apparenten  $K_D$ -Wert von 0,3  $\mu\text{M}$  (Cox et al., 1994, unmyristyliertes rekombinantes Hühner-NCS-1) bzw. 0,44  $\mu\text{M}$  (Aravind et al., 2008, myristyliertes Säugetier-NCS-1). In

Hefe-Frq1 wirkt die gebundene Myristinsäure als eingebauter allosterischer Effektor, der die Kooperativität der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung der drei funktionellen EF-Hände erhöht (Ames *et al.*, 2000). In Säugetier-NCS-1 erhöht die Myristylierung sowohl die Affinität, als auch die Kooperativität der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung (Jeromin *et al.*, 2004).

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität von NCS-1 ist somit deutlich höher als die von Calmodulin ( $K_D \sim 15 \mu\text{M}$ ) (Xia und Storm, 2005) oder Synaptotagmin ( $K_D \sim 10 \mu\text{M}$ ) (Sun *et al.*, 2007), dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor für die Neurotransmitterausschüttung aus synaptischen Vesikeln. Die Unterschiede der  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinitäten der erwähnten Proteine legen unterschiedliche physiologische Funktionen der Proteine nahe. Es ist dabei zu vermuten, dass NCS-1, das  $\text{Ca}^{2+}$  mit sehr hoher Affinität bindet, anders als z. B. Synaptotagmin, seine Funktion außerhalb von  $\text{Ca}^{2+}$ -Nano- und Mikro-Domänen, die sich in unmittelbarer Nähe cytoplasmatischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle befinden, ausübt (Meinrenken *et al.*, 2002).

### 1.2.2 Die konservierte Struktur der NCS-1-Orthologen geht teilweise mit einer konservierten Funktion einher

Die starke Konservierung der Aminosäuresequenz und der Struktur der NCS-1-orthologen Proteine über Artgrenzen hinweg deutet auf eine mögliche Konservierung der Funktion des Proteins hin (Stockebrand und Pongs, 2006).

### Frequenin-Überexpression in *Drosophila melanogaster* und synaptische Plastizität

Frequenin erhielt seinen Namen nach der Beobachtung, dass die Überexpression in *D. melanogaster* *T(X;Y)V7*-Mutanten, wie auch in transgenen Tieren zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Verstärkung der frequenz-abhängigen Erhöhung (Fazilitation) der Neurotransmitterausschüttung an der larvalen neuro-muskulären Synapse führte. In *T(X;Y)V7*-Mutanten und in transgenen Fliegen war die Frequenin-Überexpression mit einem Übererregbarkeits-Phänotyp assoziiert (Pongs *et al.*, 1993). *D. melanogaster*-Frequenin spielt demnach eine Rolle bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Regulation der Stärke synaptischer Verbindungen (Rivosecchi *et al.*, 1994).

Übereinstimmend mit dieser Beobachtung wurde ein Einfluss von NCS-1 auf synaptische Signalübertragung und Sekretion auch in anderen Systemen beschrieben. Nachdem der *D. melanogaster*-Phänotyp beschrieben worden war, wurden vergleichbare Phänotypen in Frequenin überexprimierenden Nerv-Muskelpräparaten von *Xenopus laevis*-Embryonen (Olafsson *et al.*, 1995) und in

transient mit NCS-1 cDNA transfizierten kultivierten Nagetier-Neuronen beobachtet (Sippy *et al.*, 2003). Im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* wurde eine Abhängigkeit des iso-thermalen Trackings – einer einfachen Form des Lernens – von der NCS-1-Expression in bestimmten Neuronen beschrieben (Gomez *et al.*, 2001). Eine regulative Funktion von NCS-1 bei Sekretion und Exocytose in PC12 Zellen (Koizumi *et al.*, 2002; McFerran *et al.*, 1999; McFerran *et al.*, 1998), bovinen chromaffinen Zellen (Pan *et al.*, 2002; Weiss *et al.*, 2000), kultivierten Mastzellen (Kapp-Barnea *et al.*, 2003), 3t3L1 Adipozyten (Mora *et al.*, 2002) oder in Pankreas-Zellen (Gromada *et al.*, 2005) wurde ebenfalls beschrieben. Ausgehend von der Beobachtung, dass in *D. melanogaster*-Mutanten die Frequenin-Überexpression zu einer Verringerung der Anzahl und Länge der axonalen Endigungen motorischer Neuronen in der neuromuskulären Synapse führt (Angaut-Petit *et al.*, 1998), wurde für NCS-1 ein, durch Regulation von TRPC5-Ionenkanälen vermittelter, retardierender Effekt auf das neuronal growth factor (NGF)-induzierte Neuriten-Wachstum in PC12-Zellkultur gezeigt (Hui *et al.*, 2006). Eine Konservierung der Funktion von *D. melanogaster* Frequenin, nämlich die Regulation synaptischer Stärke und neuritischer Verzweigungen, liegt im Säugetier-NCS-1 demnach vor.

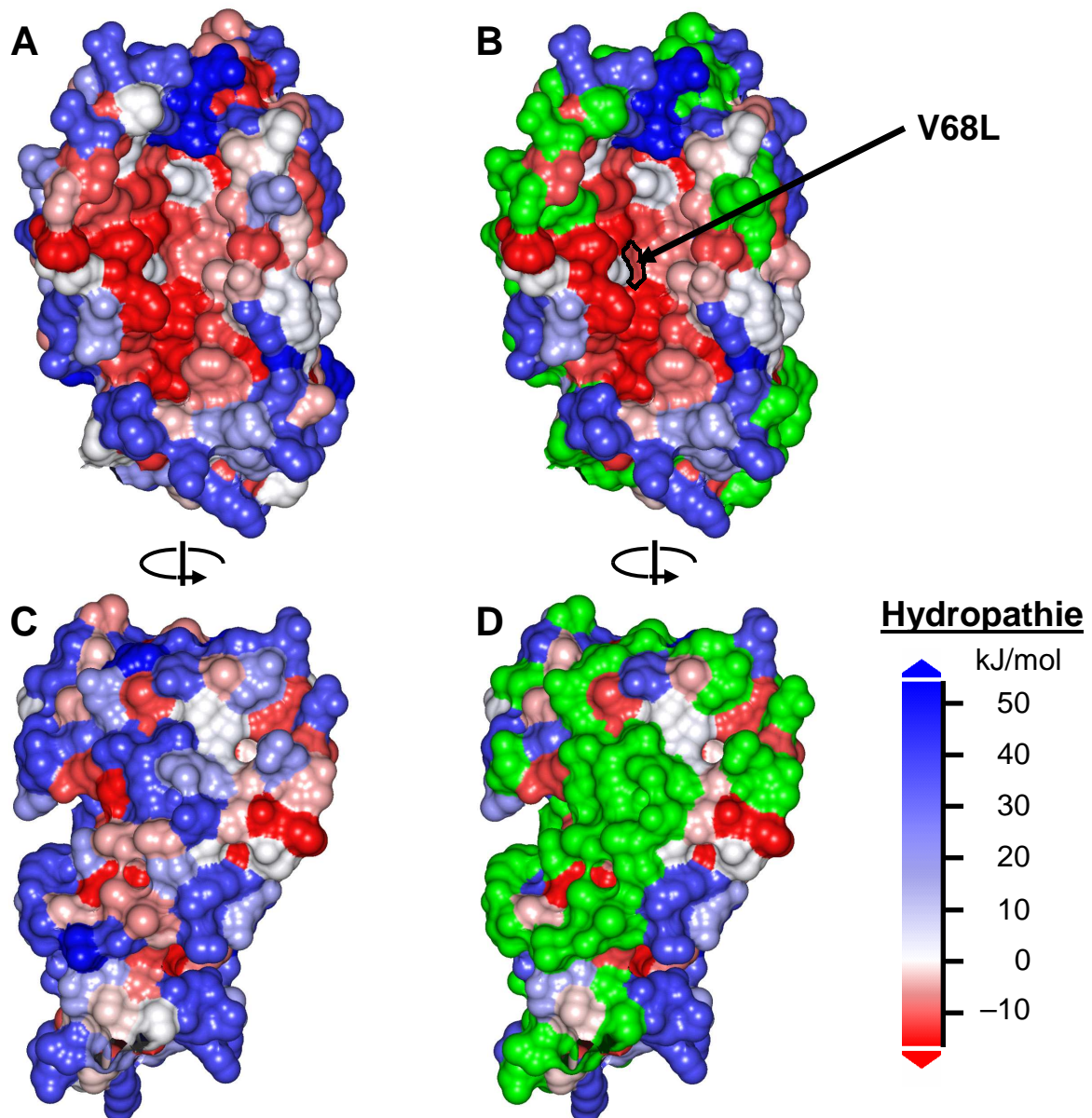
Dessen ungeachtet steht die eindeutige Bestimmung molekularer Zielproteine, sowie der physiologischen Funktion von NCS-1 im Säugetiergehirn *in vivo* weiterhin aus und die Beschreibung von NCS-1-Protein-Interaktionen ist widersprüchlich geblieben. Die überraschend umfangreiche Liste vorgeschlagener Zielproteine umfasst z. B. spannungsabhängige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle (Rousset *et al.*, 2003; Tsujimoto *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2001; Weiss und Burgoyne, 2001), A-typ K<sup>+</sup>-Kanäle (Guo *et al.*, 2002; Nakamura *et al.*, 2003; Nakamura und Coetzee, 2008; Ren *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003), den transient receptor potential Kanal TRPC5 (Hui *et al.*, 2006), Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> Austauscher (NCX) (Rivosecchi *et al.*, 1994), D2-Dopamin Rezeptoren und die G-Protein-gekoppelte-Rezeptor-Kinase GRK2 (Kabbani *et al.*, 2002), die kleine GTPase ARF1 (Haynes *et al.*, 2005, 2006, 2007), die Protein-Phosphatase Calcineurin (Schaad *et al.*, 1996), 3':5'-cyclo-Nucleotid-Phosphodiesterase (PDE) (Schaad *et al.*, 1996; Haynes *et al.*, 2006), Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) (Schaad *et al.*, 1996), das dem Interleukin-1-Rezeptor akzessorischen Protein ähnliche Protein 1 (ILRAPL1) (Bahi *et al.*, 2003) und die Phosphatidylinositol 4-Kinasen Pik1 (Hendricks *et al.*, 1999) und PI4KIIIβ (Taverna *et al.*, 2002; Zheng *et al.*, 2005; Rajebhosale *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2001).

NCS-1 scheint demnach am gesamten Prozess synaptischer Übertragung, vom Rezeptor, über die elektrische Weiterleitung des Signals und das *Trafficking* sekretorischer Komponenten bis hin zur Regulation der Neurotransmitterausschüttung beteiligt zu sein. Anders ausgedrückt gibt es kaum einen Prozess vom Signal-Eingang in die Zelle über die intrazelluläre Signal-Weiterleitung bis hin zur Ausschüttung der inter-zellulären Signal-übermittelnden Botenstoffe, für den nicht eine regulatorische Beteiligung von NCS-1 vorgeschlagen worden wäre. Das ist nicht nur unerwartet, sondern die physiologische Relevanz der vielfältigen beschriebenen NCS-1-Funktionen bleibt, nicht zuletzt auf Grund der z. T. unphysiologischen experimentellen Bedingungen, fragwürdig.

### **In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* reguliert das NCS-1-Ortholog Frq1 die Phosphatidylinositol 4-Kinase Pik1 und dadurch den vesikulären Transport**

Bisher konnte nur in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* die Funktion eines NCS-1-orthologen Proteins eindeutig geklärt werden. In genetischen und biochemischen Experimenten wurde gezeigt, dass Frq1 in der Hefe *S. cerevisiae* eine regulative Untereinheit der Phosphatidylinositol 4-Kinase Pik1 bildet (Hendricks *et al.*, 1999). Pik1 ist das einzige essentielle Frq1-Target, die Letalität Temperatursensitiver *frq1<sup>ts</sup>* Mutanten und der FRQ1 Deletion *frq1Δ* (FRQ1-Knockout) konnte durch *PIK1*-Überexpression aufgehoben werden. Pik1 ist an der Regulation des vesikulären Transports beteiligt und für eine normale Golgi-Funktion und letztlich für das Überleben der Hefe essentiell. Gemäß der hohen Sequenz-Konservierung zwischen Hefe-Frq1 und Säugetier-NCS-1 ist Säugetier-NCS-1 in der Lage, den Frq1-Funktionsverlust in *frq1Δ*-Stämmen zu kompensieren, Pik1 zu binden und die Überlebensfähigkeit der Hefe wieder herzustellen (Strahl *et al.*, 2003).

Die NMR-Struktur von Ca<sup>2+</sup>-gebundenem Frq1 im Komplex mit dem Pik1 Amino-Terminus wurde 2007 publiziert (Strahl *et al.*, 2007). Die Interaktion von Frq1 mit dem Pik1 Amino-Terminus beruht auf hydrophoben Wechselwirkungen von zwei  $\alpha$ -Helices des Pik1-Proteins mit der hydrophoben Furche im Frq1-Molekül. Wie bereits bei der Beschreibung der hydrophoben Furche in der NCS-1-Struktur postuliert wurde (Bourne *et al.*, 2001) spielt diese strukturelle Besonderheit tatsächlich eine entscheidende Rolle für die Funktion von Frq1 bei der Interaktion mit dem Zielprotein Pik1. Anders als in anderen Neuronalen Calcium Sensor-Proteinen ist diese hydrophobe Furche im NCS-1-Molekül strukturell konserviert (Abb.2).



**Abb. 1.2, Konservierung der Aminosäuren zwischen Säugetier-NCS-1 und Hefe-Frq1, abgebildet in der NCS-1-Struktur**

**A:** NCS-1, Farbgebung gemäß der Hydrophathie der Aminosäure-Seitenketten mit blauen Farbtönen für hydrophile und mit roten Farbtönen für hydrophobe Aminosäuren, die hier die zentral liegende hydrophobe Furche bilden, das Molekül ist entsprechend Abbildung 1.1 orientiert

**B:** Aminosäuren, die zwischen Säugetier-NCS-1 und Hefe-Frq1 nicht-konservativ unterschiedlich sind, sind grün dargestellt, wobei konservierte Aminosäuren wie folgt klassifiziert wurden: [A, V, I, L]; [F, W, Y]; [D, E]; [N, Q]; [H, K, R]; [S, T]. V68L bezeichnet die einzige Aminosäure der hydrophoben Furche, die sich zwischen Säugetier-NCS-1 und Hefe-Frq1 unterscheidet, mit Valin im NCS-1-Molekül und Leucin in Frq1.

**C:** wie A, **D:** wie B, jeweils um die senkrechte Achse 90° nach rechts gedreht

Der Farbschlüssel für die Hydrophathie zeigt die freie Energie in kJ/mol des Transfers einer Aminosäure in einer alpha-Helix von wässriger Umgebung in eine Membran mit einer angenommenen Dielektrizitätskonstante von 2 (modifiziert nach Stockebrand und Pongs, 2006).

Nicht-konservative Unterschiede zwischen den Aminosäuresequenzen von NCS-1 und Frq1 befinden sich ausschließlich außerhalb der hydrophoben Furche. Im Bereich der hydrophoben Furche unterscheiden sich die Aminosäuresequenzen lediglich an Position 68, mit Val in der NCS-1-, bzw. Leu in der Frq1-Sequenz. Unabhängig von der Identität etwaiger Interaktionspartner wird postuliert, dass der Mechanismus der Interaktion von Frq1 und Pik1 in dem Mechanismus der Interaktion von NCS-1 und Zielprotein konserviert ist. Dies führt zu der Hypothese, dass NCS-1 durch hydrophobe Wechselwirkungen der hydrophoben Furche mit ein oder zwei  $\alpha$ -Helices des Bindungspartners interagiert.

Analog zur Hefe wurde in Zellkultur-Experimenten mit transient transfizierten Zellen auch für Säugetier-NCS-1 eine Funktion im Phosphatidylinositolphosphat-Metabolismus beschrieben (Haynes *et al.*, 2005; Taverna *et al.*, 2002). Darauf basierend wurde eine Konservierung der Funktion zwischen Hefe-Frq1 und Säugetier-NCS-1 bezüglich der PI-4-Kinase Regulation und Golgi-Trafficking vorgeschlagen.

### 1.2.3 Zusammenfassung der NCS-1-Funktionen

Die beschriebenen Funktionen von NCS-1-Orthologen lassen sich zusammenfassend folgenden Vorgängen zuordnen:

- 1.) Regulation der synaptischen Stärke bzw. der synaptischen Plastizität
- 2.) Ionenkanalregulation
- 3.) Regulation des Phosphatidylinositolphosphatmetabolismus
- 4.) Regulation des vesikulären Traffickings

Es ist auffallend, dass sich diese Prozesse gegenseitig direkt regulieren. Alternativ zu der Möglichkeit der Regulation diverser zellbiologischer Vorgänge durch vielfältige Interaktionen von NCS-1 mit verschiedenen Zielproteinen ergibt sich daher auch die Möglichkeit, dass NCS-1 nur mit wenigen primären Zielproteinen interagiert und lediglich einen zellbiologischen Vorgang direkt reguliert. Die Vielfalt der beschriebenen Funktionen von NCS-1 wäre dann durch sekundäre Effekte erklärbar, die von NCS-1 nur indirekt reguliert oder beeinflusst würden.

Um die direkte molekulare Funktion von Säugetier-NCS-1 aufzuklären, wurden in dieser Arbeit NCS-1-Interaktionspartner in der Maus gesucht.

### 1.2.4 NCS-1-Protein-Protein Wechselwirkungen

In vorangegangenen Experimenten wurde in unserem Labor mit verschiedenen experimentellen Ansätzen versucht, NCS-1-bindende Proteine zu identifizieren. Affinitätschromatographie von Rattenhirnlysat mit, an Sepharosematrix immobilisiertem, rekombinaten NCS-1 zeigte, dass Aktin, Tubulin und Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) an NCS-1 gebunden wurden (Hauenschild, 1997). Mit dem Hefe-zwei-Hybrid System wurde eine Rattenhirn-cDNA-Bibliothek nach NCS-1-bindenden Proteinen durchmustert (Dannenber, 2000). Dabei wurden die Serin-/Threonin-Kinasen MLK1 und MLK2 der *mixed lineage kinase* (MLK) Familie von MAP-Kinase-Kinase-Kinasen als mögliche Interaktionspartner von NCS-1 identifiziert.

Haynes *et al.*, (2006) haben an immobilisiertem, rekombinanten NCS-1-GST-Fusionsprotein affinitätschromatographisch gebundene Proteine aus Rinderhirncytosol isoliert und massen-spektroskopisch identifiziert. Die Liste der identifizierten NCS-1-bindenden Proteine umfasste Untereinheiten der Clathrinadapter-Proteinkomplexe AP1 und AP2, sowie die kleine GTPase ARF1, die Calmodulin abhängige cyclo-Nucleotid-3',5'-Phosphodiesterase, *Calcium dependent activator protein for secretion 1* (CAPS1) und *Transforming Growth Factor  $\beta$  Receptor 1* (TGF $\beta$ R1).

### 1.3 Ziele der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war, NCS-1-Interaktionspartner in der Maus zu charakterisieren, um die molekulare Funktion von Säugetier-NCS-1 besser zu verstehen. Dazu wurden mutmaßliche NCS-1-Interaktionspartner durch eine Kombination aus gelchromatographischer Separation NCS-1-haltiger Komplexe von freiem NCS-1 und anschließender Co-Immunpräzipitation (Co-IP) aus Mäusegehirn isoliert und massenspektroskopisch identifiziert. Es wurden dafür transgene Mäuse erzeugt, die, genetisch codiert, durch fluoreszierendes Protein markiertes NCS-1 exprimierten. Als Kontrolltiere dienten transgene Mäuse, die das freie fluoreszierende Protein exprimierten. Es konnten so, nach Co-Immunpräzipitation mit Anti-Markierungs Antikörpern, die spezifisch mit NCS-1 interagierenden Proteine von den mit der Markierung interagierenden Proteinen unterschieden werden, um im Anschluss in einem unabhängigen experimentellen Ansatz NCS-1-Interaktionen durch Co-Immunpräzipitation mit Anti-NCS-1-Antikörpern zu bestätigen.



## 2 Material

### 2.1 Chemikalien und Enzyme

Falls nicht anders angegeben, wurden sämtliche Chemikalien von den Firmen Baker, BD Biosciences, Difco, Fluka, GE-Healthcare (Amersham Biosciences, Pharmacia Biotech), Invitrogen (DynaL, GibcoBRL) Macherey-Nagel, Merck, Riedel-de-Häen, Roth, Serva und Sigma in p.A. oder Reinstqualität bezogen.

Enzyme, Molekulargewichtstandards (Oligonukleotide, Größenstandards) und Nukleosidtriphosphate wurden von den Firmen Ambion, AGS, Boehringer Mannheim, Clontech, Invitrogen, MWG Biotech, New England Biolabs, MBI Fermentas, Promega, Qiagen, Stratagene, Takara und USB erworben. Es wurden Röntgenfilme von Kodak (MR/MS) und GE Healthcare (Amersham Biosciences High Performance Chemiluminescence) verwendet.

Radioaktiv markierte Nukleotide wurden von der Firma Amersham Biosciences geliefert.

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG bezogen. Die Oligonukleotidsequenzen sind im Anhang dargestellt.

Die Bezugsquellen werden im Folgenden gesondert erwähnt wenn sie oben nicht aufgeführt sind, oder wenn ein Einfluss auf die Versuchsdurchführung vorliegen könnte.

### 2.2 Lösungen und Puffer

Sofern nicht anders vermerkt, wurden alle Lösungen in Optiprep Reinstwasser (Membrapure) angesetzt und ggf. autoklaviert bzw. sterilfiltriert (0,22 µm).

ACSF-Lösung zur Präparation  
(*Elektrophysiologie / Hirnschnitte /  
Dissektionslösung*)

250 mM Sucrose (Saccharose)  
25 mM Glukose  
25 mM NaHCO<sub>3</sub>  
2,5 mM KCl  
2 mM CaCl<sub>2</sub>  
1,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
1,25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
pH 7,4  
(gesättigt mit 95% O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub>)

ACSF-Lösung  
(*Elektrophysiologie / Messungen*)

124 mM NaCl  
25 mM NaHCO<sub>3</sub>,  
25 mM Glukose  
2,5 mM KCl  
2 mM MgCl<sub>2</sub>  
1,5 mM CaCl<sub>2</sub>  
1,25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
pH 7,4  
(gesättigt mit 95% O<sub>2</sub>/ 5%CO<sub>2</sub>)

## Material

---

Block-Lösung (Immunfluoreszenz)	5 %(v/v) Pferdeserum 1 %(w/v) BSA (fettfrei) in PBS
Block-Lösung (Immunhistochemie, Immunhistofluoreszenz)	10 %(v/v) Pferdeserum 0,2 %(w/v) BSA (fettfrei) 0,5 %(v/v) TritonX-100 in TBS
Block-Lösung I (Western-Blot)	5 % (w/v) Milchpulver in PBS (evtl. 0,05 % Tween20)
Block-Lösung II (Western-Blot)	1 % (w/v) Milchpulver in PBS (evtl. 0,05 % Tween20)
Comassie-Färbelösung (Proteingele, kolloidale Coomassie-Färbung)	60 ml H <sub>2</sub> O 20 ml Methanol 20 ml Roti <sup>®</sup> Blue 5x Konzentrat (Roth)
Denhardt's Reagenz (100x) (Hybridisierung)	20 g/l BSA 20 g/l Ficoll 400 20 g/l Polyvinylpyrrolidon
DNA-Probenpuffer I (10x) (Agarosegele)	0,25% (w/v) Xylen Cyanol 0,25% (w/v) Bromphenolblau 25% Ficoll 400
DNA-Probenpuffer II (10x) (Agarosegele)	0,25% Bromphenolblau 0,15% Cresol Rot 25% Ficoll 400
dNTP Stammlösung	je 20 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
Dynabeads <sup>®</sup> Protein G	Dynal <sup>®</sup> , Invitrogen
ECL-Lösung 1 (Western-Blot)	100 mM Tris pH 8,5 3,5 mM Luminol 0,4 mM Kumarsäure
ECL-Lösung 2 (Western-Blot)	100 mM Tris pH 8,5 0,02% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Ethidiumbromid-Lösung (DNA-Gele)	10 mg/ml Ethidiumbromid
Gelfiltrationspuffer (Gelchromatographie)	20 mM HEPES, pH 7,2 125 mM KCl 1 mM DTT 2 mM EGTA (ggf. 1,73 mM CaCl <sub>2</sub> ) 0,01% Triton X-100
H <sub>2</sub> O	OptiPrep Reinstwasser (Membrapure) Leitfähigkeit < 0,055 µS/cm

## Material

---

HEPES IP-Lysis Puffer (Ca <sup>2+</sup> )	20 mM HEPES, pH 7,2 125 mM KCl 1 mM DTT 2 mM EGTA 1,73 mM CaCl <sub>2</sub> 0,01% Triton X-100 1% Protease Inhibitor Cocktail
HEPES IP-Lysis Puffer (EGTA)	20 mM HEPES, pH 7,2 125 mM KCl 1 mM DTT 2 mM EGTA 0,01% Triton X-100 1% Protease Inhibitor Cocktail
<i>in situ</i> HybMix Hybridisierungslösung ( <i>in Situ Hybridisierung</i> )	50 % (v/v) Formamid 1 M Tris-HCl, pH 7,5 0,2 % (w/v) SDS 5 % (v/v) 100 x Denhardtsreagenz 10 % (w/v) Dextransulfat 250 µg/ml Heringssperma-DNA 250 µg/ml Hefe tRNA 150 mM NaCl 5 mM PIPES 5 mM EDTA pH 6,8
IP-Puffer (Brendel <i>et al.</i> , 2004)	50 mM Tris/HCl pH 8,0 120 mM NaCl 1 mM EDTA 0,5% Nonidet P-40 1% Protease Inhibitor Cocktail
isotonische Kochsalzlösung	0,9% (w/v) NaCl
Ketamin/Xylazin	1,2% (v/v) Ketamin (Ketanest <sup>®</sup> ) 0,16% (v/v) Xylazin (Rompun <sup>®</sup> ) in isotonischer Kochsalzlösung
Kresylviolettlösung ( <i>NISSL-Färbung</i> )	4,5 g Kresylviolett 45 ml Ethanol abs. 30 min stehen lassen 450 ml H <sub>2</sub> O unter Rühren auf 50°C erhitzen, filtrieren
Ligationspuffer (10x) ( <i>Ligation</i> )	400 mM Tris-HCl 100 mM MgCl <sub>2</sub> 100 mM DTT 5 mM ATP (pH 7.8 at 25°C).
Ligationspuffer ( <i>Stumpf-Enden Ligation</i> )	5% (w/v) PEG 4000 in Ligationspuffer

## Material

---

LC-Puffer	50 mM TRIS/HCl pH 7,9 1 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM DTT 2 mM CaCl <sub>2</sub> 1% (v/v) ProteaseinhibitorCocktail
LE-Puffer	50 mM TRIS/HCl pH 7,9 1 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM DTT 2 mM EGTA 1% (v/v) ProteaseinhibitorCocktail
Lösung I (Miniprep)	100 mM Tris-HCl 10 mM EDTA 400 µg/ml RNase I pH 7,5
Lösung II (Miniprep)	190 mM NaOH 1% (w/v) SDS
Lösung III (Miniprep)	Acetat-gepufferte Lösung chaotroper Salze (Amersham Biosciences)
Natriumcitratpuffer (Immunpräzipitation)	100 mM Natriumcitrat pH 5,0 (eingestellt mit Zitronensäure)
Ohrlysispuffer (DNA-Isolierung)	1 M Tris, pH 8,0 0,5 M EDTA 5 % (w/v) Tween 5 M NaCl 0,2% Nonidet P 40 (NP40) 1% (w/v) Proteinase K
PBS	1347 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4
PCR-Puffer (10x)	200 mM Tris-HCl, pH 8,8 20 mM MgSO <sub>4</sub> 100 mM KCl 100 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1% (v/v) TritonX-100 1 mg/ml BSA, Nuklease-frei
Prähybridsierungspuffer (in Situ Hybridisierung)	50% (v/v) Formamid 1 M Tris-HCl, pH 7,5 0,2 % (w/v) SDS 5 % (v/v) 100 x Denhardtsreagenz 150 mM NaCl 5 mM PIPES 5 mM EDTA pH 6,8

## Material

---

Protease Inhibitor Cocktail (Sigma)	Mix von Protease Inhibitoren mit breiter Spezifität zur Inhibierung von Serin-, Cystein-, und Aspartat-Proteasen und Aminopeptidasen: 104 mM AEBSF 0,08 mM Aprotinin 4 mM Bestatin 1,4 mM E-64 1,5 mM Pepstatin A in DMSO
Puffer N2 (Midi Prep)	100 mM Tris 15% (v/v) Ethanol 900 mM KCl 0,15% (v/v) Triton X-100 pH 6,3 (eingestellt mit H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )
Puffer N3 (Midi Prep)	100 mM Tris 15% (v/v) Ethanol 1,15 M KCl pH 6,3 (eingestellt mit H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )
Puffer N5 (Midi Prep)	100 mM Tris 15% (v/v) Ethanol 1 M KCl pH 8,5 (eingestellt mit H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )
Puffer S1 (Midi Prep)	50 mM Tris-HCl 10 mM EDTA 10 µg/ml RNase A pH 8,0
Puffer S2 (Midi Prep)	200 mM NaOH 1% SDS
Puffer S3 (Midi Prep)	2,8 M Kaliumacetat pH 5,1
Restriktionspuffer	Es wurden die Enzymspezifischen Puffer des Herstellers verwendet
SSC (20x)	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat pH 7,0 SSPE (20x) 3 M NaCl 0,2 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,02 M EDTA pH 7,4
STE	150 mM NaCl in TE Puffer, pH 8,0
TAE (50x) (DNA-Gele)	2 M Tris-Acetat, pH 8,0 100 mM EDTA 10 mM Essigsäure

## Material

---

TB-Puffer (kompetente Bakterien)	10 mM PIPES, pH6,7 15 mM CaCl <sub>2</sub> 250 mM KCl 55 mM MgCl <sub>2</sub>
TE (Tris-EDTA Puffer)	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA
Träger-Lösung (Immunfluoreszenz)	5 % (v/v) Pferdeserum in PBS
Träger-Lösung (Immunhistochemie)	1 % (w/v) BSA 0,5 % (v/v) TritonX-1 00 in TBS
Triethanolamin (TEA) (Immunpräzipitation)	0,2 M TEA pH 8,2
TRIS-Puffer	100 mM Tris-HCl, pH 8,0
TRIS-Puffer (IP)	50 mM Tris-HCl, pH 7,5
Waschlösung (Proteingele)	75 ml H <sub>2</sub> O 25 ml Methanol
Waschpuffer (Miniprep)	80% Ethanol in TE
Wasser	s. H <sub>2</sub> O

## 2.3 Bakterienstämme und Zelllinien

<i>Escherichia coli</i> XL1–Blue	<i>recA I, endA I, gyrA96, thi-I, hsdRI</i> <i>7, supE44,relA I, lac[F'proAB</i> <i>lacIqΔM15TnIO(Tetr)]</i> (Stratagene)
Flp-In™-293	Humane embryonale Nieren- Zellen (HEK-293), (Graham <i>et al.</i> , 1977), des Flp-In™-Systems (Invitrogen)
COS-7	Grüne Meerkatzen Nierenzelllinie, Transformiert mit <i>SV40 large T-</i> <i>Antigene</i> (Gluzman, 1981) (ECACC)

## 2.4 Nährmedien

Nährmedien wurden autoklaviert, Antibiotika wurden den Medien nach Abkühlung auf ca. 55°C zugesetzt. Ampicillin wurde mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml, Kanamycin mit 50 µg / ml eingesetzt.

LB-Medium	10 g/l Bacto-Trypton, pH 7,4 10 g/l NaCl 5 g/l Hefeextrakt
LB-Agar Platten	15 g/l Agar in LB-Medium
SOB-Medium	20 g/l Caseinhydrolysat 5 g/l Hefeextrakt 0,5 g/l NaCl 10 mM KCl
SOC-Medium	20 mM oder 0,4% (w/v) Glucose in SOB Medium

## 2.5 Zellkultur: Medien und Lösungen

Für Zellkulturarbeiten wurden Fertiglösungen der Firmen Gibco (Invitrogen), Sigma und PAA verwendet.

FLP-In <sup>TM</sup> -293 / Cos-7 Medium:	Dulbeccos MEM /NutMixF12 (Gibco) oder Ham's F12 (PAA) 10% FCS 1% Penicillin/Streptomycin 2 mM L-Glutamin
Untransfizierte FLP-In <sup>TM</sup> 293	100 µg/ml Zeocin im Medium
Stabil transfizierte FLP-In <sup>TM</sup> -293	150 µg/ml Hygromycin im Medium
Opti-MEM 1	Serum-reduziertes Medium (Gibco, Invitrogen)
Penicillin-Streptomycin (100x Lösung)	10000 U/ml Penicillin 10000 µg/ml Streptomycin (Invitrogen)
L-Glutamin (100x Lösung)	200 mM L-Glutamin (Invitrogen)
Hygromycin	50 mg/ml (Invitrogen)
Zeocin	100 mg/ml (Invitrogen)
FCS	Fötales Kälber Serum (Invitrogen oder PAA)

## Material

---

Poly-L-Lysin	Zur Beschichtung von Oberflächen in Kulturschalen adhärent wachsender Zelllinien (Sigma)
Lipofectamin	Transfektionsreagenz zur Inkorporation von DNA in die Zielzellen mit kationischen Lipiden (Invitrogen)
MTSB	Microtubuli stabilisierender Puffer 80 mM Na-PIPES, pH 6,9 1 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM EGTA 4% Polyethylenglykol 6000

## 2.6 Molekulargewichtsstandards

Hyperladder I	DNA-Längenstandard mit 14 DNA-Fragmenten definierter Konzentration von 200-10000 bp (Bioline)
Hyperladder IV	DNA-Längenstandard mit 14 DNA-Fragmenten definierter Konzentration von 50-1000 bp (Bioline)
NovexSharp Prestained Protein Ladder	12 gefärbte Proteine, apparentes Molekulargewicht 3,5 – 260 kDa (Invitrogen)
MagicMark Protein Standard für Western Blot	9 rekombinante Fusionsproteine mit unterschiedlicher Anzahl repetitiver Einheiten gebunden an eine IgG Bindestelle, apparentes Molekulargewicht von 20 – 120 kDa (Invitrogen)
<i>Gel Filtration Standard</i>	Größenstandard für die Gelfiltration, enthält 4 annähernd globuläre Proteine und Vitamin B-12 mit apparentem Molekulargewicht von 1,4 – 670 kDa (BioRad)

## 2.7 Vektoren

pBluescript II KS <sup>+</sup>	Klonierungsvektor (Stratagene)
pTight	Responder-Plasmid des regulierbaren Tet-off <sup>TM</sup> oder Tet-on <sup>TM</sup> Genexpressionssystems (Clontech)



pTet-Off	Regulator Plasmid des regulierbaren Tet-off™ Expressionssystems (Clontech) zur Expression des Tetracyclin-abhängigen Trans-aktivators
pcDNA3	Klonierungsvektor (Invitrogen)
pcDNA5/FRT	Expressionsvektor für eukaryotische Expressionssysteme, sowie zur stabilen Integration von DNA in das Wirtszell-Genom mit dem Flip-In™ System (Invitrogen)
pEGFP-1	GFP-Expressionsvektor (BD Biosciences).
pOG44	Vektor zur eukaryotischen Expression von Flp Rekombinase im Flip-In™ System (Invitrogen)

## 2.8 Mauslinien

C57Bl/6j	Inzucht-Stamm, Charles River (Sulzfeld)
tgCaMKII $\alpha$ -tTA	TgCaMKII $\alpha$ tTA, transgene Promotorlinie mit mit Gewebespezifischer Expression des Tetracyclin-abhängigen Trans-aktivators (tTA) unter Kontrolle des Promotors der $\alpha$ -Untereinheit der Calcium-Calmodulin - abhängigen Proteinkinase II (Mayford <i>et al.</i> , 1996)
tgTRE-G9	TgGFPtetO7lacZ, transgene Mauslinie mit GFP und lacZ Reportergenen unter Kontrolle des bidirektionalen TRE-regulierten Promotors Pbi-1
tgTRE-NCS1E	Tg <sup>tetO7NCS-1-EGFP</sup> , transgene Mauslinie in der die das transgene NCS-1-EGFP-Fusionsgen unter Kontrolle des TRE-regulierten P <sub>Tight</sub> Promotors steht

tgCaMKII-EGFP

TgCaMKII $\alpha$ TA<sup>GFPtetO7lacZ</sup>, doppelt-transgene Mauslinie aus Kreuzung der Promotor-Linie TgCaMKII $\alpha$ TA mit der Reporter-Linie TgGFPtetO7lacZ G9, die GFP (und lacZ) unter Kontrolle des bidirektionalen Pbi-1 Promotors, indirekt kontrolliert durch den CaMKII $\alpha$ -Promotor, exprimiert (Krestel *et al.*, 2001)

tgCaMKII-NCS1E

Tg<sup>CaMKII $\alpha$ TA/tetO7NCS-1-EGFP</sup>, doppelt-transgene Mauslinie aus Kreuzung von TgCaMKII $\alpha$ TA mit Tg<sup>tetO7NCS-1-EGFP</sup> in der die Expression des transgenen Fusionsproteins NCS-1-EGFP indirekt durch die Vorderhirnspezifische Aktivität des CaMKII $\alpha$ -Promotors kontrolliert wird

## 2.9 Antikörper

Alexa Fluor<sup>TM</sup> 488 Anti-GFP

AlexaFluor<sup>TM</sup> 488 gekoppelter polyklonaler Anti-GFP Antikörper aus Kaninchen (Invitrogen)

Alexa Fluor<sup>TM</sup> 488 Esel Anti-Kaninchen-IgG

Affinitätsgereinigter Polyklonaler Anti-Kaninchen-IgG Antikörper aus Eselserum, gekoppelt mit Alexa Fluor<sup>TM</sup> 488 (Invitrogen)

Anti-ARP1

Polyklonaler Anti-ARP1 Antikörper aus Kaninchen (Sigma)

Anti-ARP3B

Monoklonaler Maus-Antikörper gegen ARP3 (Untereinheit des ARP2/3-Komplexes) (Santa Cruz Biotechnology)

Anti-ARPC3

Monoklonaler Maus-Antikörper gegen ARPC3 (p21Arc-Untereinheit des ARP2/3-Komplexes) (Synaptic Systems)

Anti- $\beta$ -Cop

Monoklonaler Maus-Antikörper gegen  $\beta$ -Cop (COPI Vesikel-Marker) (Sigma)

Anti-Bet3

Polyklonaler Anti-Bet3 Antikörper, affinitätsgereinigt aus Kaninchen-serum (Loh *et al.*, 2005)

## Material

---

Anti-ERGIC-53	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen ERGIC-53 (Marker für das ER-Golgi-intermediäre Kompartiment) (Lifespan biosciences)
Anti-FLAP1	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen FLAP1 (BD Biosciences)
Anti-GFP	Mix zweier monoklonaler Anti-GFP Antikörper (Klon7.1 und 13.1) aus Maus (Roche)
Anti-GM130	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen GM130 ( <i>cis</i> -Golgi-Marker) (BD Biosciences)
Anti-MAP2	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen MAP-2 (Microtubulus Assoziiertes Protein-2), dendritischer Marker (Chemicon)
Anti-NCS-1	Polyklonaler Anti-NCS-1 Antikörper, affinitätsgereinigt aus Kaninchen-serum (Bourne <i>et al.</i> , 2001)
Anti-PDI	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen PDI (Protein-disulfid-Isomerase, ER-Marker) (Dianova)
Anti-Rab1A	Polyklonaler Anti-Rab1A Antikörper aus der Ziege (Santa Cruz Biotechnology)
Anti-Synaptophysin	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen Synaptophysin 1, (präsynaptischer Marker) (Synaptic Systems)
Anti-Sec31A	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen Sec31A (COPII Vesikel-Marker) (BD Biosciences)
Anti-SNAP-47	Polyklonaler Anti-SNAP-47 Antikörper aus Kaninchen (Synaptic Systems)
Anti-Tau	Monoklonaler Maus Antikörper (IgG <sub>2a</sub> ) gegen Tau-1, (axonaler Marker) (Chemicon)
Anti-TGN46	Polyklonaler Schaf-Anti-TGN46 Antikörper ( <i>trans</i> -Golgi-Marker) (AbD Serotec)

## Material

---

Anti TRAPPC4	Monoklonaler Maus Antikörper gegen TRAPPC4 (Untereinheit des TRAPP-Komplexes) (Sigma)
Biotin Ziege Anti-Kaninchen-IgG	Biotinylierter polyklonaler Antikörper aus der Ziege, gerichtet gegen Kaninchen-IgG (Vector Laboratories)
Biotin Ziege Anti-Maus-IgG	Biotinylierter polyklonaler Antikörper aus der Ziege, gerichtet gegen Maus-IgG (Vector Laboratories)
Cy3 Esel Anti-Kaninchen-IgG	Affinitätsgereinigte polyklonale Anti-Kaninchen-IgG Antikörper aus Eseserum, gekoppelt mit Cy3-Fluorophor (Jackson ImmunoResearch)
Cy3 Esel Anti-Maus-IgG	Affinitätsgereinigte polyklonale Anti-Maus IgG Antikörper aus Eseserum, gekoppelt mit Cy3 Fluorophor (Jackson ImmunoResearch)
Cy3 Esel Anti-Schaf-IgG	Affinitätsgereinigte polyklonale Anti-Schaf-IgG Antikörper aus Eseserum, gekoppelt mit Cy3-Fluorophor (Jackson ImmunoResearch)
Cy3 Esel Anti-Ziege-IgG	Affinitätsgereinigte polyklonale Anti-Ziege-IgG Antikörper aus Eseserum, gekoppelt mit Cy3-Fluorophor (Jackson ImmunoResearch)
HRP Anti-Maus-IgG	Peroxidase gekoppelter polyklonaler Antikörper aus dem Schaf, gerichtet gegen Maus-IgG (Jackson ImmunoResearch)
HRP Anti-Kaninchen-IgG	Peroxidase gekoppelter polyklonaler Antikörper aus der Ziege gegen Kaninchen-IgG (Vector Laboratories)
NANOGOLD <sup>®</sup> -Ziege-F <sub>ab</sub> -anti-Maus-IgG	1,4 nm Nanogold-gekoppelte polyklonale Ziegen-F <sub>ab</sub> -Antikörperfragmente gegen Maus-IgG (Nanoprobes)

## 2.10 Fluoreszenzfarbstoffe

Folgende Fluoreszenzfarbstoffe wurden für Zellfärbungen eingesetzt.

Alexa-Fluor™ 532 Phalloidin

Phalloidin gekoppelt mit Alexa-Fluor™ 532 Fluorophor zur Fluoreszenz-markierung filamentösen Aktins (Molecular Probes, Invitrogen)

DAPI

4',6-Diamidino-2-phenylindol, Fluoreszenzfarbstoff für die Zellkern-färbung (Molecular Probes, Invitrogen)

TO-PRO®-3-Iodid

Monomerer Cyanin-Fluoreszenzfarbstoff für die Zellkern-Färbung (Molecular Probes, Invitrogen)

# 3 Methoden

## 3.1 Molekularbiologische Methoden

### 3.1.1 Handhabung von Bakterienstämmen

#### 3.1.1.1 Kultivierung von Bakterienstämmen

(Sambrook und Russel, 2001)

Mit einer ausgeglühten Impföse wurde aus, bei -80°C gelagerten, Glycerin-Dauerkulturen (in LB-Medium, 25% (v/v) Glycerin) ein Aliquot entnommen, auf LB-Platten mit spezifischem Antibiotikum ausgestrichen und ü.N. bei 37°C kultiviert. Bis zur Inokulation von Flüssigkulturen erfolgte die Lagerung der Platten bei 4°C.

#### 3.1.1.2 Herstellung kompetenter Bakterien

(Inoue *et al.*, 1990)

Auf einer LB-Tetrazyklin-Platte wurden *E.coli* XL1-Blue-Bakterien ausgestrichen und ü.N. bei 37°C kultiviert. 250 ml SOB-Medium wurden mit 10-12 Kolonien angeimpft und nach Zugabe von Magnesium (Endkonzentration: 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 10 mM MgSO<sub>4</sub>) in einem Warmluftschüttler bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von OD<sub>600</sub> = 0,45 (logarithmische Wachstumsphase) inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien 10 min auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (2500x g, 4°C, 10 min). Der Überstand wurde vollständig abgenommen, das Sediment in 80 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (2500x g, 4°C, 10 min) wurde das Bakterienpellet in 20 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert, mit DMSO zu einer Endkonzentration von 7% versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Die resuspendierten kompetenten Zellen wurden aliquotiert (zu 100µl oder 200 µl), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

#### 3.1.1.3 Transformation kompetenter Zellen

(Sambrook und Russel, 2001)

Zur Transformation des *E.coli* - Stammes XL1-Blue wurden 100 µl Suspension kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA (50-100 ng) oder mit 5 µl Ligationsansatz (~100 ng DNA; Siehe 3.1.4.5) für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Hitzeschock im Wasserbad (40 s, 42°C) und einer 5 minütigen Abkühlphase auf Eis wurden zur Regeneration ca. 9 Volumen, auf 37°C vorgewärmtes, SOC-Medium hinzu gegeben und 60 min bei 37°C im Schüttler inkubiert. Der Ansatz wurde auf LB-Platten mit Selektionsantibiotikum ausplattiert und ü.N. bei 37°C im Brutschrank belassen.

### 3.1.2 Präparation von DNA

#### 3.1.2.1 Plasmid-Präparation aus 3 ml Bakterienkulturen (Miniprep)

(GFX™ Micro Plasmid Prep Kit, Amersham Biosciences)

Die Inokulation des plasmidtragenden Bakterienstammes erfolgte aus einer Einzelkolonie einer LB-Platte mit 3 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum. Die Inkubation erfolgte bei 37°C ü.N. in einem Warmluftschüttler (200 rpm). Die Präparation wurde mit Hilfe des GFX™ Micro Plasmid Prep Kits von Amersham Biosciences durchgeführt. Von den ü.N. kultivierten Bakterienkulturen wurden 1,5 ml Bakteriensuspension zentrifugiert (3000x g, 2 min), der Überstand verworfen und das Sediment in 150 µl Lösung I (isotonische Lösung mit RNase) resuspendiert. Durch Zugabe von 150 µl Lösung II und 10- bis 15-fachem Invertieren wurden die Zellen durch alkalische Lyse aufgeschlossen, erkennbar durch das Klären der viskosen Lösung. Im Anschluss (nach maximal 3 min.) erfolgte die Neutralisation des Lysats durch Zusatz von 300 µl Lösung III, einer Acetat-Lösung mit hohem Anteil chaotroper Salze. Durch 10- bis 20-faches Invertieren wurden genomische DNA und Proteine präzipitiert. Es wurde erneut zentrifugiert (15000x g, 5 min) und der Überstand wurde auf die GFX-Micro-Säule überführt. Während 1-minütiger Inkubation erfolgte die Bindung der Plasmid-DNA an die Matrix. Es wurde zentrifugiert (15000x g, 60 s) und der Durchfluß verworfen. Es folgte ein Waschschriff durch Zugabe von 400 µl ethanolhaltigem Waschpuffer und Zentrifugation (15000x g, 60 s). Anschließend wurde die gereinigte Plasmid-DNA, nach 1-minütiger Inkubation in 50 µl Tris-Puffer (10 mM, pH 8,0), durch Zentrifugation (15000x g, 60 s) von der Säule eluiert.

#### 3.1.2.2 Plasmid-Präparation aus 50 ml Kulturen (Midiprep)

(NucleobondAX 100, Macherey & Nagel)

50 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum wurden mit einer Einzelkolonie eines plasmidtragenden Bakterienstammes von einer LB-Platte angeimpft und ü.N. bei 37°C im Warmluftschüttler (200 rpm) inkubiert. Die Präparation wurde mit Hilfe des *Nucleobond AX 100* Systems von Macherey&Nagel durchgeführt. Die Bakterienkultur wurde zentrifugiert (6000x g, 4°C, 10 min) und das gewonnene Sediment in 4 ml Puffer S1 resuspendiert. Durch Zugabe von 4 ml Puffer S2 und vorsichtigem Invertieren wurden die Zellen lysiert (maximal 5 min bei RT). Zur Neutralisation und um die Fällung der genomischen DNA und Proteine einzuleiten, wurde die Suspension mit 4 ml eiskaltem Puffer S3 durchmischt (durch Invertieren) und 10 min auf Eis inkubiert. Die ausgefällten Proteine wurden anschließend sedimentiert (10000x g, 4°C, 15 min) und der, die Plasmid-DNA enthaltende, Überstand wurde über mit Wasser befeuchtetes Filterpapier, auf eine zuvor mit 2 ml Puffer N2 äquilibrierte *Nucleobond AX 100* Säule gegeben. Die Säule wurde zweimal mit je 4 ml Puffer N3 gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Elution der säulengebundenen Plasmide durch

## Methoden

---

Zugabe von 3 ml Puffer N5. Die so gewonnene Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol präzipitiert. Nach Zentrifugation (15000x g, 4°C, 30 min) wurde das Pellet zweimal mit eiskaltem 70% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (15000x g, 4°C, 10 min), getrocknet und in Tris-Puffer (10 mM, pH 8,0) aufgenommen. Die Ausbeute der DNA wurde photometrisch bestimmt (Siehe 3.1.8) und die Konzentration auf 1 µg/µl eingestellt. Die Qualität der isolierten Plasmid-DNA wurde durch Restriktionsenzymanalyse verifiziert (Siehe 3.1.4.1).

### **3.1.2.3 Isolation genomischer DNA aus Mäuseschwänzen**

(Invisorb spin Tissue Kit, Invitek)

Als Ausgangsmaterial dienten ca. 2mm lange Schwanzbiopsien. Die Lyse des Gewebes erfolgte mit 400 µl Lysispuffer und 40 µl Proteinase K Lösung unter Schütteln bei 52°C 3 h bis ü.N. Das Lysat wurde mit 200 µl Bindungspuffer T versehen und im Anschluß auf einer Säule für eine Minute inkubiert. Die Säule wurde zweimal mit 75% Ethanol durch Zentrifugation (15000x g, RT, 2 min) gewaschen. Nach Entfernung des Ethanols wurde die an die Säule gebundene DNA mit 50 µl, auf 52°C erwärmten Elutionspuffer eluiert. Die Ausbeute an genomischer DNA wurde gegebenenfalls durch photometrische Messungen eines 1 : 100 verdünnten Aliquots bei 260 nm bestimmt.

### **3.1.2.4 Isolation genomischer DNA aus Mäuse-Ohrlochstanzen**

Nach Bestätigung der genomischen Insertion der Transgene wurden für die Genotypisierung der Folgegenerationen z.T. anstelle von Schwanzbiopsien, die bei der Ohr-Codierung anfallenden Ohrlochstanzen verwendet. Diese wurden mit 100 µl Ohrlysispuffer versetzt und ü.N. bei 55°C im Schüttler inkubiert. Zur Inaktivierung der Proteinase K erfolgte eine 30 minütige Inkubation des Lysats bei 95°C.

### **3.1.2.5 Phenol/Chloroform- Extraktion von DNA**

(Sambrook und Russel, 2001)

Zur Entfernung von Proteinen aus einer wässrigen Nukleinsäurelösung wurde diese mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform (1:1, gesättigt mit TE) versetzt, 1 min mit dem Vortex gemischt und zentrifugiert (15000x g, RT, 3 min). Die wässrige Phase wurde vorsichtig und möglichst vollständig abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

### **3.1.2.6 Ethanol-Präzipitation von DNA**

(Sambrook und Russel, 2001)

Eine wässrige Nukleinsäurelösung wurde mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat und 3 Volumen Ethanol versetzt. Die Präzipitation erfolgte für eine Stunde bei -20°C. Anschließend wurde die DNA sedimentiert (15000x g, 4°C, 30 min.), mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 10 mM Tris, pH 8,0 aufgenommen.



### 3.1.3 Mikrodialyse von DNA

Um bei gleichzeitiger Hydrolyse mit zwei Restriktionsenzymen, deren Pufferbedingungen nicht kompatibel waren, optimale Reaktionsbedingungen zu gewährleisten, wurden bis zu 50 µl eines DNA-haltigen Reaktionsansatzes auf einen Mikrodialysefilter (Millipore, Ø13 mm, Porengröße 0,025 µm) gegeben und für 30 Minuten erfolgte die Dialyse gegen H<sub>2</sub>O.

### 3.1.4 Enzymatische Modifikationen von DNA

#### 3.1.4.1 Sequenzspezifische DNA-Hydrolyse mit Restriktionsenzym

(Sambrook und Russel, 2001)

Die entsprechende Menge zu schneidender DNA wurde mit der erforderlichen Menge (in der Regel 2-5 facher Enzymüberschuss) des jeweiligen Restriktionsenzym 1-2 Stunden unter den für das Enzym-spezifischen Reaktionsbedingungen (Puffer, Temperatur) inkubiert. Eine Einheit U (*unit*) ist die Menge Restriktionsenzym, die in 60 min 1 µg Referenz-DNA in einem 50 µl Ansatz hydrolysiert. Als Referenz DNA diente dem Hersteller in der Regel genomische DNA des Lambda Phagen (49kb) oder seltener des Adenovirus-2 (36 kb). Für die Berechnung der erforderlichen Menge Restriktionsenzym werden die Anzahl der Schnittstellen und die Länge der zu schneidenden DNA berücksichtigt. Daher berechnet sich die einzusetzende Enzymmenge wie folgt:

$$\text{Einzusetzende Menge Enzym in Units} = \frac{\text{Länge DNA}}{\text{Anzahl Schnittstellen}} / \frac{\text{Länge Referenzgenom}}{\text{Anzahl Schnittstellen}} \times \mu\text{g DNA} / \text{h}$$

Genomische DNA wurde mit dem 2-3 fachen Enzymüberschuss ü.N. geschnitten. Der Reaktion wurde entweder durch Hitzeinaktivierung (75°C, 10 min) oder durch Zugabe von 25% Vol 5x DNA-Probenpuffer gestoppt. Die entstandenen Fragmente wurden elektrophoretisch in einem Agarosegel analysiert (Siehe 3.1.5). Bei gleichzeitigem Schneiden der DNA mit mehreren Restriktionsenzymen wurden die Bedingungen entsprechend den Herstellerangaben modifiziert. War eine parallele Hydrolyse aufgrund der notwendigen Pufferbedingungen nicht möglich, wurde sequentiell geschnitten und zwischen den Restriktionen eine Hitzeinaktivierung mit anschließender Mikrodialyse des Restriktionsansatzes durchgeführt.

#### 3.1.4.2 Phosphorylierung von DNA- Fragmenten

(Sambrook und Russel, 2001)

Die zu phosphorylierende DNA (Restriktions- oder PCR-Fragment) wurde in T4-PNK-Puffer mit der erforderlichen Menge T4-Polynukleotidkinase (1 U pro 50 pMol 5'-Enden, 37°C, 30 min) inkubiert. Anschließend wurde durch Hitzebehandlung (65°C, 10 min) inaktiviert und die

phosphorylierte DNA entweder durch Gelelektrophorese gereinigt oder direkt in den Ligationsansatz gegeben.

### 3.1.4.3 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

(Sambrook und Russel, 2001)

Zur Vermeidung intramolekularer Reaktionen kompatibler Enden des Vektors während der Ligation wurden die freien 5'-Enden mit alkalischer Phosphatase (*calf intestine*) dephosphoryliert. Die zu dephosphorylierende DNA wurde unter Zugabe von Dephosphorylierungspuffer und alkalischer Phosphatase (1 U pro pmol 5'-Enden) 1 h bei 37°C inkubiert. Die dephosphorylierte DNA wurde anschließend gelelektrophoretisch aufgereinigt.

### 3.1.4.4 Auffüllreaktion überhängender 5'-Enden

(Sambrook und Russel, 2001)

Zur Ligation nicht kompatibler, überhängender 5'-Enden von DNA-Fragmenten wurden diese durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aufgefüllt. Zunächst wurde der entsprechende Ansatz nach Hitzeinaktivierung des Restriktions-Enzyms auf Eis gekühlt und eine Konzentration von 100 pM dNTP eingestellt. Die erforderliche Menge Auffüllpuffer wurde zugegeben und anschließend mit 1 U DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) für 30 min bei 37°C inkubiert. Darauf folgte eine Hitzeinaktivierung des Enzyms (75°C, 10 min). Die DNA wurde gelelektrophoretisch aufgereinigt (Siehe 3.1.5) oder direkt in der Ligationsreaktion (Siehe 3.1.4.5) eingesetzt.

### 3.1.4.5 Ligation von DNA-Fragmenten

(Sambrook und Russel, 2001)

In einem Reaktionsvolumen von 10 µl wurden insgesamt 200 ng DNA eingesetzt. Vektor-DNA und Fragment-DNA wurden in equimolarem Verhältnis oder mit bis zu dreifachem molarem Überschuss der Fragment-DNA in Ligationspuffer mit T4-DNA-Ligase (1 Weiss-Unit) inkubiert (Ligation überhängender Enden 2h bis ü.N bei 16°C, Ligation stumpfer Enden ü.N. bei RT mit 5% PEG4000 im Ligationsansatz). Der Ansatz wurde in der Regel direkt zur Transformation eingesetzt. Um gegebenenfalls die Transformationseffizienz zu erhöhen wurde die Ligase mitunter durch 10 min Inkubation bei 65°C inaktiviert.

## 3.1.5 DNA-Agarosegelelektrophorese

(Sambrook und Russel, 2001)

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden horizontale Agarosegele in Elektrophoresekammern (Owl Separation Systems) mit TAE-Puffer verwendet. Entsprechend der aufzutrennenden Fragmentgrößen wurden Agarosekonzentrationen von 0.8 bis 2% (v/v) in TAE-Puffer mit 0.5 µg/ml Ethidiumbromid eingesetzt. Der zu

analysierende DNA-Ansatz wurde mit der entsprechenden Menge an DNA-Probenpuffer versetzt und in die Probestaschen des Agarosegels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 80-135 Volt (Pharmacia LKB GPS 200/400). Die Laufzeit richtete sich nach den Erfordernissen der jeweiligen Trennung. Die Detektion der DNA erfolgte auf einem UV-Leuchttisch bei 366 nm.

### 3.1.6 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

(GFX<sup>TM</sup>- PCR DNA and Gel Band Purification Kit, Amersham Biosciences)

Das aufzureinigende DNA-Fragment wurde unter UV-Licht (wenn das Signal stark genug war 380 nm, sonst 360 nm) ausgeschnitten, gewogen und mit dem 10fachen Volumen *Capture*-Puffer versehen. Im Thermoschüttler wurde das Gelfragment gelöst (10 min 60°C). Die Suspension wurde auf die GFX-Säule geladen, 1 min inkubiert und zentrifugiert (15000x g, RT, 1 min). Anschließend wurde die an die Säule gebundene DNA mit 500 µl Waschpuffer durch Zentrifugation (15000x g, RT, 1 min) gewaschen. Die DNA wurde nach 1 min Inkubation mit 30 µl 10 mM Tris, pH 8,0, durch Zentrifugation (15000x g, 1 min) eluiert.

### 3.1.7 Aufreinigung von DNA für Pronukleusinjektion

(EndoFree Plasmid Maxi Kit, Qiagen)

Um möglichst reine DNA für die Pronukleusinjektion zur Verfügung zu haben, wurde die klonierte DNA (NCS-1-EGFP in pTight) in *E.coli* XL1-Blue Zellen transformiert und eine endotoxinfreie Plasmid-Maxi-Präparation aus einer 100 ml Kultur durchgeführt. Die Zellen wurden ü.N. bei 37°C unter stetigem Schütteln kultiviert, durch Zentrifugation (6000x g, 4°C, 15min) geerntet und das gewonnene Sediment in 12 ml Puffer S1-EF (100 mg/ml RNase A) resuspendiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von 12 ml Lösung P2 und Durchmischen durch 7-faches Invertieren lysiert. Nach 3 min bei RT wurde mit 12 ml vorgekühlter Lösung S3-EF (4°C) und vorsichtigem Mischen, durch 7-faches Invertieren, neutralisiert. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurde das Lysat, durch Zentrifugation (8000x g, 4°C, 30 min) und anschließender Filtration durch einen mit Lösung N2-EF benetzten Faltenfilter, geklärt. Das geklärte Lysat wurde auf eine mit Lösung N2-EF äquilibrierte NucleoBond<sup>®</sup> AX500 Säule gegeben. Die Säule mit der gebundenen DNA wurde 2x mit je 24 ml Puffer N3-EF und 2x mit je 12 ml Puffer N4-EF gewaschen. Die Elution erfolgte mit 15 ml Lösung N5-EF. Durch Zugabe von 11 ml Isopropanol und sorgfältigem Mischen wurde die präzipitierte DNA durch 30 min Zentrifugation mit 15000x g bei 12°C pelletiert. Das DNA-Pellet wurde bei RT mit 5 ml Endotoxin-freiem 70% Ethanol gewaschen und bei RT an der Luft getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in Endotoxinfreiem TE-Puffer gelöst.

## Methoden

---

Der Bereich der Plasmid-DNA für die Pronucleus Injektion wurde zur Qualitätskontrolle erneut sequenziert. Durch Restriktionsenzym-Hydrolyse (*XhoI/NgoMI*) wurde unnötige Vektorsequenz entfernt und das Konstrukt linearisiert. Nach Ethidiumbromid-freier gelelektrophoretischer Auftrennung und anschließender Aufreinigung der ausgeschnittenen DNA wurde die DNA mit Injektionspuffer eluiert. Nach zusätzlicher Dialyse gegen den Injektionspuffer zur Minimierung des Salzgehaltes wurde die DNA auf eine Endkonzentration von 10 ng/µl eingestellt und zur Pronukleusinjektion abgegeben (PD Dr. Irm Hermanns-Borgmeyer, Serviceeinheit Transgene Tiere im ZMNH). Es wurden 10 fl pro Pronukleus injiziert, was ca. 350 Molekülen entspricht.

### 3.1.8 Konzentrationsbestimmungen von DNA-Lösungen

(Sambrook und Russel, 2001)

Die Ausbeute der präparierten DNA wurde mit dem Gene Quant RNA/DNA-Calculator (Pharmacia Biotech) bestimmt. Die DNA-Lösung wurde mit Wasser verdünnt und gegen Wasser als Leerwert die Absorption bei 260 nm und 280 nm in Quarzglasküvetten (Schichtdicke 1 cm) gemessen, wobei eine optische Dichte  $OD_{260} = 1$  einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml entsprach.

### 3.1.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

#### 3.1.9.1 Standard-PCR

(Saiki *et al.*, 1988)

Die Amplifikation von DNA durch die Polymerase-Kettenreaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl in folgendem Ansatz durchgeführt:

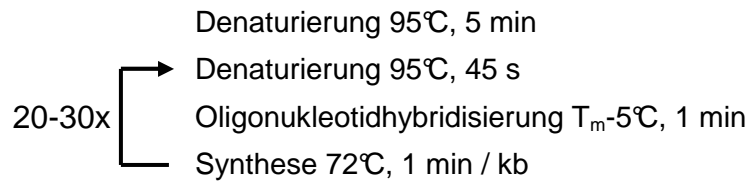
Genomische-DNA	10-100 ng
Oligonukleotid 1	50 pMol
Oligonukleotid 2	50 pMol
MclCl <sub>1</sub>	2 mM
DMSO	5%
PCR-Puffer (10x)	10%
dNTPs	0,5 mM
Taq-Polymerase	2,5 U

Bei Amplifizierung von DNA-Fragmenten mit hohem GC-Gehalt wurde der Standardansatz um DMSO (5%(v/v)) und /oder Betain (1M) erweitert. Um eine vollständige Denaturierung der Matrize zu gewährleisten, wurde zu Beginn jeder PCR eine Vorinkubation von 95°C für 5 min durchgeführt. Die Reaktionen erfolgten in einem Trio-Block (Biometra) bzw. im Peltier

## Methoden

---

Thermal Cycler (MJ Research) in 20-30 Temperaturzyklen unter folgenden Reaktionsbedingungen:



Zur vollständigen Synthese der RCR-Produkte wurde der Ansatz anschließend für 5 min bei 72°C inkubiert, danach auf 4°C abgekühlt und bis zu r weiteren Bearbeitung bei dieser Temperatur gelagert. Soweit die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der Oligonukleotide nicht vom Hersteller angegeben war, wurde folgende Formel zur Berechnung von  $T_m$  verwendet:

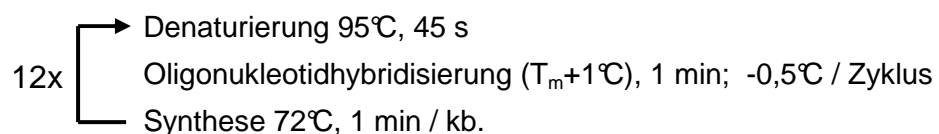
$$T_m = 4x \text{ Anzahl (G + C)} + 2x \text{ Anzahl (A + T)}$$

Waren die Schmelztemperaturen der verwendeten Oligonukleotide unterschiedlich, wurde die Hybridisierungstemperatur nach dem niedrigerem  $T_m$ -Wert ausgewählt.

### 3.1.9.2 Touch-down-PCR

(Don *et al.*, 1991)

Während der PCR-Zyklen wird die Anlagerungstemperatur kontinuierlich von einem Wert oberhalb der zu erwartenden  $T_m$  auf einem Wert unter  $T_m$  abgesenkt. Der PCR-Ansatz entsprach dem der Standard-PCR. Die Reaktion wurde im Peltier Thermal Cycler (MJ Research) durchgeführt. Nach einer Vorinkubation von 5 min bei 95°C erfolgten zunächst 12 Temperaturzyklen unter *Touch-down*-Reaktionsbedingungen durchgeführt:



Anschließend erfolgten 25 Zyklen unter Standard-PCR-Bedingungen, mit  $T_m-5^\circ\text{C}$  als Hybridisierungstemperatur. Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch analysiert und ggf. für anschließende Klonierungen gereinigt.

### 3.1.9.3 Genotypisierung mittels PCR

Zur Genotypisierung der doppelt-transgenen Mäuse (tgCaMKII-NCS1-E) wurden zwei PCR-Ansätze etabliert. Zum Nachweis des Transaktivator-Transgens in den Mauslinien C2A-tTA und C2A-NCS-1E wurde eine Touchdown-PCR durchgeführt, bei der in den ersten 12 Zyklen der RCR die Hybridisierungstemperatur der Primer (tTA-6c und tTA-7nc) von 64°C jeweils

um 0,5°C pro Zyklus auf schließlich 58°C abgesenkt wurde mit anschließend 25 Zyklen mit 58°C als Hybridisierungstemperatur. Die erwartete Fragmentgröße für tTA betrug 469 bp. Der Nachweis des NCS-1-EGFP Transgens in den Mauslinien TRE-NCS1E und C2A-NCS1E erfolgte mittels der Primer *tgfw* und *tgrv* unter *Touch-down*-PCR-Bedingungen. Dabei wurde in den ersten 12 Zyklen die Hybridisierungstemperatur von 59°C um 0,5°C pro Zyklus auf schließlich 53°C abgesenkt, anschließend folgten 29 Zyklen mit 59°C. Die erwartete Fragmentgröße für NCS-1-EGFP betrug 908 bp.

### 3.1.9.4 Zyklische Sequenzierung und Sequenzanalyse von DNA

(Sanger et al., 1977)

Das Prinzip der zyklischen Sequenzierung beruht auf einer Kombination der PCR-Methode (Mullis *et al.*, 1986) mit der Didesoxy-Terminationsmethode zur DNA-Sequenzierung (Sanger *et al.*, 1977). Der Reaktionsansatz enthielt lediglich ein Oligonukleotid und zusätzlich zu den normalen Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP) auch Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTP), die zu einem Abbruch in der Synthesereaktion führten. Die vier verschiedenen ddNTP waren mit vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt. Durch das stöchiometrische Verhältnis von dNTPs zu ddNTPs entstand während der PCR-Sequenzierung eine Population von DNA-Fragmenten verschiedener Größen. Diese Fragmente besaßen ein übereinstimmendes 5'Ende, das durch den Oligonukleotid-Primer bestimmt wird, und variable 3'Enden, festgelegt durch das jeweilige eingebaute fluoreszenzmarkierte ddNTP. Da die Fluoreszenzmaxima der einzelnen Farbstoffe bei unterschiedlichen Wellenlängen liegen, konnte nach einem Kettenabbruch das jeweilige DNA-Fragment durch sein fluoreszenzmarkiertes ddNTP detektierbar. Die sukzessive Betrachtung der DNA-Fragmente gemäß ihrer Größe eröffnete die Sequenz der untersuchten DNA.

Die Sequenzierung doppelsträngiger DNA erfolgte mit dem ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Kit und dem ABI 377 DNA-Sequenziergerät (Perkin-Elmer) durch Mitarbeiter der Serviceeinheit DNA-Sequenzierung im ZMNH. Die Daten wurden mit Hilfe der DNASTar Software analysiert (*DNASTar Inc.*).

### 3.1.10 RNA-Techniken

Alle Arbeiten mit RNA wurden unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt. Lösungen (und z.T. Glasgefäße) wurden mit DEPC-H<sub>2</sub>O (0,1% (w/v) DEPC in H<sub>2</sub>O, ü.N bei RT gerührt und anschließend autoklaviert) angesetzt.

#### 3.1.10.1 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentration wässriger Nukleinsäurelösungen wurde photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Dazu wurde die isolierte RNA auf Eis in

## Methoden

---

geeigneter Weise mit TE-Puffer oder H<sub>2</sub>O (DEPC-H<sub>2</sub>O) verdünnt und gegen die Verdünnungslösung als Leerwert unter Verwendung von Quarzküvetten (Schichtdicke 1 cm) gemessen (Gene Quant RNA/DNA Calculator, Pharmacia Biotech). Bei einzelsträngigen Oligonukleotiden entspricht 1 OD<sub>260</sub> einer Konzentration von 33 µg/ml.

### 3.1.10.2 *In vitro* Transkription

(MAXIscript<sup>®</sup> T7 *in vitro* Transcription Kit, Applied Biosystems)

Für die EGFP-antisense Sonde diente als Matrizen-DNA ein, durch *Bam*HI-Hydrolyse von pcDNA3-EGFP gewonnenes 423 bp Fragment, das zuvor in pBluescript II KS<sup>+</sup> kloniert worden war (pBSII-KS+-EGFP-ISH-Sonde). Nach Restriktion mit *Bam*HI und *Xho*I, Phenol/Chloroform Aufreinigung und Ethanol-Fällung wurde 1 µg DNA in einem 20 µl-Reaktionsansatz, mit je 0,5 mM ATP, CTP, GTP und 13 µM α-35S markiertem UTP (~800 Ci/mmol) eingesetzt. Die radioaktive RNA-Sonde wurde mit T7-RNA-Polymerase *in vitro* transkribiert. Durch anschließenden DNase-Reaktion (1U/Ansatz) wurde die Matrizen DNA entfernt (15min, 37°C). Zur Beendigung der Reaktion wurde 1 µl 0,5 M EDTA hinzugegeben. Die RNA-Sonde wurde über *Probe Quant*<sup>™</sup> G50 Micro-Säulen (Amersham Biosciences) aufgereinigt und in 50 µl STE eluiert. Die Endkonzentration der mit α-35S-UTP radioaktiv markierten RNA-Sonde wurde mit Hilfe eines Szintillationszählers auf 1x 10<sup>6</sup> - 5x 10<sup>6</sup> cpm/ml in *in situ* Hybmix eingestellt.

### 3.1.11 RNA *in situ* Hybridisierung an Gewebeschnitten

Nach Anfertigung sagittaler Kryoschnitte (3.1.1.1) erfolgte die *in situ* Hybridisierung (ISH) in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Susanne Fehr aus der Serviceeinheit Morphologie des ZMNH.

#### 3.1.11.1 Vorbehandlung der Präparate

Von unfixierten, in Tissue-Tek<sup>®</sup>-Kryoeinbettmedium eingefrorenen (-20°C) Maus-Hirne n wurden am Kryostat (Jung *Frigocut 2800E*) 16 µm dünne Gefrierschnitte angefertigt. Das Gewebe wurde auf SuperFrost<sup>™</sup> Objektträger (Menzel-Gläser) aufgezogen und bei -80°C gelagert. Vor der ISH wurde 10 min mit 4% Paraformaldehyd (in PBS) fixiert und 3x 5 min in PBS gewaschen. Zur Reduzierung des unspezifischen Hintergrundes bei der Hybridisierung wurden freie Aminogruppen durch Präinkubation der Schnitte für 3 min in 0,1 M Triethanolaminpuffer (pH 8,0) und 0,25 % Acetanhydrid 10 min acetyliert. In einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 3 min in 30, 50, 70, 95 und 100%igem EtOH) wurden die Schnitte dehydriert und 10 min bei RT getrocknet.

#### 3.1.11.2 *In situ* Hybridisierung

Zunächst werden die Schnitte 2h bei 50°C in Prähybridisierungspuffer inkubiert. Für die Hybridisierungsreaktion wurden 100 µl der radioaktiv markierten RNA-Sonde

## Methoden

---

(Endkonzentration  $1 \times 10^6$  -  $5 \times 10^6$  cpm/ml in *in situ* Hybmix) auf die Schnitte pipettiert und mit Deckgläsern abgedeckt. Nach der Hybridisierung bei 50°C ü.N. wurden die Deckgläser in 4x SSC abgeschoben. Danach wurde 3x 5 min in 4x SSC gewaschen. Der Anteil der ungebundenen Sonden wurde durch eine einzelstrangspezifische RNase A-Reaktion (20 mg/l) in vorgewärmten RNase A-Puffer entfernt. Nach 30 min Inkubation bei 37°C erfolgte eine Inkubation in RNase-freiem ISH-Waschpuffer für 30 min bei 37°C. Auf den abschließenden Waschschrift mit, auf 50°C vorgewärmten, 2x SSC für 2x 15 min, folgten 10 s in H<sub>2</sub>O und dann eine aufsteigende dehydrierende Alkoholreihe (je 3 min in 30, 50, 70, 95 und 100% Ethanol). Den getrockneten Präparate wurden anschließend Kodak Biomax MR oder MS Filme 2-5 Tage exponiert.

## 3.2 Proteinbiochemische Methoden

### 3.2.1 Präparation von cytosolischem und Membran-Protein aus kultivierten Zellen

$1-2 \times 10^7$  Zellen wurden in eiskaltem LC- oder LE-Puffer mit Protease Inhibitor Mix (10 µl / ml) gewaschen und mit einer Dichte von  $1 \times 10^7$  Zellen / ml Puffer, nach 5-minütiger Inkubation auf Eis, in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator mit einem Teflonpistill auf Eis homogenisiert (50 Stöße, 800 U/min). Nach erfolgter Lyse der Zellen wurde eine Endkonzentration von 300 mM Sucrose eingestellt. Das Lysat wurde zentrifugiert (1000x g, 4°C, 7 min), das Pellet wurde resuspendiert, erneut homogenisiert und wieder zentrifugiert. Die Überstände beider Zentrifugationen (postnucleärer Überstand, PNS) wurden vereinigt. Nach Ultrazentrifugation der PNS (100000x g, 4°C, 40 min) wurden die im Pellet befindlichen Membranproteine in LC- oder LE-Puffer mit 300 mM Sucrose resuspendiert, Aliquots für die Konzentrationsbestimmung (3.2.5) wurden entnommen. Der 100000x g Überstand und das resuspendierte Pellet wurden mit LDS-Probenpuffer (Invitrogen) und *reducing agent* (Invitrogen) auf das gleiche Volumen eingestellt, 10 min bei 70°C inkubiert und anschließend bei -70°C aufbewahrt.

### 3.2.2 Präparation von cytosolischem und Membran-Protein aus Gehirnextrakten

Nach CO<sub>2</sub>-Narkose und Dekapitation wurden die Gehirne der zu analysierenden Mäuse aus dem Schädel präpariert und kurz in eisgekühltem PBS gewaschen. Gegebenenfalls wurden in eiskaltem PBS unterschiedliche Gehirnregionen (Bulbus olfactorius, Hippokampus, Striatum, Cortex) präpariert. Das Gewebe wurde mit dem zweifachen Volumen Lysispuffer auf Eis mit einem Potter-Elvehjem-Homogenisator homogenisiert (25 Stöße, 800 rpm). Das



Lysat wurde auf 300 mM Sucrose eingestellt und wie bei der Protein-Präparation aus kultivierten Zellen (3.2.1) weiterbehandelt.

### **3.2.3 Protein-Präparation für die Identifikation von NCS-1-Bindepartnern aus Gehirnextrakten (S2-Fraktion)**

Die Präparationsbedingungen orientierten sich an den Bedingungen für die Co-Aufreinigung von Hefe Pik1 mit gebundenem Frq1 (Flanagan und Thorner 1992; Hendricks *et al.*, 1999; Huttner *et al.*, 2003). Die Gewebepräparation erfolgte wie unter 3.2.2 beschrieben in eiskaltem PBS. Das Gewebe wurde mit dem zweifachen Volumen HEPES-Lysispuffer auf Eis mit einem Potter-Elvehjem-Homogenisator homogenisiert (25 Stöße, 800 U/min). Durch Zentrifugation bei 1000x g (7 min bei 4°C) wurden Kerne und nicht lysiertes Gewebe pelletiert. Aus dem postnucleären Überstand (PNS, S1) wurde nach anschließender 30-minütiger Ultrazentrifugation bei 30000x g, der Überstand S2, sowie das Pellet P2 erhalten. Aus je 6 Hirnen wurden ca. 2 ml S2 Überstand erhalten, typischerweise mit einer Proteinkonzentration von ca. 10 mg / ml.

### **3.2.4 Gelchromatographie zur Präfraktionierung der löslichen Proteinfraktion S2**

Die Gelfiltration wurde mit dem ÄKTA<sup>TM</sup>-FPLC System (Amersham Bioscience) über eine HiLoad<sup>TM</sup> 16/60 Superdex<sup>TM</sup> 200 prepgrade Säule (Amersham Bioscience) durchgeführt. Die Säulenmatrix wurde mit 2 Säulenvolumen HEPES-Lysispuffer äquilibriert. Die eingesetzte Proteinfraktion S2 wurde filtriert (0,2 µm) und unmittelbar vor dem Auftragen für 1 min zentrifugiert (15000x g). Es wurden maximal 2,4 ml (2% des Säulenvolumens), in der Regel allerdings nur 2 ml, Proteinfraktion S2 aufgetragen. Zwischen dem Leervolumen  $V_0$  (bei dem Elutionsvolumen  $V_e = 40$  ml) und dem Säulenvolumen  $V_t$  (bei  $V_e = 120$  ml) wurden 16 Fraktionen á 5 ml gesammelt, die Flussrate betrug 1 ml / min.

### **3.2.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen**

Zur Herstellung einer Standardkurve wurde eine BSA-Lösung in dem entsprechenden Puffer der zu messenden Proteinlösung, so verdünnt, dass sich Konzentrationen zwischen 0,1 und 2 mg / ml ergaben.

#### **3.2.5.1 DC Proteinbestimmung**

(BioRad)

Bei der DC-Proteinbestimmung handelt es sich um eine Modifikation des Protokolls nach Lowry *et al.* (1951). In einer 96-Well Platte wurden 5 µl Probe (1:10 oder 1:50 Verdünnung)

oder BSA-Eichstandard mit 25 µl Reagenz A' und 200 µl Reagenz B, durch Auf- und Abpipettieren durchmischt. Nach 15 min Inkubation bei RT wurde die Absorption bei 750 nm gemessen. Die Proteinkonzentration wurde anhand der BSA-Standardreihe ermittelt. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt und die Werte gemittelt.

### 3.2.6 Aufkonzentrieren von Proteinlösungen durch Ultrafiltration

Die Ultrafiltration erfolgte bei 7155x g durch Omega<sup>TM</sup>-Membran (aus modifiziertem Polysulfonether auf einer Polyethylen-Matrix) in Microsep<sup>TM</sup> Micro-Konzentratoren (Pall Filtron) mit einer nominalen Molekulargewichtsausschlussgrenze (NMWC - *nominal molecular weight cut off*) von 30 kDa und 3,5 ml Einsatz-Volumen. Die Dauer der Zentrifugation, um 1 ml gelchromatographischer Fraktion von Maushirnlysat, auf etwa 250 µl, also ca. 4x aufzukonzentrieren, betrug etwa 20 min. Vor dem Aufkonzentrieren wurden Micro-Konzentratoren zur Reinigung, durch Zentrifugation, zunächst mit 3 ml H<sub>2</sub>O, anschließend mit 3 ml NaOH (0,3 M) und dann 3x mit je 3 ml H<sub>2</sub>O gespült.

### 3.2.7 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitationen erfolgten mit Dynabeads-Protein-G (Dyna<sup>®</sup>, Invitrogen). Es handelt sich dabei um Polystyrol-Mikrokügelchen von 2,8 µm Durchmesser mit einem magnetischen Metallkern. Protein G ist ein Zellwand-Protein aus Bakterien der Gattung *Streptococcus*, das Immunglobuline mit hoher Affinität bindet. Dynabeads-Protein-G enthalten rekombinantes Protein G, dem der Albumin-bindende N-Terminus fehlt und das kovalent an die Polystyrolmatrix gekoppelt ist. Sie können, mit gebundenen Antikörper-Antigen-Komplexen im magnetischen Feld isoliert werden.

#### 3.2.7.1 Waschen von Dynabeads-Protein-G

Die Dynabeads wurden durch 1-2 min. Schütteln am Vortex resuspendiert. 100 µl Dynabeads-Protein-G-Suspension (50% (m/V) in PBS, 0,1% Tween20, 0,02% Natriumazid) wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und durch 1 min Inkubation im Magnetständer sedimentiert (bzw. an der dem Magneten zugewandten Seite der Gefäßwand angelagert). Der Überstand wurde entfernt und die Dynabeads wurden durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mit 0,5 ml (dem 5-fachen des ursprünglichen Volumens der Dynabeads-Protein-G-Suspension) Natriumcitrat-Puffer (pH 5,0) gewaschen. Nach erneuter Separation von Dynabeads-Protein-G und Lösung im Magnetständer wurde der Waschschrift 2x wiederholt.

#### 3.2.7.2 Binden von Antikörpern an Dynabeads-Protein-G

Auf die Dynabeads wurde gemäß Tabelle 3.1 die entsprechende Menge des eingesetzten Antikörpers gegeben.

Antikörper	V(AK) / V(Dynabeads)
Anti-GFP (Roche)	1,2
Anti-NCS-1 (Bourne <i>et al.</i> , 2001)	1,0
Anti-SNAP-47 (Synaptic Systems)	1,0

**Tab. 3.1, Volumenverhältnis von Antikörpern und Dynabeads**

Nach 40 min Schütteln bei RT wurde nach 2 min Inkubation im Magnetständer der Überstand entfernt und die Antikörper-gebundenen Dynabeads wurden 3x mit Natriumcitrat-Puffer (pH 5,0, 0,01% Tween20) gewaschen.

### **3.2.7.3 Kovalente Kopplung der gebundenen Antikörper an Dynabeads-Protein-G**

Die Antikörper-gebundenen Dynabeads wurden 2x mit Triethanolamin (0,2M, pH 8,2) gewaschen und dann in 1 ml 20 mM Dimethyl-pimelimidat (DMP) in 0,2 M Triethanolamin (pH 8,2) resuspendiert. Es wurde 30 min bei RT auf dem Rotationsschüttler inkubiert. Nach 1-2 min. auf dem Magnetständer wurde der Überstand entfernt und die Kopplungs-Reaktion wurde durch Resuspendieren der Dynabeads in Tris-Puffer (50 mM, pH7,5) gestoppt. Nach 15 min Inkubation auf dem Rotationsschüttler wurden die Antikörper-gekoppelten Dynabeads 3x gewaschen (in PBS, 0,01% Tween-20 oder in HEPES-IP-Lysis-Puffer).

### **3.2.7.4 Immunpräzipitation mit Antikörper-gekoppelten Dynabeads**

Auf die Antikörper-gekoppelten Dynabeads wurde direkt die Antigen-enhaltende Lösung (Hirnlisat-Fraktion S2 oder aufkonzentrierte Gelchromatographie-Fractionen) gegeben und 1 h. bei 4°C auf dem Rotationsaschüttler inkubiert. Nach 2 min Inkubation auf dem Magnetständer wurde der Überstand entfernt und die Dynabeads mit dem gebundenen Immunpräzipitat wurden 2x - 5x bei 4°C und anschließend 1x bei RT mit entsprechend temperiertem HEPES-IP-Lysis-Puffer gewaschen.

### **3.2.7.5 Elution des Immunpräzipitats von Antikörper-gekoppelten Dynabeads Protein G**

Die Elution des Immunpräzipitats erfolgte durch Resuspension in LDS-Probenpuffer (NuPAGE, Invitrogen) mit reduzierendem Agens (NuPAGE, Invitrogen) und anschließender Inkubation bei 70°C für 10 min.

Alternativ wurde das Immunpräzipitat von den Dynabeads durch Inkubation mit niedrigem pH-Wert eluiert. Dazu wurden das Immunpräzipitat auf den Dynabeads in Natriumcitrat-Puffer (pH 2,5) resuspendiert und 2 min. bei RT inkubiert. Nach 1 min Inkubation auf dem Magnetständer wurde der Überstand mit dem enthaltenen Eluat in ein frisches Gefäß überführt und durch Zugabe von 0,5 Volumen TRIS-Puffer (1M, pH8,7) neutralisiert. Zur Kontrolle der Vollständigkeit wurde anschließend mit den Dynabeads noch die Elutionsprozedur mit NuPAGE LDS-Probenpuffer durchgeführt.

### **3.2.7.6 Optionale Vorreinigung (*Preclearing*) von Maus-Hirnlysat Fraktion S2 mit BSA-blockierten Dynabeads Protein G und Blockieren von Antikörper-gekoppelten Dynabeads Protein G für die Immunpräzipitation**

Bei Immunpräzipitationen, die mit Antikörpern aus Kaninchen direkt mit der S2-Fraktion von Maus-Hirnlysate (3.2.3) durchgeführt wurden, erfolgte zunächst eine Vorreinigung der S2-Fraktion, um unspezifische Hintergrundbindungen zu minimieren. Dazu wurde vor der eigentlichen Immunpräzipitation die S2-Fraktion mit nicht-immun-Antikörpern (*ChromPure* Kaninchen IgG, Jackson ImmunoResearch) und nicht-immun-Serum (Kaninchen-Normalserum, Jackson ImmunoResearch) inkubiert. Die Vorreinigung (bzw. das *precleaning*) erfolgte mit einem Überschuss von Dynabeads-Protein-G, die zuvor mit Rinder-Serum-Albumin (BSA) inkubiert wurden, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren.

Die eigentliche Immunpräzipitation erfolgte danach aus dem vorgereinigten Lysat mit Antikörper-gekoppelten Dynabeads, die mit BSA blockiert worden waren.

### **Blockieren von Dynabeads-Protein-G mit BSA zur anschließenden Vor-Reinigung der S2-Fraktion**

400 µl Dynabeads-Protein-G (50% (v/v) in PBS, 0,1% Tween20, 0,02% Natriumazid) wurden nach dem Waschen (3.2.7.1) in 1 ml HEPES-IP-Lysis-Puffer mit 2% (v/v) BSA suspendiert und 1 h bei 4°C auf dem Rotationsschüttler inkubiert. Anschließend wurden die BSA-blockierten Dynabeads 3x mit HEPES-IP-Lysis-Puffer (ohne BSA) gewaschen.

### **Vorreinigung (*Preclearing*) der S2-Fraktion des Maus-Hirnlysats**

Zu 650 µl S2-Fraktion wurden 5 µl *ChromPure* Kaninchen IgG (55 µg) und 5% (v/v) Kaninchen-Normalserum gegeben und es wurde 1 h bei 4°C auf dem Rotationsschüttler inkubiert. Anschließend erfolgte die Vor-Reinigung mit einem Überschuss BSA-blockierter Dynabeads. Es wurde die entsprechende S2 Fraktion dabei nacheinander zweimal je 1 h bei 4°C auf dem Rotationsschüttler inkubiert. Für 650 µl S2-Fraktion wurden dabei jeweils 200 µl (Ursprungsvolumen) BSA-blockierter Dynabeads eingesetzt.

### **Blockieren Antikörper-gekoppelter Dynabeads mit BSA für die anschließende Immunpräzipitation**

Antikörper-gekoppelte Dynabeads (3.2.7.3) wurden mit 2% BSA in HEPES-IP-Lysispuffer 1h bei 4°C auf dem Rotationsschüttler inkubiert und anschließend 3x mit HEPES-IP-Lysispuffer (ohne BSA) gewaschen. Danach wurden die BSA-blockierten Antikörper-gekoppelten Dynabeads für die Immunpräzipitation (3.2.7.4) aus vorgereinigter S2-Fraktion des Maushirnlysats eingesetzt.

### 3.2.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

(Invitrogen)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteingemischen erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) in *XCell SureLock™ Mini-Cell*-Kammern (*Invitrogen*). Zur Auftrennung der Proteine wurden Bis-Tris-Fertig-Gele (NuPAGE® Novex, *Invitrogen*) verwendet. Die aufzutragende Proben wurden wie folgt angesetzt:

	für 10 µl Gesamtvolumen
Proteinlösung	maximal 6,5 µl
NuPAGE LDS Probenpuffer (4x)	2,5 µl
NuPAGE Reduzierendes Agens	1 µl
H <sub>2</sub> O	ad 10 µl

Der Ansatz wurde für 10 min bei 70°C inkubiert. Für die Elektrophorese wurden 4-12%-Gradienten- oder 10%-Bis-Tris Gele mit maximal 30 µl (je nach Taschengröße) beladen. Es erfolgte die elektrophoretische Auftrennung in MOPS- oder MES- SDS-Laufpuffer mit Antioxidans (Nu-PAGE®, *Invitrogen*) bei 150-200 V, dabei diente der Farbstoff des Probenpuffers als Laufzeitmarker. Sollte das Gel zur Western-Blot-Analyse (3.2.10) eingesetzt werden, wurde das Sammelgel entfernt und das verbliebene Trenngel wurde zur Orientierung der Proben markiert.

### 3.2.9 Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen

Die Färbung im Polyacrylamidgel aufgetrennter Proteine mit kolloidalem Coomassie-Brilliant-Blau-G-250 (Roti® Blue, Roth) erfolgte in Färbelösung ü.N. bei RT. Es wurde anschließend 2x 5 min mit Waschlösung gewaschen und dann 2x 30 min mit Wasser. Zur Aufbewahrung wurden die Gele zwischen Dialysemembran in einem Geltrockner (*BioRad*) getrocknet.

#### 3.2.9.2 Ausschneiden und Dehydrieren Coomassie-gefärbter Banden aus Polyacrylamid-Gelen

Die entsprechenden Banden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zum Dehydrieren wurden die Gelfragmente 10 min mit 0,5 ml Acetonitril inkubiert und nach entfernen des Acetonitrils in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

### 3.2.10 Western Blot-Analyse

#### 3.2.10.1 Elektrophoretischer Transfer

(Towbin *et al.*, 1979)

Für den Proteintransfer aus einem Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrozellulosemembran (Protan Nitrozellulose BA 85, 0,45 µm, Schleicher & Schüll) wurde eine *MINI-TRANSBLOT*-Apparatur (BioRad) verwendet. Nach der Gelelektrophorese wurde ein Transferstapel (Schwamm, 2x Filterpapier, Gel, Membran, 2x Filterpapier, Schwamm) in *NuPAGE*<sup>®</sup> Transferpuffer luftblasenfrei aufgebaut. Anschließend wurde der Stapel in einer Blothaltung zwischen Anode und Kathode (das Gel auf der anodischen Seite) der, mit Transferpuffer (*NuPAGE*<sup>®</sup>) gefüllten *MINI-TRANSBLOT*-Apparatur eingesetzt. Der elektrophoretische Transfer erfolgte bei 4°C ü.N. bei 40 mA. Als Molekulargewichtsmarker wurde *Magic Marc* oder *NovexSHARP prestained* (Invitrogen) verwendet.

### **3.2.10.2 Immunologischer Nachweis an Nitrozellulose gebundener Proteine**

(Ausubel, 1996)

Nach Beendigung des elektrophoretischen Transfers wurde die proteintragende Nitrozellulosemembran unter Schütteln in Block-Lösung I inkubiert (30-60 min, RT). Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper in Block-Lösung II (2 h, 4°C oder RT, oder 4°C, ü.N.). Nach dreimaligem Waschen (je 5 min) mit PBS (je nach eingesetztem Antikörper gegebenenfalls mit 0,05% Tween20) wurde die Membran mit Peroxidasegekoppeltem Zweitantikörper in PBS inkubiert (60 min, RT). Nach erneutem Waschen (in der Regel 3-5 mal wie oben, allerdings beim letzten Waschschrift immer ohne Tween20) erfolgte der Nachweis der Antikörperreaktion.

### **3.2.10.3 Antikörpernachweis durch Chemilumineszenz**

Die Antikörperreaktion wurde durch die Chemilumineszenz nachgewiesen, die bei der Umsetzung des ECL-Substrates durch die Peroxidase entsteht. Die Proteinseite der Membran wurde 1 min bei RT mit dem Detektionsreagenz (1:1 Mischung aus ECL-Lösung 1 und 2) überschichtet. Die Lösung wurde entfernt und die Membran kurz getrocknet. Nach luftblasenfreiem Bedecken mit Klarsichtfolie wurde ein Röntgenfilm (Kodak *Biomax-MR* bzw. Amersham *High Performance Chemiluminescence*) je nach Signalintensität 10-120 s der Membran exponiert.

### **3.2.11 Flüssigchromatographie-gekoppelte Tandem-Massenspektroskopie (LC-MS/MS)**

Die nano-LC-MS/MS-Analyse wurde von Dr. Alexandre Zougman in der Abteilung Proteomics und Signaltransduktion von Prof. Dr. Matthias Mann im Max Planck Institut für Biochemie (Martinsried) durchgeführt.

Zunächst erfolgte im Gelfragment die tryptische Hydrolyse der Proteine (Zougman *et al.*, 2008) und die tryptischen Peptide wurden extrahiert. Die extrahierten Peptide wurden über Reversed-Phase-C18 STAGETips (Rappsilber *et al.*, 2003) entsalzt und konzentriert. Die

Flüssigchromatographie (nano-LC) erfolgte über eine Reversed-Phase-Chromatographie-Säule (75 µm Innendurchmesser). Die LC-Apparatur war über eine Nano-Elektrospray Ionenquelle (Proxeon) mit einem lineare-Quadrupol-Ionenfalle-orbitrap-Hybrid-Massenspektrometer (LTQ-Orbitrap, Thermo Electron) verbunden. Die kontinuierliche Elution der Peptide erfolgte in einem linearen Gradienten von 5% - 40% Acetonitril in 0,5% Essigsäure bei einer Flussrate von 200 nl/min über 100 min. Es wurden im Datenabhängigen Betrieb primäre Massenspektren im *full-scan mode* (Masse-zu(-Elementar)-Ladungsverhältnis  $m/z$  von 300 bis 1600) bei Auflösungen zwischen 50000 und 100000 erfasst. Die 5 intensivsten Ionen (bzw.  $m/z$ -Peaks) wurden jeweils automatisch ausgewählt, durch Kollisions-induzierte Dissoziation (CID) fragmentiert und die sekundären Spektren der Peptidfragmente wurden in der Orbitrap-Ionenfalle erfasst. Ionen die für die MS/MS Analyse aus dem primären Massenspektrum ausgewählt wurden, wurden anschließend 30 s von einer erneuten Selektion ausgeschlossen (Zhang *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2007). Ein Zyklus vom Erfassen des primären *full-scan*-Massenspektrums des kontinuierlich injizierten LC-Eluats, über die Selektion und Fragmentierung der fünf intensivsten  $m/z$ -Peaks bis zum Erfassen der entsprechenden Fragmentmassenspektren dauerte etwa 5 s (Olsen *et al.*, 2005).

### 3.3 Zellbiologische Methoden

Die Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Dazu wurde unter einer Sterilbank gearbeitet. Autoklavierbare Lösungen wurden autoklaviert, nicht-autoklavierbare Lösungen wurden steril-filtriert (0.2 µm Porengröße des Filters). Einweg-Gefäße wurden steril vom Hersteller bezogen. Glasgefäße wurden durch Backen (200°C) sterilisiert. Andere Gefäße wurden wenn möglich autoklaviert, sonst mit 70% Ethanol sterilisiert.

#### 3.3.1 Kultivierung von Zellen

Die Zellen wurden in Nährmedium (6-8 ml in T25-Flaschen, bzw. 15 ml in T75-Flaschen) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit im Inkubator kultiviert. Die Zelldichte wurde subkonfluent gehalten und die Zellen wurden zwei mal pro Woche, nicht länger als bis zur 35. Passage passagiert.

##### 3.3.1.1 Auftauen von Zellen

1ml Aliquots eingefrorener Zellen mit  $1 \times -3 \times 10^6$  Zellen / ml wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und dann zügig mit 9 ml Nährmedium versetzt. Nach 2 min Zentrifugation (1200 U/min, 100-250x g, RT) wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 1 ml vorgewärmtem Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zu 12 ml Medium in eine

## Methoden

T75-Zellkulturflasche gegeben. Nach 24 h Inkubation bei 37°C wurde das Medium gewechselt und durch frisches Medium (gegebenenfalls mit Selektionsantibiotikum) ersetzt.

### 3.3.1.2 Propagieren von Zellen

Die Zellen wurden bei Erreichen von 90% Konfluenz umgesetzt und so ausgesät, dass nach 3 - 4 Tagen erneut umgesetzt werden musste. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen wurden in 1 ml (für T25-Flaschen) bzw. 2 ml (für T75-Flaschen) vorgewärmter Trypsin-EDTA-Lösung bei 37°C inkubiert. Nach 2-5 min wurden die Zellen durch leichtes Schütteln vom Boden des Zellkulturgefäßes gelöst und die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 2 Volumen Nährmedium gestoppt. Nach Vereinzeln der Zellen durch Auf- und Abpipettieren wurde die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Zellen wurden gemäß Tabelle 3.2 ausgesät:

Zellen	T25 (~25 cm <sup>2</sup> )		T75 (~75 cm <sup>2</sup> )	
	3 Tage	4 Tage	3 Tage	4 Tage
COS-7	1,6x 10 <sup>5</sup>	1,2x 10 <sup>5</sup>	4x 10 <sup>5</sup>	3x 10 <sup>5</sup>
HEK-Flp <sup>TM</sup>	5x 10 <sup>5</sup>	2x 10 <sup>5</sup>	5x 10 <sup>6</sup>	2x 10 <sup>6</sup>
HEK-Flp <sup>TM</sup> -NCS-1-EGFP	1x 10 <sup>6</sup>	5x 10 <sup>5</sup>	6x10 <sup>6</sup>	3x 10 <sup>6</sup>
HEK-Flp <sup>TM</sup> -NCS-1-(G2A)-EGFP	0,8x10 <sup>6</sup>	3x 10 <sup>5</sup>	5x 10 <sup>6</sup>	2x 10 <sup>6</sup>

**Tab. 3.2, Zellkulturschema mit ausgesäten Zellzahlen**

Es wurde in T25-Flaschen auf insgesamt 6 ml, in T75-Flaschen auf insgesamt 15 ml Medium aufgefüllt, gegebenenfalls mit entsprechendem Selektionsantibiotikum (3.3.2.2)

### 3.3.1.3 Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden nach Trypsin-Behandlung aus dem Zellkulturgefäß entnommen (3.3.1.2). Die Zellzahl wurde bestimmt und die Zellen durch 2-minütige Zentrifugation (1200 U/min, 100-250x g) pelletiert und in eiskaltem FCS/DMSO (90% FCS, 10% DMSO (v/v)) zu 0,5 - 1,5x 10<sup>6</sup> Zellen/ml resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Kryogefäßen zu 1 ml aliquotiert, 5 Tage – 2 Wochen bei -80°C eingefroren und anschließend, zur längeren Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff überführt.

## 3.3.2 Generierung stabiler Zelllinien mit dem *Flp-In*<sup>TM</sup>-System

(Invitrogen)

Das Flp-In-System nutzt die FLP-Rekombinase aus *S. cerevisiae* und FLP-vermittelte sequenzspezifische Rekombination (Broach und Hicks, 1980; Craig, 1988; Sauer, 1994) um die entsprechende cDNA an einer definierten Stelle in das Genom der Zielzelle zu integrieren. Die Zielzelllinie HEK-Flp<sup>TM</sup>, ist gentechnisch so verändert, dass sie im Genom



eine singuläre FRT-Stelle (*FLP Recombination Target site*; Zhu und Sadowski, 1995) in einem Zeocin-Resistenzgen enthält. Der Plasmid-Vektor pcDNA5/FRT des Flp-In-Systems enthält ebenfalls eine FRT-Stelle, verbunden mit einem Hygromycin-Resistenzgen. Außerdem enthält das Plasmid eine multiple Klonierungsstelle, um eine stabil zu exprimierende cDNA unter Kontrolle des CMV *immediate early* Promotors zu klonieren. Bei Co-Transfektion mit dem, FLP-Rekombinase-Expressions-Vektor pOG44 kommt es zur FLP-Expression, und daraufhin zur FLP-Rekombinase-vermittelten Rekombination der FRT-Stelle des pcDNA5/FRT-Konstrukts mit der genomischen FRT-Stelle (O'Gorman *et al.*, 1991). Dadurch wird das pcDNA5/FRT-Konstrukt in das Genom integriert und es kommt zu einem Wechsel von Zeocin-Resistenz zu Hygromycin-Resistenz, so dass Zellen in denen die Rekombination stattgefunden hat mit Hygromycin selektiert werden können.

### **3.3.2.1 Transfektion der HEK-Flp<sup>TM</sup>-Zellen mit kationischen Lipidreagenzien** (Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000, Invitrogen)

In 35 mm Ø Kulturschalen wurden  $1 \times 10^5$  Zellen ausgesät und ü.N., ohne Selektionsantibiotikum inkubiert. Die Transfektionsansätze I und II wurden getrennt, in sterile 1,5 ml Gefäße pipettiert. Transfektionsansatz I enthielt jeweils 1,5 µg pcDNA5/FRT-Plasmid-DNA (NCS-1-cDNA oder NCS-1(G2A) cDNA in pcDNA5/FRT) und 2,5 µg pOG44 Plasmid-DNA in 500 µl serumreduziertem Medium (Opti-MEM<sup>®</sup> I). Parallel wurden Kontrollansätze mit nur einem der sonst co-transfizierten Plasmide angesetzt. Transfektionsansatz II enthielt 10 µl *Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000* in 500 µl Opti-MEM<sup>®</sup> I. Die Transfektionsansätze I und II wurden in einem Gefäß vereint und 30 – 45 min bei RT inkubiert. Das Medium aus den Zellkulturschalen wurde entfernt und die Zellen mit 2 ml Opti-MEM<sup>®</sup> I gewaschen. Es wurde dann der vereinigte Transfektionsansatz, mit Opti-MEM<sup>®</sup> I auf 2 ml aufgefüllt, auf die Zellen gegeben und 5 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Transfektionsansätze auf den Zellen gegen 2 ml Medium (ohne Antibiotikum) gewechselt und ü.N. inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen trypsiniert (3.3.1.2) und in T25-Flaschen überführt ( $5 \times 10^5$  Zellen) und es wurde mit der Selektion Hygromycin-resistenter Zellen begonnen (3.3.2.2).

### **3.3.2.2 Selektion stabil transfizierter HEK-Flp<sup>TM</sup> Zelllinien**

Die Selektion stabil transfizierter Zelllinien erfolgte mit Hygromycin (150 µg/ml Medium, *Invitrogen*). Die nicht-transfizierten Flp<sup>TM</sup> Zelllinien wurden mit Zeocin (100 µg/ml Medium, *Invitrogen*) als Selektionsantibiotikum kultiviert.

## **3.3.3 Immunfluoreszenz, Zellfärbungen und Fluoreszenzmikroskopie**

### **3.3.3.1 Poly-L-Lysin-Beschichtung von Deckgläsern**

Deckgläschen (25 mm x 25 mm) wurden in eine Petrischale (35 mm Ø) gelegt und mit 1 ml Poly-L-Lysin-Lösung (25 µg/ml in H<sub>2</sub>O) überschichtet und 20 min bei RT inkubiert. Die

## Methoden

---

Lösung wurde abgesaugt, die Deckgläschen wurden unter der Sterilbank getrocknet. Beschichtete Deckgläschen wurden bis zur Benutzung in der jeweiligen Petrischale, in Alufolie eingewickelt, bei RT aufbewahrt.

### 3.3.3.2 Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenz wurden  $0,25 \times 10^5$  COS-7 Zellen, oder bis zu  $1 \times 10^5$  HEK-Zellen auf Poly-L-Lysin-beschichtete Deckgläschen (25 mm x 25 mm) ausgesät und 2 Tage kultiviert. Die Zellen wurden 1x kurz mit PBS gewaschen und 10 min mit 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert. Alle Inkubationen erfolgten bei RT. Nach 2 Waschschritten (je 2-3 min) mit PBS wurden die Zellen mit 0,1% Saponin in PBS, 10 min bei RT permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen 30 min mit Blocklösung blockiert. Es folgte eine einstündige Inkubation mit primären Antikörpern in Trägerlösung. Nach 3 Waschschritten mit PBS (je 2-3 min) folgten 45-60 min Inkubation im Dunkeln, mit fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern in Trägerlösung. Die Zellen wurden dann 3x mit PBS (je 2-3 min) gewaschen, einmal kurz in H<sub>2</sub>O getaucht und mit einem Tropfen Eindeckmedium auf Objektträgern fixiert. Die Volumina der Antikörperlösungen betragen 250 µl pro Deckgläschen. Von den übrigen Lösungen wurden jeweils 500 µl pro Deckgläschen eingesetzt.

### 3.3.3.4 Zellfärbungen mit Fluoreszenzfarbstoffen

#### Zellkernfärbung mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)

Für die parallele Kernfärbung der Zellen wurde entweder DAPI-enthaltendes Eindeckmedium verwendet, oder es wurden die Zellen, nach der Inkubation mit fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern (3.3.3.2) im ersten der drei PBS-Waschschriffe in PBS mit 300 nM DAPI für 3 min inkubiert.

#### Zellfärbungen mit Alexa-532-Phalloidin und ToPro-3-iodid

(Molecular Probes, Invitrogen)

Auf Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläsern (25 mm x 25 mm) kultivierte Zellen wurden 5 min mit Microtubuli stabilisierendem Puffer (MTSB) bei 37°C inkubiert. Nach Entfernen des MTSB wurden die Zellen 20 min bei 37°C mit 250 µl 4 % Paraformaldehyd in PBS fixiert. Es folgten 2 Waschschriffe mit PBS (je 2 min). Die Zellen wurden 3-5 min mit vorgekühltem Aceton bei -20°C permeabilisiert und anschließend 2 x mit PBS (je 1 min) gewaschen. Die Farbstoffe wurden in PBS mit 1% BSA gemischt und auf die Zellen pipettiert (200 µl pro Deckgläschen), diese wurden 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Es wurde 2x mit PBS gewaschen (je 1-2 min), die Deckgläschen wurden mit Vectashield® Medium (Vector Laboratories) eingedeckelt und die Ränder wurden mit Nagellack versiegelt. Die To-Pro-3

Iodid-Konzentration betrug 125 nM, die Alexa-532-Phalloidin-Konzentration betrug etwa 120 nM (4 U / ml).

### 3.3.3.5 Konfocale Laser-Scanning-Mikroskopie und Auswertung

Die konfocalen Aufnahmen wurden entweder am Leica TCS SP2 Mikroskop mit der Leica Confocal Software LCS, oder am Olympus Fluoview FV1000 mit der FV10 ASW Software aufgenommen und ausgewertet. Darüber hinaus wurde die ImageJ Software (Abramoff *et al.*, 2004) zur Auswertung der erstellten Bilder verwendet.

## 3.4 Physiologie

### 3.4.1 Maushaltung

Die Mäuse wurden unter spezifisch pathogenfreien (SPF) Bedingungen gehalten. Gleichgeschlechtliche Gruppen gleichen und unterschiedlichen Genotyps wurden unter konventionellen Bedingungen gehalten. Die Temperatur im Tierstall betrug 19-21 °C, die Luftfeuchtigkeit 50-55%. Es wurde ein Tag-Nacht-Rhythmus von 12 h Licht und 12 h Dunkelheit eingehalten.

### 3.4.2 Entnahme von Schwanzbiopsien und Präparation von Mäusegehirn

Jungtiere (2-5 Tage) wurden ohne Betäubung, allein lebensfähige Mäuse wurden nach Ätherbetäubung dekapitiert. Die Schädeldecke wurde mit einem medianen Sagittalschnitt eröffnet, der auf Höhe des Occipitalpols in temporaler Richtung fortgeführt wurde. Das freigelegte Gehirn wurde von der Schädelkalotte getrennt und das präparierte Mäusegehirn wurde in ein Reaktionsgefäß überführt, schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die zur Genotypisierung benötigten Schwanzbiopsien wurden von narkotisierten, ca. 3 Wochen alten Mäusen mit einem Skalpell in einer Länge von 0,2 cm entnommen. Die Wunde der Tiere wurde mit Gewebekleber (Histoacryl, B. Braun Surgical GmbH) versorgt. Die Schwanzbiopsien wurden bei -20°C gelagert. Die Entnahme der Biopsien erfolgte durch das Personal der Versuchstierhaltung.

## 3.5 Histologie

### 3.5.1 Perfusion von Mäusen

Die Perfusion von Organen wurde mit einem fixierenden Agens über den Blutkreislauf des Tieres durchgeführt, um die Blutzellen auszuwaschen und die Erhaltung von Zellstrukturen zu verbessern. Zunächst wurden die zu untersuchenden Mäuse durch eine intraperitoneale

Injektion eines Narkotikums (Ketanmin-Xylazin) betäubt. Nach 5 min Einwirkzeit wurden die Reflexe (u.a. Lidreflex, Schwanzreflex) getestet. Über dem Epigastricum wurde die Haut entfernt, mit einer Pinzette das Sternum fixiert und mit einer Schere entlang des Rippenbogens geschnitten. Der Brustkorb wurde entfernt und das Herz freigelegt. Eine Kanüle wurde über die linke Herzkammer in den Aortenbogen geschoben und mit einer Klemme fixiert. Mit Hilfe einer Pumpe wurde der Blutkreislauf der Maus mit 25 ml PBS-Lösung gespült. Um ein Aufstauen der Lösung zu verhindern wurde die rechte Herzkammer mit einer Nadel inzidiert. Anschließend wurde die Maus mit 25 ml 4% Paraformaldehydlösung (PFA, in PBS) perfundiert. Das so fixierte Gehirn wurde entnommen und über Nacht bei 4°C im gleichen Fixans nachfixiert und danach bis zur weiteren Verwendung in PBS aufbewahrt. Für die Elektronenmikroskopie erfolgten die Perfusion und die Nachfixierung mit 2 - 4% PFA und 0,1% Glutardialdehyd (in PBS).

### 3.5.2 Präparation von Vibratomschnitten

Die Herstellung der Gehirnschnitte erfolgte am Vibratom (VT 1000 S, Leica). In einer *mouse brain matrix* wurde von fixierten Hirnen der gewünschte Schneidebereich sagittal oder coronal verkleinert. Die erhaltene gerade Schnittfläche wurde mit Sekundenkleber auf dem Vibratomteller fixiert und 40 - 50 µm dicke Schnitte wurden geschnitten. Dabei war das fixierte Gehirn von PBS-Lösung umgeben. Die Schnitte wurden dreimal in PBS-Puffer gewaschen und blieben bis zur weiteren Bearbeitung in PBS. Für die immunhistochemische DAB-Färbung und die Nissl-Färbung wurden die Schnitte auf Objektträger gezogen und ü.N. bei 37°C getrocknet.

### 3.5.3 Nissl-Färbung mit Kresylviolett

Die Nissl-Färbung ist eine Methode zur Anfärbung der Kerne und der sog. Tigroidschollen (Nissl-Substanz) im Zytoplasma der Nervenzellen, die aus Stapeln des rauen endoplasmatischen Retikulums bestehen. Die Färbung erfolgte bei Raumtemperatur. Vibratomschnitte wurden 5 min in Kresylviolettlösung (1,5%) gefärbt, dann, unter optischer Kontrolle, kurz in 96% Ethanol mit 1% Essigsäure inkubiert. Danach wurden die Schnitte 2-3 min in 96% Ethanol und anschließend 2x je 5-10 min in 100% Ethanol gespült. Unter dem Abzug wurden die Schnitte 2x mindestens 5 min in Xylolersatz (Roti®-Histol) inkubiert. Die Eindeckelung erfolgte mit Entellan-Einschlussmedium für die Histologie (Merck), wobei eine Austrocknung der Schnitte vermieden wurde.

### **3.5.4 Immunhistochemie mit biotinylierten Antikörpern und DAB-Färbung**

Die Färbungen mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) erfolgten bei Raumtemperatur. Die in PBS gelagerten Vibratomschnitte wurden 10 min in 1% Natriumborhydrid in PBS inkubiert, anschließend mindestens 4x 5 min mit PBS gewaschen, bis keine Bläschenbildung mehr erfolgte. Zur Inaktivierung endogener Peroxidasen wurden die Schnitte 30 min in 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (in PBS) inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte wiederum 4x 5min in PBS gewaschen. Die Schnitte wurden in Block-Lösung für 30 - 60 min auf dem Schüttler inkubiert und dann erneut 3x 5 min in PBS gewaschen. Im Anschluss folgte über Nacht die Inkubation mit Erstantikörper in entsprechender Verdünnung in Träger-Lösung. Die Schnitte wurden in PBS, 3x 5 min gewaschen und dann mit Biotin-gekoppeltem Zweitantikörper (1:1000 in PBS) für 3 h inkubiert. Erneut wurde 4x 5 min in PBS gewaschen. Die Lösungen A und B des ABC-Peroxidase-Kits (Vector) wurden 1:1000 in PBS mit 0,5 % Triton gemischt und 2 h bei RT auf den Schnitten inkubiert. Anschließend wurde wieder gewaschen (3x 5 min PBS). Um den pH-Wert für die DAB-Färbung zu optimieren, wurden die Schnitte 3x 5 min mit Tris-Puffer (pH 7,6) gewaschen. Die DAB-Färbe-Lösung (Sigma D4293) wurde vorbereitet und unter auf den Schnitten inkubiert, bis der Hintergrund eine bräunliche Färbung annahm (ca. 2-3 min). Die Farbreaktion wurde durch gründliches Waschen mit PBS-Lösung gestoppt (mindestens 6x). Die angefärbten Schnitte wurden auf Objektträger gezogen und für einige Stunden bei 37°C getrocknet. Die Dehydrierung der Schnitte erfolgte in einer Ethanol-Xylolersatz (Roti<sup>®</sup>-Histol) -Reihe (50%, 70%, 90%, 95%, 100% EtOH, Xylolersatz, Xylolersatz). Die Schnitte wurden in den jeweiligen Dehydrierungsstufen für 3 min inkubiert und anschließend mit Entellan (Merck) versiegelt.

### **3.5.5 Immunhistologie mit fluoreszierenden Antikörpern (Immunhistofluoreszenz)**

Die in PBS gelagerten Vibratomschnitte des Hippocampus wurden 10 min in 0,5% Natriumborhydrid in PBS inkubiert und anschließend mehrmals mit PBS gewaschen. Die Schnitte wurden in Block-Lösung für 30-40 min bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurden die Schnitte in PBS 3x 5 min gewaschen. Der Erstantikörper wurde in der jeweiligen Verdünnung in Träger-Lösung über Nacht bei 4°C (wenn der Erstantikörper direkt mit einem Fluorophor markiert war in der Dunkelheit) inkubiert. Die Schnitte wurden 3x 5 min in PBS gewaschen. Die Inkubation des in PBS gelösten Zweitantikörpers erfolgte für 1,5 - 2 h bei RT im Dunkeln in der jeweiligen Verdünnung. Es wurde erneut 3x 5 min in PBS gewaschen. Die Schnitte wurden in PBS auf den Objektträger gezogen und sofort mit Einbettlösung für die Fluoreszenzmikroskopie (Vector) versiegelt.

### 3.5.6 Fluoreszenzmikroskopie und Durchlichtmikroskopie

Confokale Aufnahmen wurden am Laser-Scanning-Mikroskop angefertigt (3.3.3.5). Übersichtsaufnahmen wurden am Axioskop II (Zeiss) mit der Axiovision Software (Zeiss) aufgenommen.

### 3.5.7 Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie am Zeiss 902 TEM (Transmissions-Elektronenmikroskop) und die Anfertigung der Präparate wurden von Frau Dr. Michaela Schweizer in der Serviceeinheit Morphologie des ZMNH durchgeführt.

#### 3.5.7.1 Cryoprotektion von Vibratomschnitten

150 - 200 µm dicke Vibratomschnitte (3.5.2) wurden in 20% Sucrose-Lösung bis zum Absinken inkubiert. Nach der Cryoprotektion wurden die Schnitte, zur Erhöhung der Permeabilität des Gewebes, zwei mal in flüssigem Stickstoff Schockgefroren und wieder aufgetaut.

#### 3.5.7.2 *Pre-embedding* Nanogold Markierung mit Silberverstärkung

(Tanner *et al.*, 1996; Du *et al.*, 1998)

Nach der Cryoprotektion (3.5.7.1) wurden 150 - 200 µm dicke Vibratomschnitte (3.5.2) blockiert (30 min bei RT in Block-Lösung), 3x je 5 min in PBS gewaschen und dann ü.N. bei 4°C mit Maus-Anti-GFP-Antikörper in Trägerlösung inkubiert. Nach 3 Waschschritten in PBS (je 5 min) wurden die Schnitte mit 1,4 nm (Ø) Nanogold-markierten Ziege-Anti-Maus-IgG F<sub>ab</sub>-Antikörper-Fragmenten (Nanoprobes Inc.) inkubiert (2 h bei RT, Verdünnung 1:100). Nach 3 weiteren Waschschrritten wurde 10 min in 1% Glutaraldehyd in PBS fixiert, erneut 3x gewaschen und anschließend in Wasser gewaschen. Anschließend wurde bei 4°C erst 5 min in Natriumacetatpuffer (150 mM, pH 5,6) gewaschen und dann 7 min in Goldchlorid (0,05% in Natriumacetatpuffer) inkubiert. Nach je 3 Waschschrritten, erst in Natriumacetatpuffer, dann in PBS wurden die Schnitte 30 min auf Eis in Osmiumtetroxid-Lösung (1% in PBS) nachfixiert und dann mehrfach in PBS gewaschen. Nach Färbung mit Uranylacetat (0,5% in Natriumacetatpuffer, 30 min) wurden die Schnitte dehydriert, eingebettet und es wurden Ultradünnschnitte angefertigt (3.5.7.4).

#### 3.5.7.3 *Pre-embedding* DAB-Färbung für die Elektronenmikroskopie

(Lappe-Siefke *et al.*, 2009)

An 150-200 µm dicke Vibratomschnitte (3.5.2) wurden nach Cryoprotektion (3.5.7.1) eine DAB-Färbung (3.5.4) durchgeführt. Nach dem Stoppen der Farbreaktion wurden die Schnitte 30 min auf Eis mit Osmiumtetroxyd-Lösung (1% in PBS) nachfixiert und anschließend mehrfach in PBS gewaschen.

### 3.5.7.4 Anfertigen von Ultradünnschnitten

Nach Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 90%, 95%, 100%, 100% Ethanol) wurden die Schnitte in Epoxid-Harz (Epon, Serva) eingebettet. Ultradünnschnitte (60 nm) wurden an einer entsprechenden Schneidemaschine (Ultracut S, Reichert) angefertigt.

## 3.6 Elektrophysiologische Experimente

Die elektrophysiologischen Messungen wurden von Eka Lepsveridze aus der Arbeitsgruppe von Dr. Alexander Dityatev im Institut für die Synthese neuraler Strukturen im ZMNH durchgeführt.

### 3.6.1 Präparation von Maushirnschnitten

(Bukalov und Dityatev, 2006)

Es wurden Mäuse im Alter von 7-10 Wochen eingesetzt. Die Mäuse wurden mit CO<sub>2</sub> betäubt und decapitiert. Das Gehirn wurde zügig herauspräpariert und schnell in eiskalten, mit Carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) begasten, Dissektionspuffer überführt. Am Vibratom wurden, in eisgekühltem, begasten Dissektionspuffer 300 µm dicke Gehirnschnitte geschnitten. Diese wurden in artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit (ACSF, ebenfalls begast) überführt und 2h bei RT inkubiert. Nach der Präparation der Maus wurde eine Gewebebiopsie für eine Re-Genotypisierung entnommen. Die Messungen wurden bis zum Abschluß der gesamten Versuchsreihe und der Analyse der Daten ohne Kenntnis der Maus-Genotypen durchgeführt.

### 3.6.1 Extrazelluläre Ableitung exzitatorischer postsynaptischer Feldpotentiale und Bestimmung der Doppelpuls-Fazilitierung

Die extrazelluläre Ableitung exzitatorischer postsynaptischer Feldpotentiale (fEPSP) erfolgte mit ACSF-gefüllten Glaspipetten (Pipettenwiderstand 2-3 MΩ) in einer Eintauchkammer (*submerged chamber*), in der die Hirnschnitte kontinuierlich mit begaster ACSF-Lösung umspült wurden. Stimuli wurden mit einer monopolarer Stimuluselektrode (Pipettenwiderstand <1 MΩ) appliziert. Die basale synaptische Übertragung wurde bei einer Stimulusfrequenz von 0.033 Hz (2 Stimuli / min) gemessen. Die Antworten wurden verstärkt, mit einem EPC9 Patch-Clamp Verstärker (HEKA Elektronik) gemessen und mit 1kHz gefiltert. Die Aufnahme und die Analyse der Daten erfolgte mit der Pulse Software (HEKA Elektronik). Die Stimulusstärke wurde auf 50% der Schwelle für das Auslösen postsynaptischer Aktionspotentiale eingestellt. Die Doppelpuls-Fazilitierung (PPF – *paired pulse facilitation*) wurde gemessen mit Doppel-Stimulationspulsen mit inter-Stimulus-Intervallen (ISI) von 10, 20, 50, 100 und 200 ms. Die PPF wurde definiert als das Verhältnis der Anfangssteigungen

## Methoden

---

der beiden fEPSP, die als Antwort auf den zweiten und ersten Stimulus gemessen wurden (Steigung 2 / Steigung 1). Die Anfangssteigung wurde anstelle der Amplitude der fEPSP herangezogen, weil sie weniger anfällig für eine Verfälschung durch Aktionspotentiale postsynaptischer Zellen ist. Da es bei Doppelpulsmessungen mit ISI < 50 ms zur Überlappung des ersten und zweiten fEPSP kommt, wurden, durch Einzelpuls-Stimulierung hervorgerufene fEPSPs von den beiden während des Doppelpulses mit ISI < 50 ms ineinander übergehenden fEPSPs abgezogen. Für n=1 Messung wurden jeweils 15 fEPSP aufgenommen und gemittelt.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Einfluss der N-Myristylierbarkeit auf die intrazelluläre NCS-1-Lokalisation

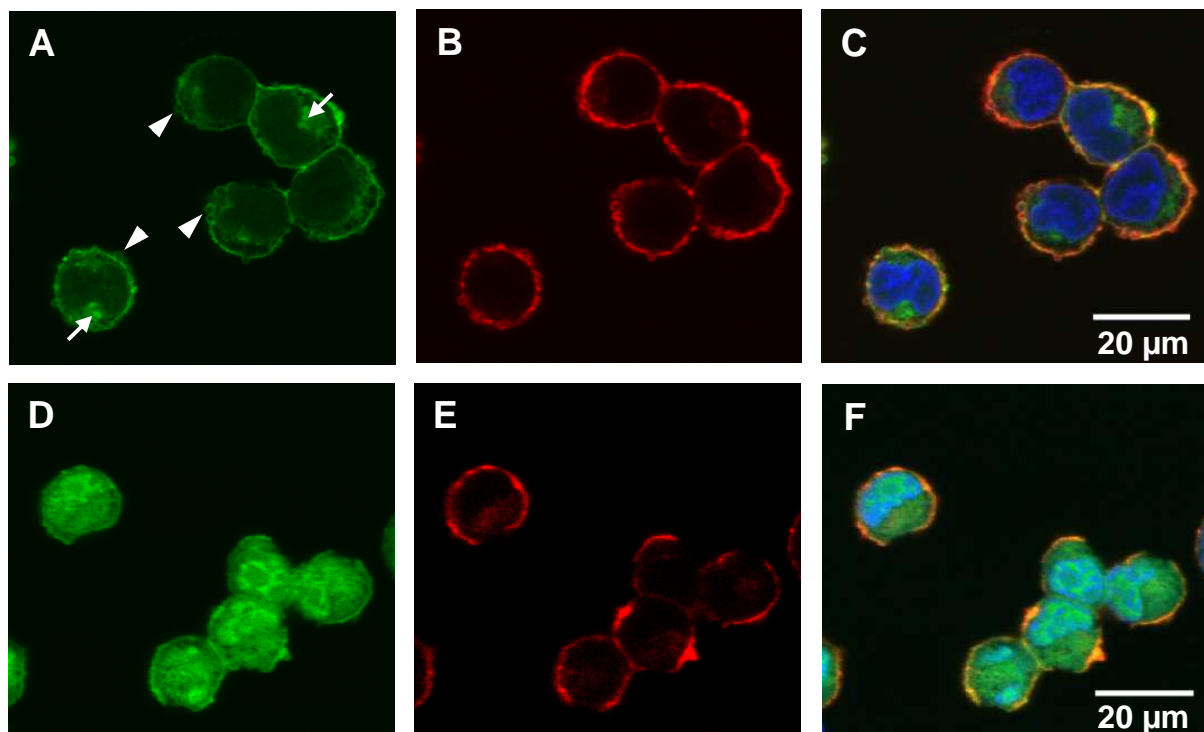
Nicht-integrale membranassoziierte Proteine können kovalente Lipidmodifikationen enthalten, die als Membrananker für diese Proteine wirken (Nadolski und Linder, 2007). Bei intrazellulären Proteinen sind das vor allem Prenylierungen, Myristylierungen und Palmitylierungen. Für Frq1, das NCS-1-Ortholog der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, wurde der Einfluss von N-Myristylierung und  $\text{Ca}^{2+}$  auf die Membranlokalisierung beschrieben (Ames *et al.*, 2000). Myristyliertes Frq1 (Myr-Frq1) wurde in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen fast vollständig an pelletierbare Membranen gebunden. In nominell  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Lösung war die Membranassoziation stark abgeschwächt. Es blieb aber ein deutlicher Teil des zellulären Myr-Frq1 auch bei Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen membranassoziiert. Nicht-myristylierbare Frq1(G2A)-Mutanten wurden nur in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltiger Lösung an Membranen gebunden. Der Einfluss der Myristylierbarkeit von NCS-1 auf die intrazelluläre Lokalisation wurde bereits in transient transfizierten HeLA-Zellen fluoreszenzmikroskopisch (O'Callaghan *et al.*, 2002) und in stabil transfizierten 3T3 Zelllinien fluoreszenzmikroskopisch und biochemisch untersucht (Grafelmann, 2004).

#### Expression von NCS-1-EGFP und nicht-myristylierbarem NCS-1(G2A)-EGFP in stabilen Zelllinien

Um den Einfluss der Myristylierung weiter zu untersuchen, wurden mit dem Flp-In<sup>TM</sup> System (Invitrogen) stabil transfizierte HEK-Flp<sup>TM</sup> Zelllinien erzeugt, die NCS-1-EGFP-Fusionsprotein oder nicht-myristylierbares NCS-1(G2A)-EGFP-Fusionsprotein exprimierten. In dem Flp-In<sup>TM</sup>-System erfolgte die Integration des Expressions-Konstrukts in das Genom der Wirtszelle durch Flp-Rekombinase vermittelte Rekombination an einem einzigen Integrationslokalus im Genom. Es entstanden auf diese Weise co-isogene Zelllinien.

### 4.1.1 Fluoreszenzmikroskopische Analyse der intrazellulären Lokalisation

Die Lokalisation der EGFP-Fluoreszenz wurde am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop untersucht. Dazu wurden Co-Färbungen mit Alexa-Fluor<sup>®</sup>-532-markiertem Phalloidin und mit TO-PRO<sup>®</sup>-3 Iodid angefertigt. Phalloidin markiert filamentöses F-Aktin und färbt das Aktinnetzwerk des Zellcortex an der cytoplasmatischen Seite der Zellmembran. TO-PRO<sup>®</sup>-3 Iodid bindet an doppelsträngige DNA und erzeugt somit eine Zellkernfärbung (Abb. 4.1).



**Abb. 4.1, NCS-1-EGFP-Lokalisation in stabil transfizierten HEK Zelllinien**

Konfokale fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen stabil transfizierter HEK-Flp<sup>TM</sup> Zelllinien.

**A-C:** NCS-1-EGFP exprimierende Zellen, Pfeile zeigen perinucleäre NCS-1-EGFP-Lokalisation, Pfeilspitzen markieren *Blebs* (Bläschen).

**D-F:** Zellen, die nicht-myristylierbares NCS-1(G2A)-EGFP exprimierten.

**A, D:** EGFP-Fluoreszenz von NCS-1-EGFP (A) bzw. NCS-1(G2A)-EGFP (D).

**B, E:** Alexa-Fluor<sup>®</sup>-532-Phalloidin-Färbung des membrannahen Aktinnetzwerks des Zellcortex.

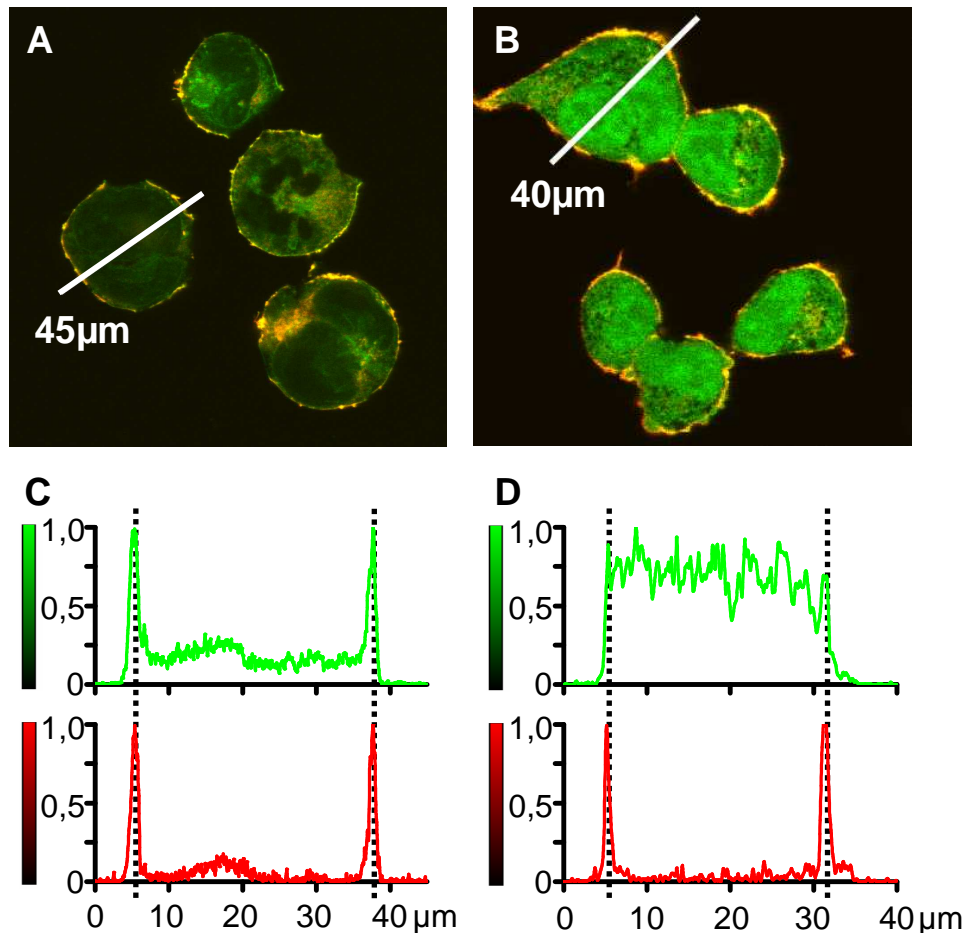
**C, F:** Komposit-Bilder der Einzelfärbungen A) und B) bzw. D) und E), sowie der, nicht einzeln gezeigten, blau dargestellten, TO-PRO-Kernfärbungen. Überlagerungen von roter Alexa<sup>®</sup>-Fluor-532- und grüner EGFP-Fluoreszenz wurden mit zunehmender Intensität orange bis gelblich dargestellt. Der Maßstab ist jeweils unter dem Maßstabsbalken angegeben.

Die NCS-1-EGFP-Fluoreszenz war vor allem an bzw. unterhalb der Plasmamembran lokalisiert, wo sie mit der Alexa-Fluor<sup>®</sup>-532-Fluoreszenz des markierten Phalloidins co-lokalisiert war. Im Kern war keine NCS-1-EGFP-Fluoreszenz detektierbar. Die NCS-1-EGFP-Fluoreszenz im Cytoplasma war ungleichmäßig verteilt und auf den perinucleären Bereich beschränkt. Die Fluoreszenz des nicht-myristylierbaren NCS-1(G2A)-EGFP-Fusionsproteins hingegen war diffus über die gesamte Zelle und dabei auch über den Zellkern verteilt. Sie zeigte nicht die für NCS-1-EGFP charakteristische, verstärkte Fluoreszenz in Membrannähe und keine ausgeprägte Co-Lokalisation mit der Fluoreszenz des Alexa-Fluor<sup>®</sup>-532-markierten Phalloidins. In Einklang mit den Daten in der Literatur (O'Callaghan *et al.*, 2002; Grafelmann, 2004) zeigten diese Ergebnisse, dass die Myristylierbarkeit für eine membran nahe Lokalisation bzw. Membranassoziation von NCS-1-EGFP wichtig ist.

Auffällig war, dass in NCS-1-EGFP exprimierenden Zellen ein verstärktes *Blebbing* (Bläschenbildung) auftrat (Pfeilspitzen in Abb. 4.1). *Blebs* sind kugelförmige Ausstülpungen der Plasmamembran, die durch Actomyosin-Kontraktion des corticalen Cytoskeletts entstehen. Sie sind einerseits als Anzeichen für Apoptose bekannt (Mills *et al.*, 1998). Andererseits wurde auch nicht-apoptotisches *Blebbing* im Zusammenhang mit anderen zellbiologischen Prozessen beobachtet. Nicht-apoptotisches *Blebbing* wurde unter anderem beobachtet bei Zellteilung und adhäsiver Zellausbreitung (Charras und Paluch, 2008), bei der Umstrukturierung des Spectrin-Cytoskeletts (Street *et al.*, 2006), sowie im Zusammenhang mit der Zellmotilität (Blaser *et al.*, 2006; Tournaviti *et al.*, 2007). Apoptotisches *Blebbing* geht einher mit dem Auftreten kondensierter Zellen, die in größere Bläschen oder apoptotische Körperchen (*apoptotic bodies*), fragmentieren (Charras, 2008). Die normale Wachstumsrate NCS-1-EGFP exprimierender Zellen, das Vorhandensein von Aktin in den *Blebs* und die Abwesenheit kondensierter, fragmentierter Zellen deuten darauf hin, dass es sich hier um Zelltod-unabhängiges *Blebbing* handelte.

### Relative Quantifizierung der Fluoreszenzverteilung

Die zelluläre Intensitätsverteilung der NCS-1-EGFP-Fluoreszenz wurde anschließend mit der Profil-Analysefunktion der Leica<sup>™</sup> Confocal Software, entlang repräsentativer optischer Schnittebenen dargestellt (Abb. 4.2).



**Abb. 4.2, Relative Quantifizierung der Fluoreszenzverteilung in stabil transfizierten HEK Zelllinien**

Kompositbilder grüner EGFP-Fluoreszenz und roter Alexa-Fuor<sup>®</sup>-532-Phalloidin-Fluoreszenz

**A:** NCS-1-EGFP exprimierende Zellen.

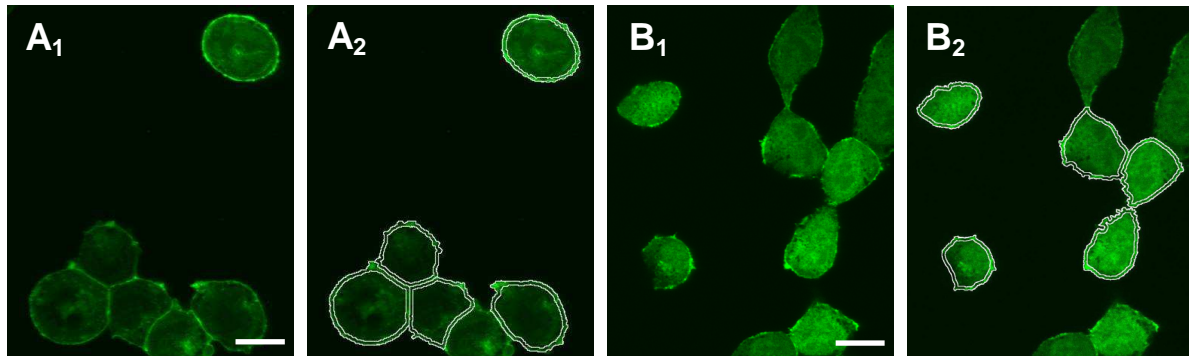
**B:** Zellen, die nicht-myristylierbares NCS-1(G2A)-EGFP exprimierten.

**C und D:** Die Fluoreszenzprofile zeigen die relative Intensitätsverteilung der NCS-1-EGFP-Fluoreszenz (C) bzw. der NCS-1(G2A)-EGFP-Fluoreszenz (D) (grüne Intensitätsskala) bzw. der Alexa-Fuor<sup>®</sup>-532-Fluoreszenz (rote Intensitätsskala) entlang der, als weiße Linie in A und B dargestellten Messstrecken. Die Länge der Messstrecke ist jeweils angegeben.

Anhand der Intensitätsmaxima der Fluoreszenz des Alexa-Fluor<sup>®</sup>-532-Phalloidins wurde ein 2 µm breiter zellmembrannaher Bereich markiert. Im gleichen Bereich waren scharfe Intensitätsmaxima der NCS-1-EGFP-Fluoreszenz zu finden. Diese waren durchschnittlich etwa dreimal höher als die eines breiten Intensitätsmaximums cytoplasmatischer Fluoreszenz. Die NCS-1(G2A)-EGFP-Fluoreszenz hingegen zeigte entlang der Messstrecke keine Intensitätsmaxima.

Die Unterschiede in der zellulären Verteilung von NCS-1-EGFP und NCS-1(G2A)-EGFP wurden noch weiter verdeutlicht, wenn man die

Fluoreszenzintensitäten über den membranhaften und über den intrazellulären Bereich der optischen Schnittebenen gesondert integrierte. Dazu wurden mit der ImageJ Software (Abramoff *et al.*, 2004) in konfokalen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen gesamte Zellen und intrazelluläre Bereiche markiert (Abb 4.3).



**Abb. 4.3, Membrannahe und intrazelluläre Bereiche in stabil transfizierten HEK Zelllinien**

**A<sub>1,2</sub>**: NCS-1-EGFP exprimierende Zellen.

**B<sub>1,2</sub>**: Zellen, die nicht-myristylierbares NCS-1(G2A)-EGFP exprimierten.

Konfokalen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>) und markierte gesamte Zellen und intrazelluläre Bereiche (A<sub>2</sub>, B<sub>2</sub>). Maßstabsbalken – 15 μm.

Die Fluoreszenz in den markierten Bereichen wurde gemessen und der membranständige Anteil der Gesamtfluoreszenz wurde bestimmt. Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität wurde ebenfalls berechnet und in Relation zur durchschnittlichen intrazellulären Fluoreszenz dargestellt (Tab. 4.1).

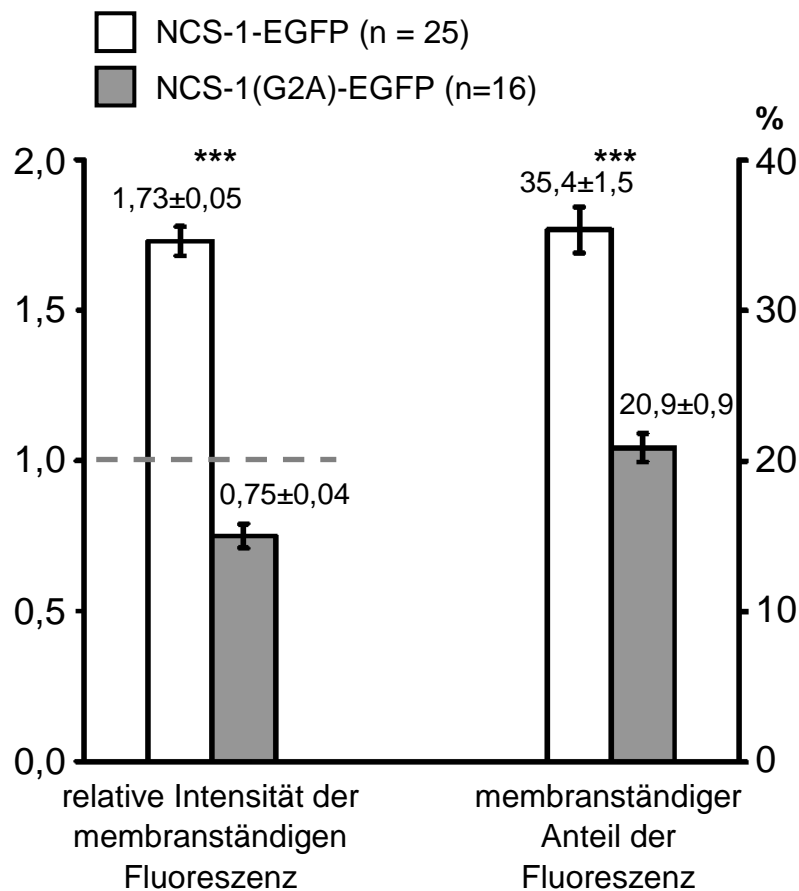
**Tabelle 4.1, Relative durchschnittliche Fluoreszenzintensität von NCS-1-EGFP und NCS-1(G2A)-EGFP, sowie zelluläre Verteilung der Fluoreszenz**

Zelllinie	(n)	<u>Relative Intensität</u> <u>der Fluoreszenz</u>	<u>Verteilung der</u> <u>Fluoreszenz</u>
		membranständig / intrazellulär	membranständiger Anteil
<b>NCS-1-EGFP</b>	(25)	1,73 ± 0,05	35,4 % ± 1,5 %
<b>NCS-1(G2A)-EGFP</b>	(16)	0,75 ± 0,04	20,9 % ± 0,9 %

Mittelwert ± Standardfehler der Intensität und der Verteilung der Fluoreszenz. Die relative Intensität der membranständigen Fluoreszenz wurde auf die intrazelluläre Fluoreszenz normiert. Der membranständige Anteil der Fluoreszenz bezeichnet den membranständigen Anteil der gesamten zellulären Fluoreszenz. n – Anzahl der gemessenen Zellen.

## Ergebnisse

Bei der Berechnung der Integrale wurde jeweils die Hintergrundfluoreszenz nicht transfizierter HEK-Flp<sup>TM</sup> Zellen abgezogen. Demnach war etwa 35% der NCS-1-EGFP-Fluoreszenz zellmembrannah lokalisiert. In Zellen, die nicht-myristylierbares NCS-1(G2A)-EGFP exprimierten, befand sich signifikant weniger EGFP-Fluoreszenz membrannah, nämlich nur etwa 21% ( $p < 0,001$ , t-Test). Der membrannahe Bereich machte etwa 25% des gesamten zellulären Bereiches aus ( $24,4\% \pm 1,2\%$  für NCS-1(G2A)-EGFP, bzw.  $26,4\% \pm 1,0\%$  für NCS-1-EGFP exprimierende Zellen). Auf die intrazelluläre Fluoreszenzintensität normiert, ergab sich dementsprechend in Zellmembrannähe eine Verringerung der NCS-1(G2A)-EGFP-Fluoreszenz im Gegensatz zu einer deutlichen Anreicherung der NCS-1-EGFP-Fluoreszenz, wobei der Unterschied zwischen beiden Linien auch hierbei signifikant war ( $p < 0,001$ , t-Test).

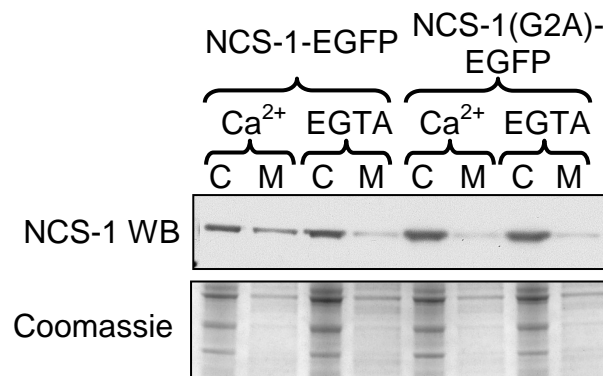


**Abb. 4.4, Intensität und Verteilung der Fluoreszenz in stabil transfizierten HEK Zelllinien**

Angegeben sind Mittelwert  $\pm$  Standardfehler der Intensität und der Verteilung der Fluoreszenz. Die Intensität der membranständigen Fluoreszenz wurde auf die intrazelluläre Fluoreszenz (gestrichelte Linie) normiert. Der membranständige Anteil der Fluoreszenz ist bezogen auf die gesamte zelluläre Fluoreszenz. n – Anzahl der gemessenen Zellen; \*\*\* –  $p < 0,001$  (t-Test)

### 4.1.2 Biochemische Analyse der Membranassoziation

Der Einfluss der Myristylierung auf die Membranassoziation von NCS-1-EGFP wurde in einem unabhängigen experimentellen Ansatz weiter untersucht. NCS-1-EGFP und NCS-1(G2A)-EGFP stabil exprimierende HEK-Flp<sup>TM</sup> Zellen wurden in parallelen Ansätzen sowohl unter Ca<sup>2+</sup>-freien Bedingungen, als auch in Ca<sup>2+</sup>-haltiger Lösung lysiert. Der postnukleäre Überstand der Zellysate wurde durch Ultrazentrifugation in eine Membranfraktion (Sediment) und eine lösliche cytoplasmatische Fraktion (Überstand) aufgetrennt. Nach Solubilisierung des Membranpellets wurde auf das gleiche Volumen wie der cytoplasmatische Überstand eingestellt. Beide Fraktionen wurden im Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Membran transferiert. Der Western-Blot wurde mit Anti-NCS-1-Antikörpern aus Kaninchen und sekundären HRP-gekoppelten Anti-Kaninchen-Antikörpern angefärbt (Abb. 4.5). Aus den erhaltenen Intensitätssignalen für NCS-1 wurde auf die anteilige Verteilung des NCS-1-Proteins in der Membranfraktion und der cytoplasmatischen Fraktion geschlossen.



**Abb. 4.5, NCS-1 Western-Blot-Analyse von Membran- und cytoplasmatischen Fraktionen stabil transfizierter HEK-Flp<sup>TM</sup> Zellen**

*oben:* Der NCS-1 Western-Blot (WB) zeigte die Verteilung von NCS-1-EGFP bzw. NCS-1(G2A)-EGFP zwischen cytoplasmatischer Fraktion (C) und Membranfraktion (M) in Lysaten stabil transfizierter HEK-Flp<sup>TM</sup> Zellen und die Abhängigkeit der Verteilung von Ca<sup>2+</sup>. Ca<sup>2+</sup> – Lysispuffer enthielt 10 mM Ca<sup>2+</sup>; EGTA – Lysispuffer enthielt 2 mM EGTA und war nominell Ca<sup>2+</sup>-frei.

*unten:* Coomassie-Färbung zur Ladekontrolle des Gels.

Unabhängig von der Myristylierbarkeit befand sich in der cytoplasmatischen Fraktion mehr NCS-1-EGFP als in der Membranfraktion. Allerdings zeigte myristylierbares NCS-1-EGFP in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen eine deutliche Anreicherung in der Membranfraktion. Nicht-myristylierbares NCS-1(G2A)-EGFP war hingegen in An- und Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  kaum in der Membranfraktion nachweisbar. Dieses reproduzierbare Ergebnis stimmte überein mit Ergebnissen aus stabil transfizierten 3T3-Fibroblasten Zelllinien (Grafelmann, 2004) und mit der, für endogenes NCS-1 in HEK293 Zellen und Nagerhirn festgestellten,  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der Membranassoziation (Lindemeier, 1995).

Die Ergebnisse der zellbiologischen und biochemischen Experimente zeigten übereinstimmend, dass die Mutation des, für die N-Myristylierung des Proteins notwendigen, Amino-terminalen Glycins zu Alanin, die Membranlokalisation und die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Membranassoziation von NCS-1-EGFP-Fusionsproteinen hemmt. Im Vergleich zur Literatur zeigten die Ergebnisse auch, dass die Anhängung des EGFPs an den NCS-1 C-Terminus keinen feststellbaren Einfluss auf die zelluläre Verteilung des NCS-1-Proteins hat.

Es wurde deshalb eine transgene, NCS-1-EGFP exprimierende Mauslinie erzeugt, um die Funktion von NCS-1 in der Maus *in situ* untersuchen zu können. Insbesondere bot die EGFP-Markierung die Möglichkeit, Affinitätsaufreinigungen markierten NCS-1-Proteins und möglicher Bindungspartner durchzuführen und diese zu identifizieren.

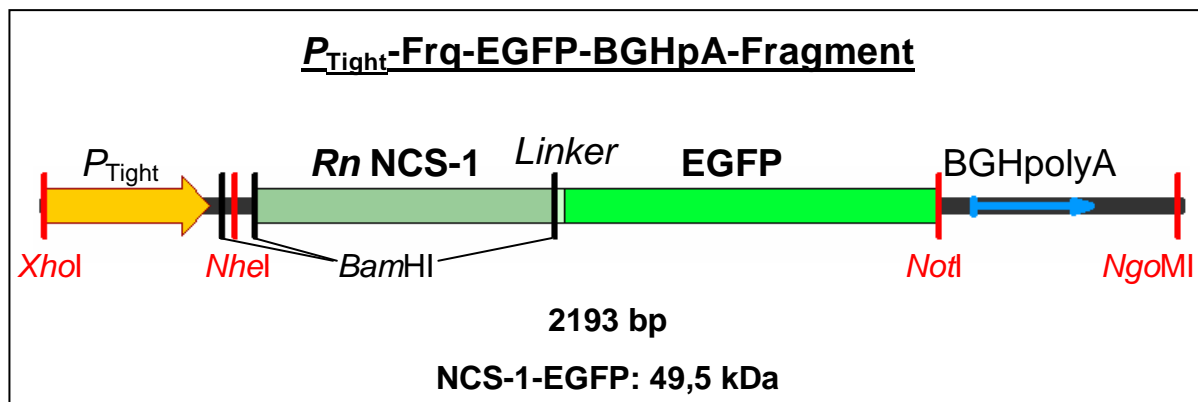
## 4.2 NCS-1-EGFP-Expression im Vorderhirn transgener Mäuse

Zur Generierung NCS-1-EGFP exprimierender transgener Mäuse wurde das *Tet-off*<sup>®</sup> Genexpressionssystem (Gossen und Bujard, 1992; Clontech) verwendet. In diesem zweiteiligen System wird zum einen ein transgener Transkriptionsfaktor – der Tetrazyklin-kontrollierte Transaktivator tTA – gewebespezifisch exprimiert. Zum anderen wird die Expression eines transgenen Ziel-Gens – auch als Antwort (*Responder*)-Transgen bezeichnet – durch einen Promotor kontrolliert, der durch den gewebespezifisch exprimierten tTA aktiviert wird. Die Expression des transgenen Ziel-Gens erfolgt nur in doppelt-transgenen Tieren, in deren Genom sowohl die



genetische Information zur Expression des transgenen tTA, als auch das transgene Ziel-Gen integriert waren. Die doppelt-transgenen Tiere entstanden durch Kreuzen zweier einfach transgener Linien. Die einfach transgenen Linien werden als Promotor- (oder tTA-) Linie und als Responder-Linie bezeichnet. Als Promotor-Linie diente die Linie tgCaMKII $\alpha$ -tTA, die tTA unter Kontrolle des starken, Vorderhirn-spezifischen Promotors der  $\alpha$ -Untereinheit der Calcium/Calmodulin-abhängigen Protein-Kinase II exprimiert (Mayford *et al.*, 1996). Hierbei wurde in Kauf genommen, dass das NCS-1-EGFP Expressionsmuster nicht mit dem endogenen NCS-1-Proteins völlig übereinstimmte und dass in den transgenen Tieren die NCS-1-EGFP Expression im Vergleich zum endogenen NCS-1 verstärkt war.

Die NCS-1-cDNA der Ratte (*Rattus norvegicus*) wurde unter Erhalt des Leserahmens mit der EGFP codierenden Sequenz (pEGFP1, *BD Bioscience*) verbunden und in das Antwort (*Responder*) -Plasmid pTRE-Tight des *Tet-off*<sup>TM</sup> Systems kloniert. Auf Proteinebene unterscheiden sich Maus- und Ratten-NCS-1 nicht. Zur Kontrolle der Klonierung des DNA-Konstrukts (Abb. 4.6) wurden der Promotor  $P_{Tight}$ , der Leserahmen der NCS-1-EGFP-cDNA und das Polyadenylierungs-Signal sequenziert.



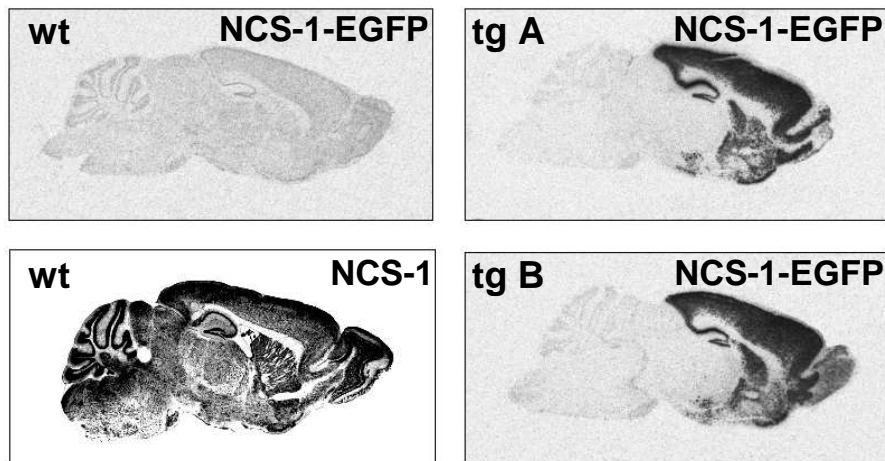
**Abb. 4.6, Schematische Darstellung des DNA-Konstrukts für die transgene Expression von NCS-1-EGFP**

Das Konstrukt enthielt den Promotor  $P_{Tight}$  (gelb), der ein modifiziertes Tetrazyklin-responsives Element (TRE) vor dem minimalen CMV-Promotor enthielt. Die Ratten NCS-1-cDNA (*Rn NCS-1*, hellgrün) mit deletiertem Stop Codon wurde unter Erhalt des Leserahmens, über eine 7 Aminosäuren codierende Verbindungs-Sequenz (*Linker*), mit der EGFP codierenden Sequenz (grün) aus pEGFP1 (Clontech) verbunden. Die Polyadenylierung wurde durch das Polyadenylierungs-Signal (blauer Pfeil) des *bovinen* Wachstumshormons (BGH, *Bovine Growth Hormone*) bewirkt. Schnittstellen der bei der Generierung und der Linearisierung des Konstrukts eingesetzten Restriktionsenzyme sind eingezeichnet.

Die Plasmid-DNA für die Pronucleusinjektion wurde endotoxinfrei präpariert. Die linearisierte DNA wurde in der Service-Einheit transgene Tiere des ZMNH mittels Pronucleusinjektion in befruchtete Eizellen der Maus (Linie C57Bl/6j x DBA) injiziert. Die befruchteten Eizellen wurden Ammentieren implantiert und es entstanden die transgenen tgTRE-NCS1E-Mauslinien. Die Integration des  $P_{Tight}$ -NCS-1-EGFP Konstrukts wurde mittels einer Polymerase Ketten Reaktion (PCR) kontrolliert (3.1.9). Es wurden zwei voneinander unabhängige transgene Mauslinien – tgTRE-NCS1E-A und tgTRE-NCS1E-B – erhalten. Die Linien wurden auf den genetischen Hintergrund der Linie C57Bl/6j zurückgekreuzt. Durch Kreuzen von tgTRE-NCS1E-Tieren mit Tieren der Promotor-Linie tgCaMKII $\alpha$ -tTA entstanden die doppelt-transgenen Linien tgCaMKII-NCS1E-A und tgCaMKII-NCS1E-B. Anschließend wurden beide transgene Linien einer ersten Charakterisierung unterzogen. Beide Linien exprimierten NCS-1-EGFP-RNA und -Protein im Vorderhirn, wie bei der Verwendung des CaMKII-Promotorsystems erwartet werden konnte.

### 4.3 Zentralnervöses Expressionsmuster von NCS-1-EGFP

Das NCS-1-EGFP-RNA-Expressionsmuster wurde zunächst mittels RNA-*in-situ*-Hybridisierungen (3.1.11) an sagittalen Hirnschnitten adulter, männlicher Mäuse untersucht und mit dem im Allen Brain Atlas (Lein *et al.*, 2007) publizierten Expressionsmuster endogener NCS-1-mRNA verglichen. Das NCS-1-EGFP-Transkript wurde mit EGFP-Sonden im Vorderhirn doppelt-transgener Tiere der Linien tgCaMKII-NCS1E-A und tgCaMKII-NCS1E-B nachgewiesen (Abb. 4.7).

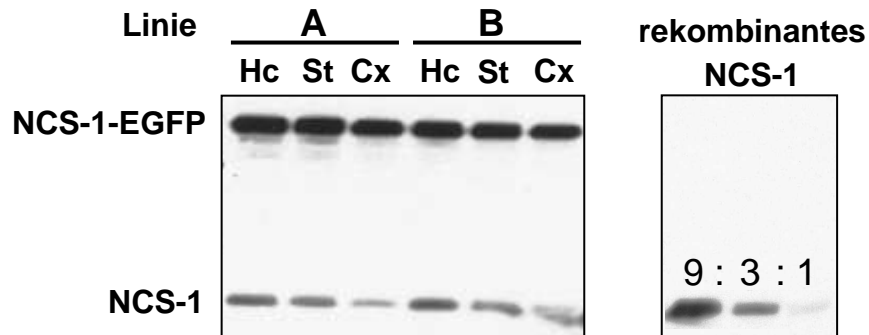


**Abb. 4.7, RNA *in situ* Hybridisierungen an Gewebeschnitten, NCS-1-EGFP-Transkript im Gehirn transgener Mäuse und NCS-1-Transkript im Wildtyp-Maus Gehirn**

RNA *in situ* Hybridisierung mit EGFP-spezifischer, radioaktiv markierter antisense Sonde an sagittalen Gewebeschnitten doppelt-transgener Tiere und Wildtyp-Kontrolle. Die EGFP-Sonde wurde in Hirnschnitten doppelt-transgener Tiere beider Linien (tg A: tgCaMKII-NCS1E-A und tg B: tgCaMKII-NCS1E-B) Vorderhirn-spezifisch an Neocortex, Hippocampus, Striatum und Bulbus Olfactorius gebunden. *Links oben*: Kontrolle der NCS-1-EGFP Sonde durch Hybridisierung an Wildtyp-Hirn (wt). *Links unten*: Abbildung Freq\_94 aus dem Allen Brain Atlas (Lein *et al.*, 2007) zeigt eine *in situ* Hybridisierung einer NCS-1-Sonde an einem Wildtyp-Maus-Gehirnschnitt eines 8 Wochen alten männlichen Tieres der Linie C57Bl/6j.

Im Allen Brain Atlas (Lein *et al.*, 2007) war die Expression des endogenen NCS-1-Transkripts über das gesamte Hirn zu sehen. Am stärksten wurde NCS-1 im Hippocampus, Neocortex, Cerebellum und im olfaktorischen Bulbus transkribiert. Die Ergebnisse der *in-situ* Hybridisierungen mit der EGFP-Sonde zeigten in Übereinstimmung mit dem bekannten Expressionsmuster von endogenem NCS-1 im Wildtyp-Nager (s. auch Lindemeier, 1995), die NCS-1-EGFP Transkript-Expression am stärksten im Hippocampus, Neocortex und olfaktorischen Bulbus, etwas schwächer im Striatum, wobei zwischen beiden transgenen Linien kein signifikanter Unterschied festzustellen war.

Die Expression der beiden NCS-1-Proteine (NCS-1 und NCS-1-EGFP-Fusionsprotein) wurde in Western-Blot-Analysen von Proteinextrakten der Vorderhirnregionen Hippocampus, Neocortex und Striatum miteinander verglichen (Abb. 4.8).



**Abb. 4.8, NCS-1 Western-Blot und Vergleich der Expression von NCS-1-EGFP-Fusionsprotein und endogenem NCS-1**

*links:* Proteinpräparationen aus Hippocampus (Hc), Striatum (St) und Neocortex (Cx) von Mäusen der Linien tgCaMKII-NCS1E-A (A) und tgCaMKII-NCS1E-B (B) wurden im Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Membran transferiert. Die Detektion von NCS-1-EGFP und NCS-1 erfolgte mit Anti-NCS-1-Antikörpern und Peroxidasegekoppeltem sekundären Antikörper.

*rechts:* Zur relativen Quantifizierung der Expression transgenen NCS-1-EGFP-Proteins im Vergleich zu endogenem NCS-1-Protein wurde rekombinantes NCS-1 in verschiedenen Konzentrationen im relativen Verhältnis 9:3:1 gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulose-Membran transferiert und wie auf dem links gezeigten Western-Blot nachgewiesen.

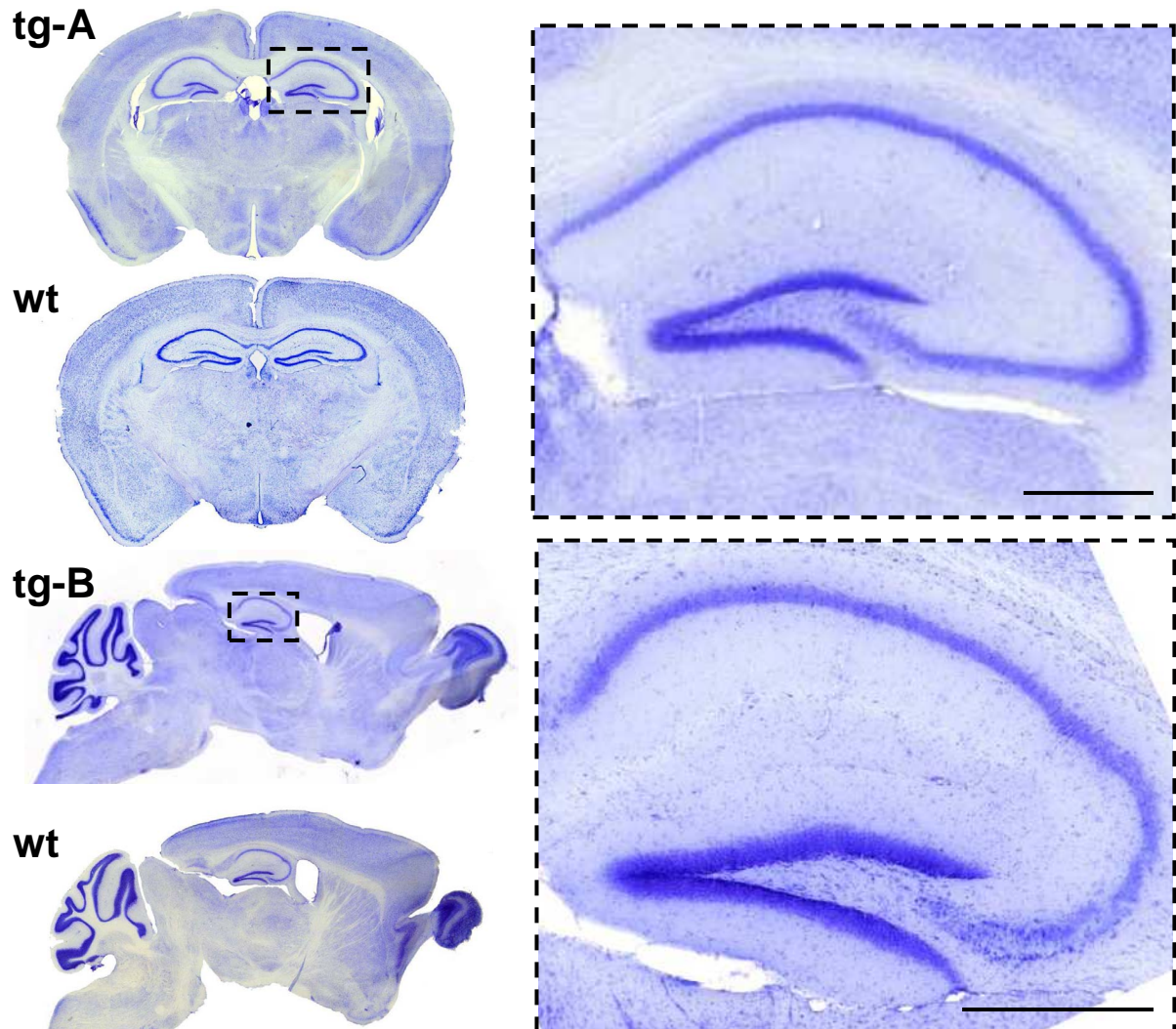
Entsprechend der Transkript-Lokalisation wurden sowohl NCS-1, als auch NCS-1-EGFP-Fusionsprotein in Proteinpräparationen aus Hippocampus, Striatum und Neocortex im Western-Blot nachgewiesen. Der Vergleich der Signalintensitäten zeigte in den untersuchten Geweben, im Vergleich mit der Expression endogenen NCS-1-Proteins, eine wesentlich stärkere Expression (>10fach) des NCS-1-EGFP-Transgens. NCS-1-EGFP wurde in Linie A in allen untersuchten Geweben stärker exprimiert als in Linie B.

#### 4.4 Hirn-Morphologie NCS-1-EGFP exprimierender transgener Mäuse

Die transgenen tgCaMKII-NCS1-E Tiere zeigten keine Verhaltensauffälligkeiten. Sie waren fertil und erreichten dasselbe Alter wie Wildtyp-Tiere (wt).

## Ergebnisse

Einflüsse der Transgen-Expression auf die makroskopische und mikroskopische Hirnmorphologie wurden nach Nissl-Färbung (3.5.3) von Hirnschnitten lichtmikroskopisch untersucht. Es wurde keine Veränderung der Hirnmorphologie festgestellt. Die Morphologie der Hirnbereiche, in denen NCS1-EGFP exprimiert wurde, war nicht unterscheidbar von Wildtyp-Kontrollen aus dem Maus-Hirn-Atlas (Paxinos und Fanklin, 2001) oder von parallel durchgeführten Nissl-Färbungen von Wildtyp-Hirnschnitten (Abb. 4.9).

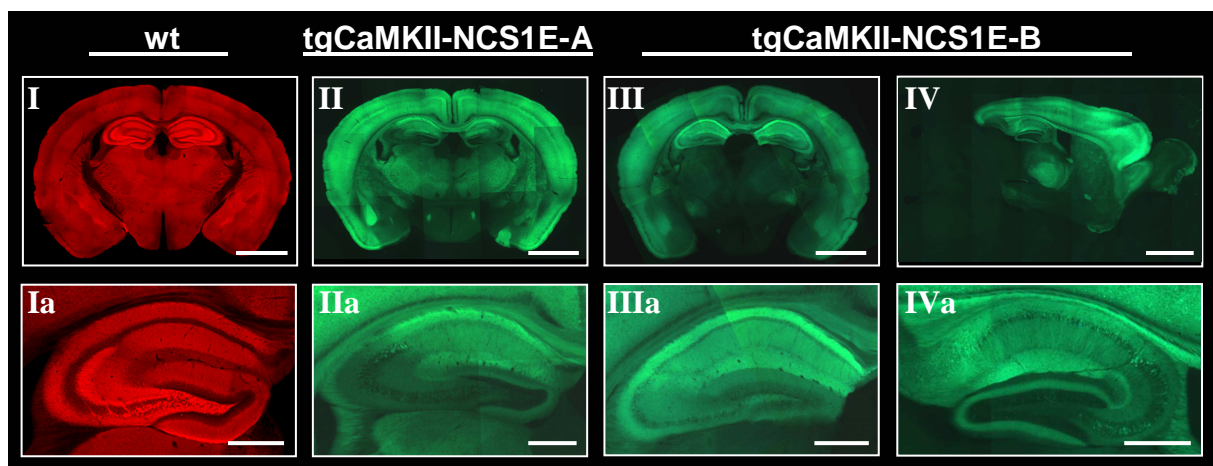


**Abb. 4.9, Morphologie von Hirnschnitten transgener Mäuse und Kontrollen**

Nissl-Färbungen von Hirnschnitten NCS-1-EGFP exprimierender Mäuse. *Ober*: Coronale Schnitte der Linie tgCaMKII-NCS1E-A (tg-A) und wt Kontrolle (wt). *Unten*: sagittale Schnitte der Linie B (tg-B) und wt Kontrolle (wt). rechts wurde jeweils die, in tg-A oder tg-B umrahmte, Hippocampus-Region in stärkerer Vergrößerung dargestellt. Maßstabsbalken – 0,5 mm

#### 4.5.1 Fluoreszenzmikroskopische Charakterisierung der NCS-1-EGFP-Expression im Hirn adulter doppelt-transgener Mäuse

Anschließend wurde die neuronale Lokalisation transgenen NCS-1-EGFP-Proteins mit der Lokalisation endogenen NCS-1-Proteins im Wildtyp-Tier verglichen. Hierzu wurden coronale und sagittale Hirnschnitte angefertigt und mit entsprechenden Antikörpern für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen angefärbt. Abb. 4.10 zeigt epifluoreszenzmikroskopische Übersichtsaufnahmen.



**Abb. 4.10, NCS-1-Immunfluoreszenz an Gehirnschnitten aus Wildtyp-Tieren und NCS-1-EGFP Fluoreszenz der Linien tgCaMKII-NCS1E-A und -B**

Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Paraformaldehyd-fixierten, 40  $\mu$ m dünnen Vibratom-Schnitten. *Oben*: Aus Einzelaufnahmen zusammengesetzte Mosaik-Aufnahmen coronaler (I-III) und sagittaler (IV) Gehirnschnitte. *Unten (Ia-IVa)*: Die Hippocampusregion wurde jeweils vergrößert.

**I**: Rote NCS-1-Immunfluoreszenz am Wildtyp-Gehirnschnitt (wt). **II-IV**: Grüne NCS-1-EGFP-Fluoreszenz ungefärbter Gehirnschnitte der Linien tgCaMKII-NCS1E -A und -B. Maßstabsbalken – 2 mm (I-IV), bzw. 0,5 mm (Ia-IVa).

Wie in der Literatur beschrieben (Lindemeier, 1995; Martone *et al.*, 1999; Jinno *et al.*, 2002), war NCS-1 im gesamten Gehirn detektierbar. Die Färbungen waren am stärksten im Hippocampus und Neocortex, am schwächsten im Hypothalamus, wobei Neuriten stärker gefärbt waren als Zellsomata. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der *in-situ*-Hybridisierungen exprimierten beide doppelt-transgene Mauslinien NCS-1-EGFP nur im Vorderhirn. Die stärkste NCS-1-EGFP-Fluoreszenz

wurde, vergleichbar mit der NCS-1-Immunfluoreszenz, im Hippocampus und im Neocortex festgestellt.

Bei genauerer Untersuchung zeigten sich allerdings Unterschiede zwischen den hippocampalen NCS-1-Anfärbungen und der NCS-1-EGFP-Fluoreszenz (Abb 4.10). Anti-NCS-1-Antikörper färbten am stärksten die Moosfasern in der CA3 Region an, während die NCS-1-EGFP-Fluoreszenz dort vergleichsweise gering war. Ein weiterer Unterschied war im Färbungsmuster im Bereich der Schichten (*Strata*) der CA1 Region festzustellen. Anti-NCS-1-Antikörper färbten *S. oriens* und *S. radiatum* stärker, als *S. lacunosum moleculare* an, während die NCS-1-EGFP-Fluoreszenz in *S. radiatum* schwächer war als in *S. oriens* und *S. lacunosum moleculare*. Des Weiteren trat in den Axonfasern des *Corpus callosum* transgener Tiere eine starke NCS-1-EGFP-Fluoreszenz auf, während mit Anti-NCS-1-Antikörpern lediglich eine schwache Färbung erhalten wurde.

In Übereinstimmung mit den Western-Blot-Ergebnissen wurden zwischen den beiden doppelt-transgenen Linien nur geringfügige Unterschiede in der NCS-1-EGFP Fluoreszenz festgestellt. Die NCS-1-EGFP-Fluoreszenz in der CA3-Region des Hippocampus war in der Linie tgCaMKII-NCS1E-B etwas intensiver als in der Linie tgCaMKII-NCS1E-A. In beiden Linien war die NCS-1-EGFP-Expression im Vorderhirn altersabhängig. Erst in 3 Wochen alten Tieren war NCS-1-EGFP nachweisbar. Die Expression nahm etwa bis zur 6. Woche zu, um dann nach ca. 15 Wochen wieder abzunehmen. Das Transgen wurde allerdings auch in alten Tieren (älter als 1 Jahr) noch exprimiert, jedoch deutlich schwächer. Die CA3-Region des Hippocampus war besonders von der altersabhängigen Expression betroffen. Die NCS-1-EGFP-Expression nahm dort schon früh wieder ab, wobei zwischen einzelnen Tieren starke Schwankungen von der 15. bis zur 25. Woche beobachtet wurden.

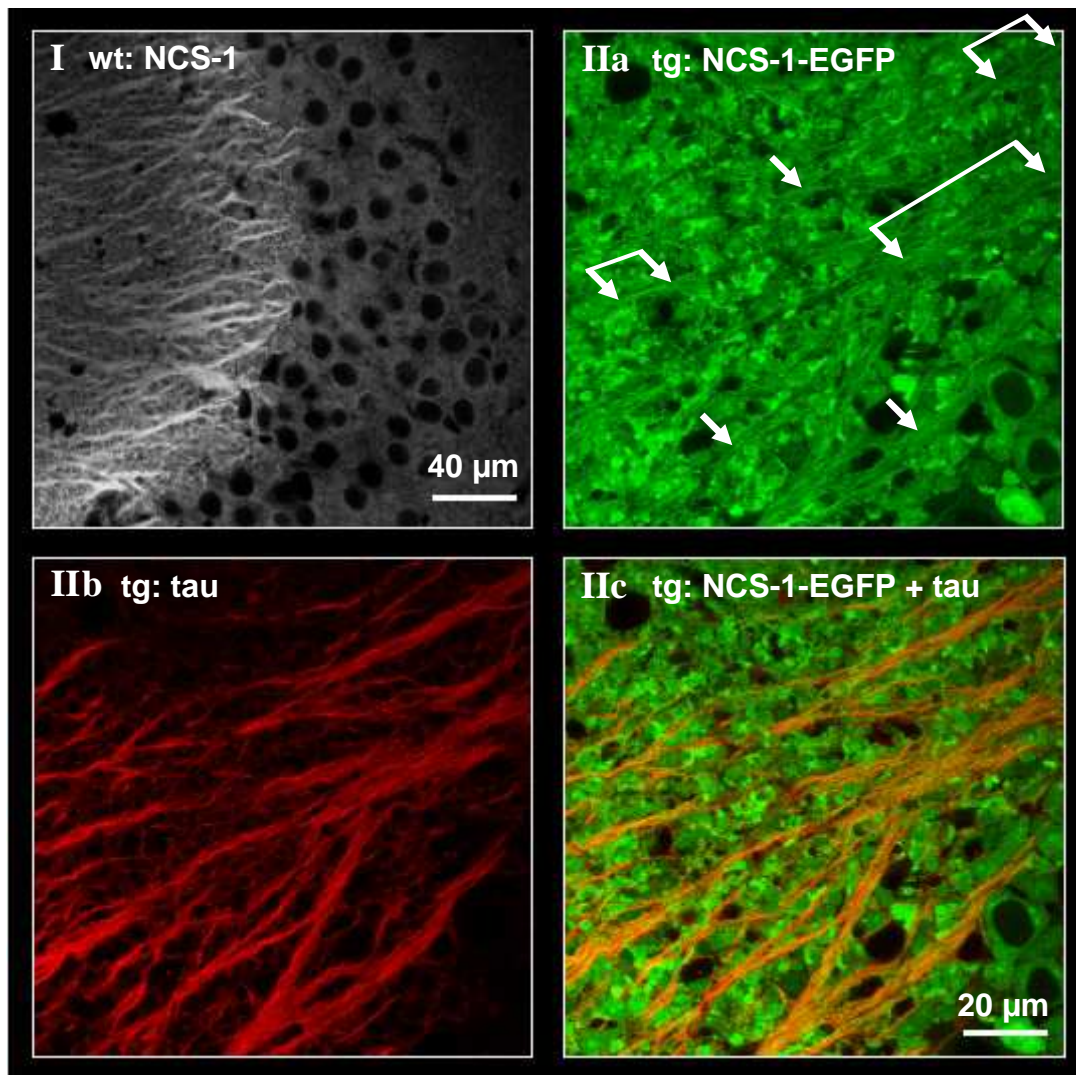
### **4.5.2 Intrazelluläre NCS-1-EGFP-Lokalisation im Hirn adulter doppelt-transgener Mäuse**

Die intrazelluläre Lokalisation von NCS1-EGFP wurde durch Co-Färbungen mit Antikörpern gegen subzelluläre Marker-Proteine untersucht und mit der NCS-1-Lokalisation im Wildtyp verglichen. Da im Wildtyp endogenes NCS-1 in Übersichtsaufnahmen am stärksten im Bereich der Moosfaser detektiert wurde und



## Ergebnisse

die Moosfasern als markante axonale Bahnen im Hippocampus fluoreszenzmikroskopisch gut identifiziert werden konnten, wurde dort die axonale Lokalisation von NCS-1-EGFP anhand von Co-Färbungen mit Anti-Tau-Antikörpern untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.11 dargestellt.



**Abb. 4.11, Axonale Lokalisation von NCS-1 (I) und NCS-1-EGFP (II) in den Moosfasern der hippocampalen CA3-Region**

Confocale Laser-Scanning-mikroskopische Aufnahmen der CA3-Region des Hippocampus in 40 µm dünnen, Paraformaldehyd-fixierten, coronalen Gehirnschnitten adulter Mäuse

**I:** NCS-1-Immunfluoreszenz im Gewebeschnitt aus Wildtyp-Gehirn, **II:** grüne NCS-1-EGFP Fluoreszenz (**IIa**) und rote Tau-Immunfluoreszenz (**IIb**). **IIc:** Kompositbild der Einzelaufnahmen. Pfeile (und verbundene Pfeile) – NCS-1-EGFP-Fluoreszenz in Moosfasern (zwischen verbundenen Pfeilen). Die Maßstäbe sind über den Maßstabsbalken angegeben, IIa-c haben den gleichen Maßstab.



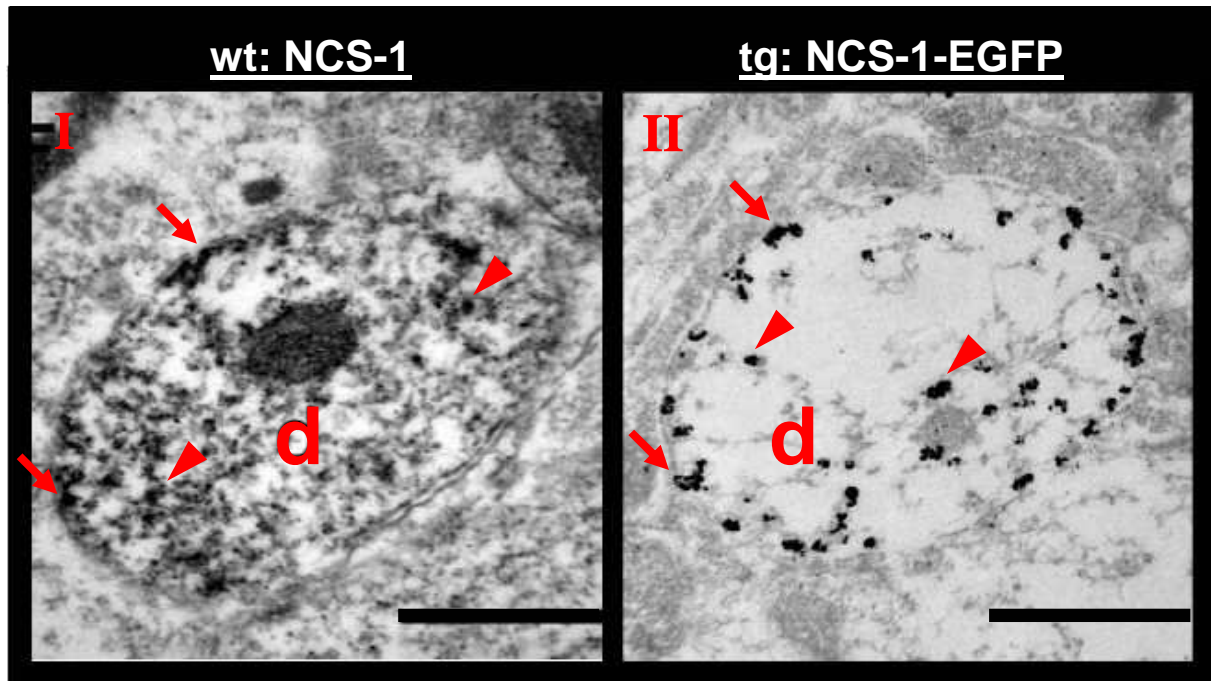
Wie endogenes NCS-1 im Wildtyp-Gehirn war NCS-1-EGFP in den Moosfasern lokalisiert. Allerdings zeigte NCS-1-EGFP in der CA3-Region transgener Tiere, im Gegensatz zu endogenem NCS-1 in Wildtyp-Mäusen, eine stärker ausgeprägte somatodendritische Lokalisation.

### **4.5.3 Ultrastrukturelle Analyse der Lokalisation der NCS-1-Proteine**

Die dendritische und die synaptische Lokalisation von NCS-1 und NCS-1-EGFP wurde elektronenmikroskopisch näher untersucht. NCS-1 wurde durch 3,3'-Diaminobenzidin-Färbungen (DAB) mit Anti-NCS-1-Antikörpern (3.5.7.3) an Wildtyp-Maushirnschnitten nachgewiesen. Als Kontrollen dienten NCS-1 Deletionsmutanten (NCS-1<sup>-/-</sup> bzw. NCS-1-Knockout-Tiere), die von Joanna Hermainski im ZMNH zur Verfügung gestellt wurden, oder mit rekombinantem NCS-1-Protein präinkubierte Anti-NCS-1-Antikörper. In Gehirnschnitten aus tgCaMKII-NCS1-E-Mäusen wurde transgenes NCS-1-EGFP ebenfalls durch DAB-Färbung detektiert (3.5.7.3). Hierbei dienten Wildtyp-Tiere als Kontrolle. Darüber hinaus gelang der Nachweis von NCS-1-EGFP auch mit der Immunogold-Methode (3.5.7.2).

### **Dendritische Lokalisation von NCS-1 und NCS-1-EGFP**

Die Ergebnisse zur dendritischen Lokalisation der NCS-1-Proteine sind in Abb. 4.12 dargestellt.



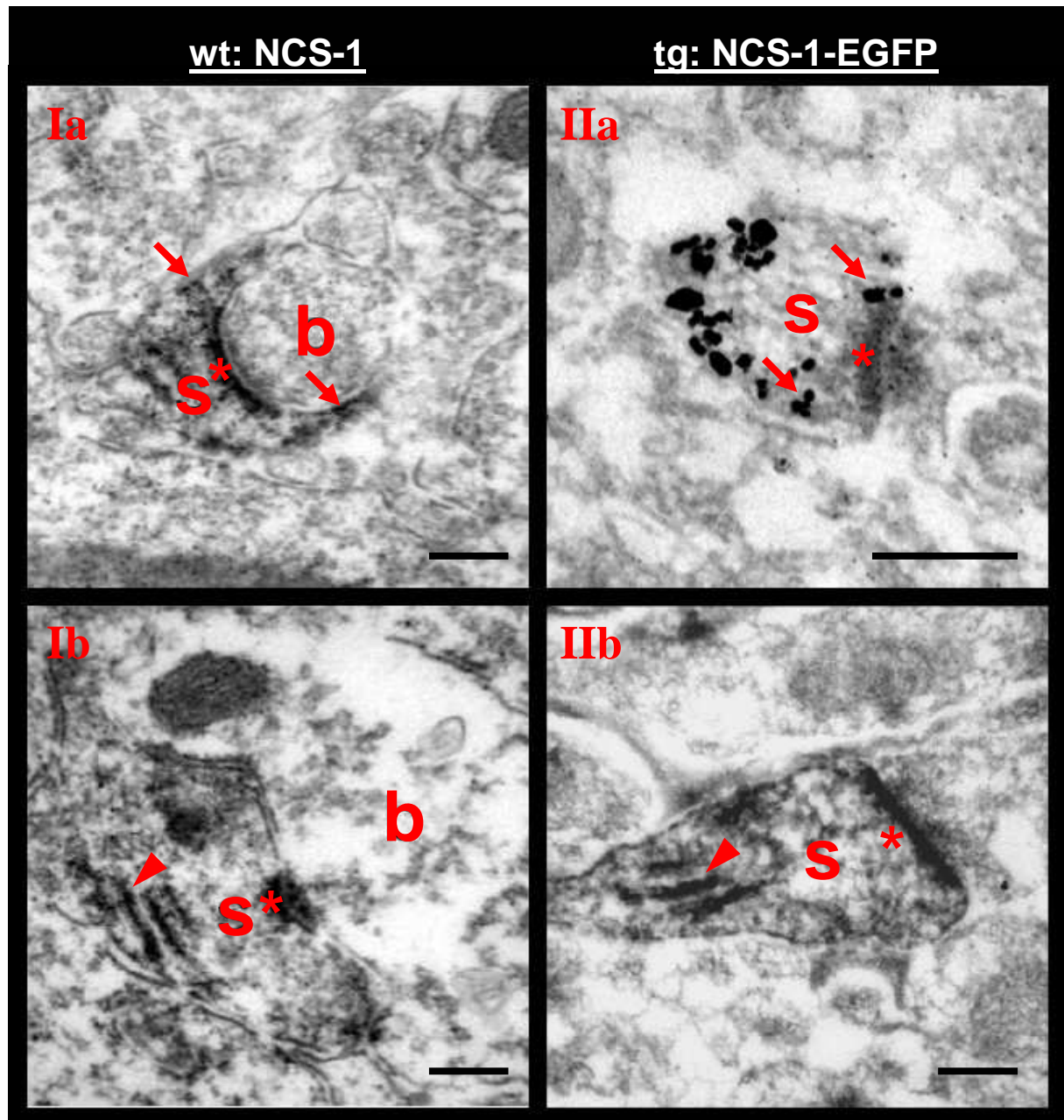
**Abb. 4.12, Elektronenmikroskopie dendritischer Lokalisation von NCS-1 und NCS-1-EGFP im Maus-Hippocampus**

**I:** Dendritenquerschnitt aus Wildtyp-Maus, DAB-Färbung zum Nachweis von NCS-1 mit primären Anti-NCS-1-Antikörpern aus Kaninchen und sekundären, Peroxidase gekoppelten Anti-Kaninchen-Antikörpern **II:** Dendritenquerschnitt aus einer transgenen Maus. NCS-1-EGFP wurde mit primärem Anti-GFP-Antikörper aus der Maus und mit sekundären, mit Goldpartikeln konjugierten, Anti-Maus-Antikörpern markiert.

d – Dendrit; Pfeile – membranständige Signale; Pfeilspitzen – Signale im Inneren des Dendriten; Maßstabsbalken – 500 nm.

Der Wildtyp-Dendritenquerschnitt zeigte NCS-1 teilweise membranständig. Außerdem war NCS-1 ungleichmäßig im Inneren des Dendriten lokalisiert. Wildtyp-NCS-1 konnte nur durch DAB-Färbungen detektiert werden, wobei das DAB-Signal im Inneren des Dendriten an elektronendichter Substanz lokalisiert war. Es kann hierbei allerdings nicht zuverlässig unterschieden werden, ob es sich um von sich aus elektronendichtes Material handelte, oder ob dieses erst nach Färbung mit DAB elektronendicht wirkte. Wie NCS-1 in Wildtyp-Tieren, wurde auch NCS-1-EGFP in transgenen Tieren im Dendriten detektiert, wo es ebenfalls sowohl membranständig, als auch ungleichmäßig im Inneren des Dendriten verteilt war. Der Immunogold-Nachweis zeigte, dass NCS-1-EGFP-Signale im Inneren des Dendriten an elektronendichter Substanz lokalisiert waren.

Synaptische Lokalisation von NCS-1 und NCS-1-EGFP



**Abb. 4.13, Elektronenmikroskopie der synaptischen Lokalisation von NCS-1 und NCS-1-EGFP im Maus-Hippocampus**

**I:** DAB-Färbung mit primärem Anti-NCS-1-Antikörper aus Kaninchen und sekundärem, Peroxidase gekoppeltem Anti-Kaninchen-Antikörper, zum Nachweis von NCS-1 in asymmetrischen Wildtyp-Synapsen. **II:** Asymmetrische Synapsen transgener Mäuse in denen NCS-1-EGFP mit primärem Anti-GFP-Antikörper aus Maus nachgewiesen wurde. **IIa:** Detektion durch sekundären, mit Goldpartikeln konjugierten, Anti-Maus-Antikörpern. **IIb:** DAB-Färbung mit sekundären, Peroxidase-gekoppelten, Anti-Maus-Antikörpern. **b** – Synaptische Endigungen (*Boutons*); **s** – dendritische Dornen (*Spines*); Pfeile – Membrannahe Signale in dendritischen Dornen; Pfeilspitzen – *Spine Apparatus*; \* – postsynaptische Verdichtung (PSD); Maßstabsbalken – 200 nm.

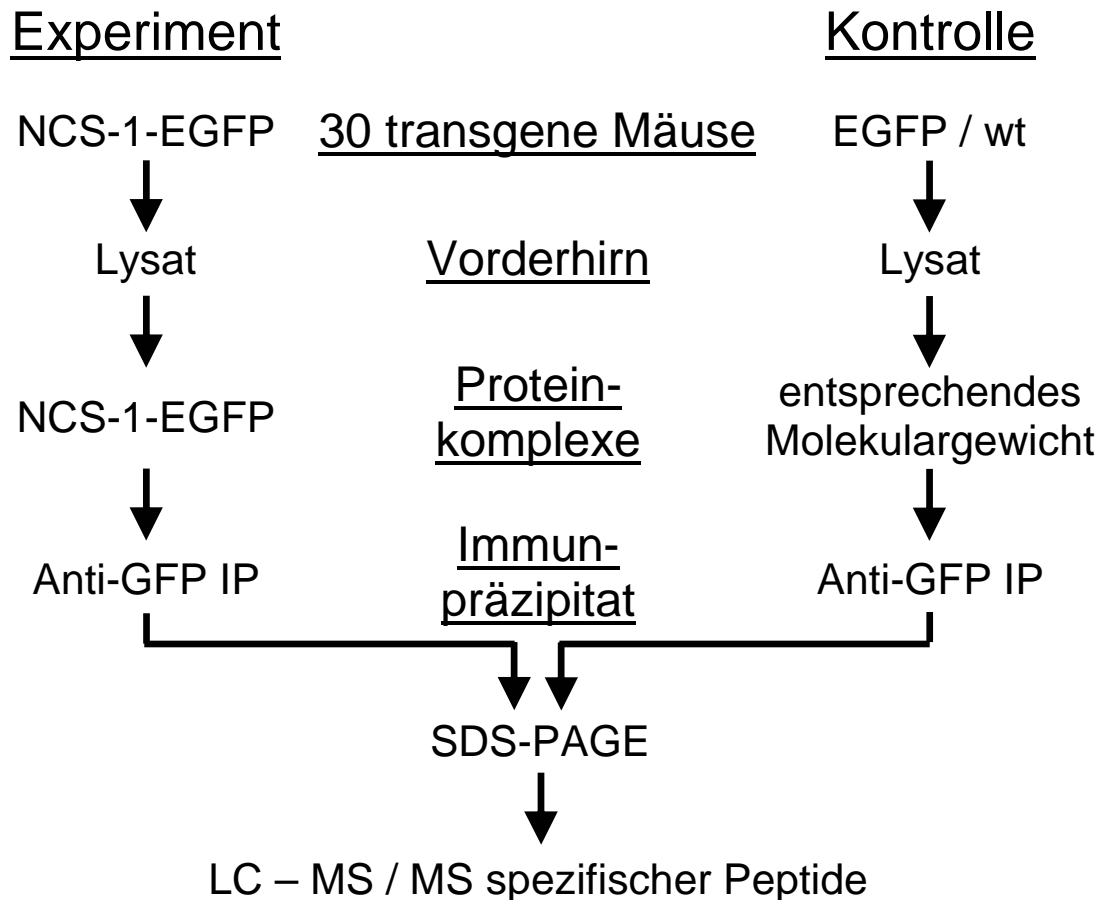
Abb. 4.13 zeigt die Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Analyse der Lokalisation des NCS-1-Proteins in der Synapse. NCS-1 konnte in dendritischen Dornen (*Spines*), den postsynaptischen Kompartimenten exzitatorischer Synapsen, nachgewiesen werden. Es war dort unter anderem am *Spine-Apparatus* lokalisiert. Der *Spine-Apparatus* ist eine Organelle in dendritischen Dornen, die aus Membranen des glatten endoplasmatischen Reticulums hervorgeht, der eine Rolle bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicherung, lokaler Protein- und Membran-Synthese, sowie beim Protein-Transport zugesprochen wurde (Deller *et al.*, 2007; Luscher *et al.*, 2000). NCS-1-EGFP wurde an vergleichbaren Stellen in dendritischen Dornen gefunden. Wie auch NCS-1 war es zum Teil membranständig lokalisiert. Der NCS-1-EGFP Nachweis mit Immunogold erlaubte eine genauere Untersuchung der Lokalisation von NCS-1-EGFP an elektronendichten Bereichen der Dornen. NCS-1-EGFP Signale befanden sich, wie auch NCS-1, häufig angrenzend an die postsynaptische Verdichtung, sowie am *Spine-Apparatus*.

### 4.6 Identifikation NCS-1-EGFP-bindender Proteine

NCS-1-EGFP enthaltende Proteinkomplexe aus Vorderhirnlysat transgener Mäuse wurden gelchromatographisch von freiem NCS-1-EGFP separiert, mit Anti-GFP-Antikörpern präzipitiert, und co-präzipitierte Proteine wurden massenspektroskopisch identifiziert. Die experimentelle Strategie ist in Abb. 4.14 dargestellt und im Folgenden beschrieben.

Zunächst wurde Vorderhirnlysat von 30 transgenen tgCaMKII-NCS1E-Tieren präpariert. Als Kontrolle diente Vorderhirnlysat, das zu gleichen Teilen von Wildtyp-Tieren und tgCaMKII-EGFP-Tieren stammte. tgCaMKII-EGFP-Tiere exprimieren EGFP unter Kontrolle des CaMKII $\alpha$ -Promotors (Linie G9, Krestel *et al.*, 2001). Die Lysis-Bedingungen orientierten sich an den Bedingungen der Co-Aufreinigung und der Co-Präzipitation von Hefe-Frq1 mit dem Frq1-Interaktionspartner Pik1 (Flanagan und Thorner 1992; Hendricks *et al.*, 1999; Huttner *et al.*, 2003). Die, durch differentielle Zentrifugation des Lysats erhaltene, lösliche Fraktion S2 wurde gelchromatographisch fraktioniert (Abb. 4.15).

## Experimentelle Strategie

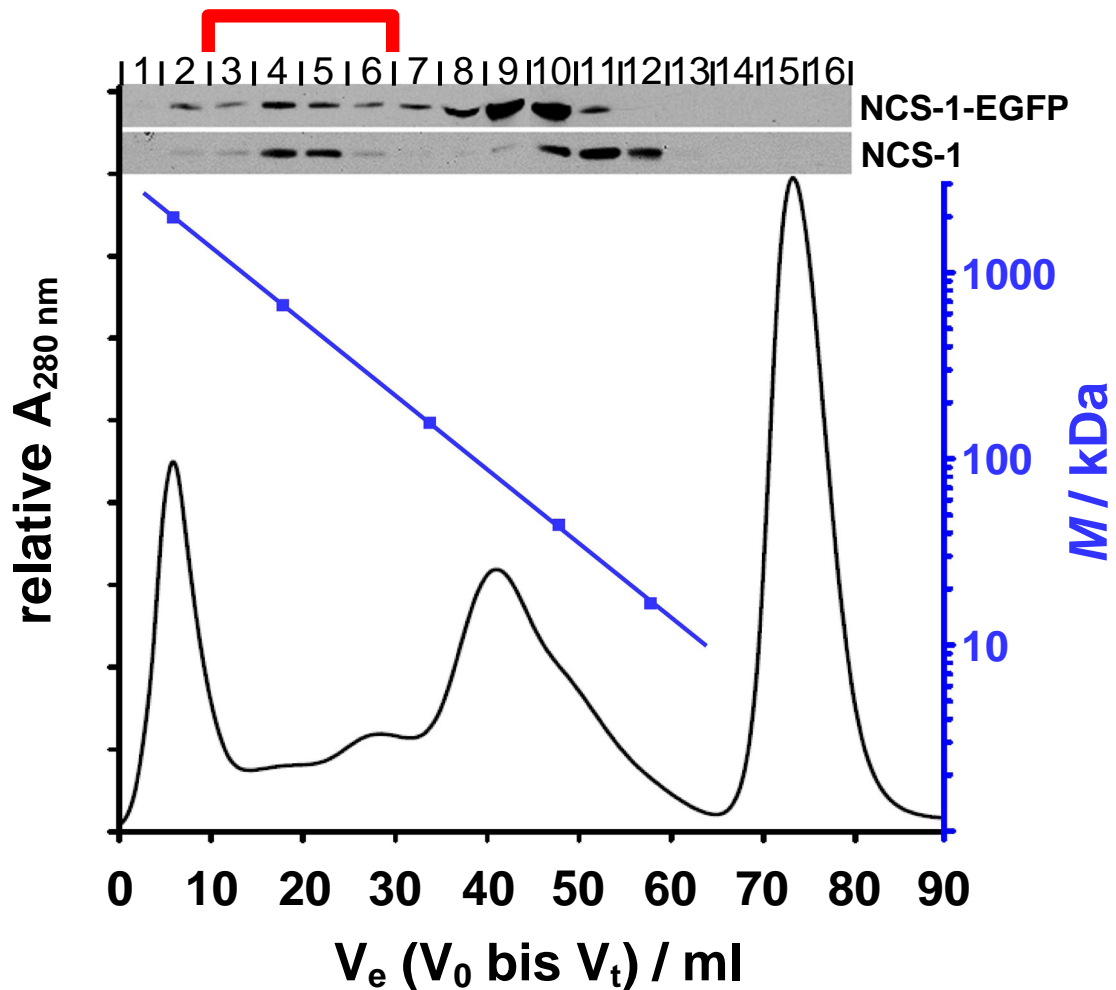


**Abb. 4.14, Experimentelle Strategie zur Identifizierung NCS-1-bindender Proteine**

Es wurden 30 NCS1-EGFP-Fusionsprotein exprimierende transgene Mäuse eingesetzt. Im Kontrollexperiment wurden transgene Tiere, die EGFP unter Kontrolle desselben Promotors exprimierten und Wildtyp-Tiere (wt) verwendet. Aus dem Vorderhirnlysat wurden hochmolekulare Proteinkomplexe, in denen NCS-1-EGFP enthalten war, von niedermolekularem, freien NCS-1-EGFP getrennt. Nach Aufkonzentrieren wurden aus den hochmolekularen Komplexen, durch Anti-GFP-Co-Immunpräzipitation (IP), NCS-1-EGFP-Fusionsprotein und daran bindende Proteine präzipitiert. Das Immunpräzipitat wurde im SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mit kolloidalem Coomassie-Brilliant-Blau-G250 gefärbt. Spezifische Coomassie-gefärbte Banden, die nicht in dem Kontrollexperiment auftauchten, wurden ausgeschnitten und mutmaßliche Bindungspartner wurden mittels, an Flüssigchromatographie (LC) gekoppelter, Tandem-massenspektroskopischer (MS / MS) Analyse identifiziert.

### **4.6.1 Größenausschluss-Chromatographie der löslichen Fraktion des Hirnlysats zur Entfernung freien NCS-1-EGFP- und NCS-1-Proteins**

Die Western-Blot-Analyse der Fraktionen (Abb. 4.15), die aus der Gelchromatographie erhalten wurden, zeigte, dass sowohl NCS-1 als auch NCS-1-EGFP vor allem in zwei Bereichen eluierten. Zum einen eluierten die Proteine dort, wo entsprechend dem Molekulargewicht die freien Proteine erwartet wurden, d.h. NCS-1-EGFP eluierte bei etwa 50 kDa und NCS-1 eluierte bei etwa 20 kDa. Darüber hinaus wurden NCS-1 und NCS-1-EGFP auch noch in den Fraktionen 3-6 im Molekulargewichtsbereich von etwa 600 kDa gefunden. Nur diese Fraktionen hohen Molekulargewichts wurden in der anschließenden Co-Immunopräzipitation (Co-IP) eingesetzt, um unspezifische Bindungen an freiem NCS-1 während der Co-IP zu minimieren.



**Abb. 4.15, Elutionsprofil der Größenausschluss-Chromatographie der S2 Fraktion von Maus-Hirnlisat über eine Superdex200 Gelfiltrations-Säule (GE)**

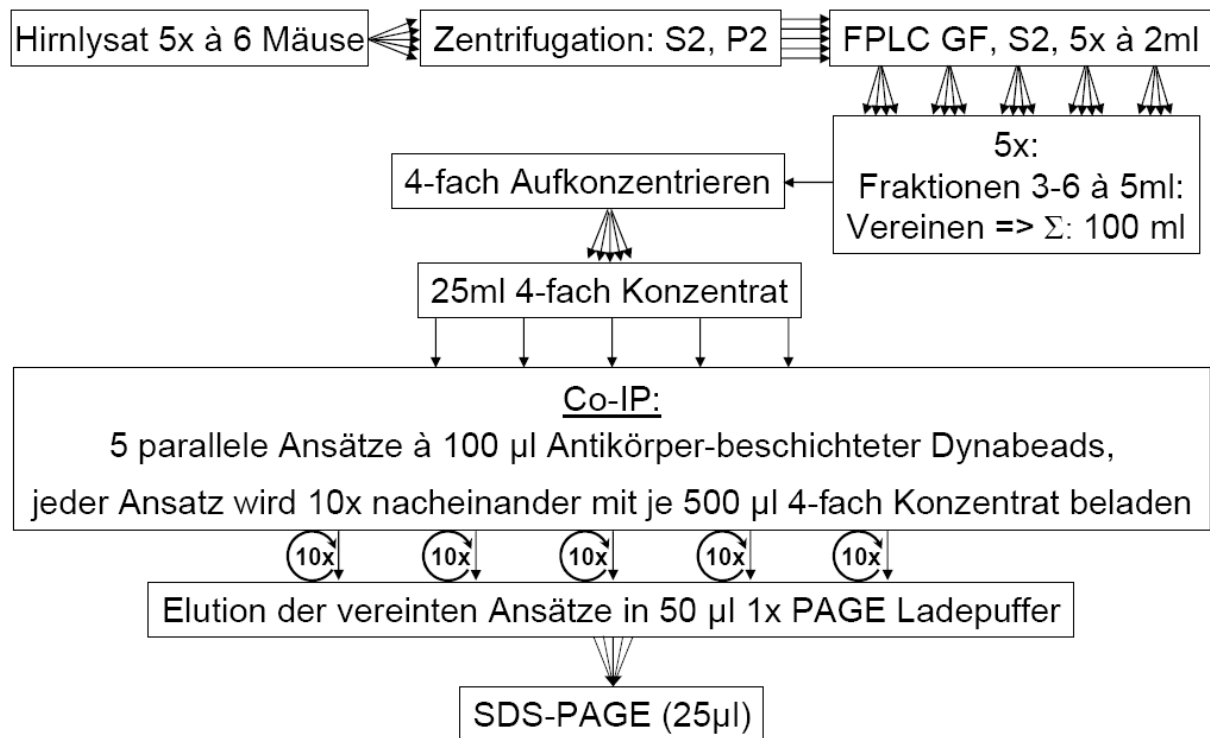
Das gesamte Eluat (80 ml) vom Ausschuss Volumen  $V_0$  bis zum Säulenvolumen  $V_t$  wurde in 5 ml Fraktionen gesammelt.  $A_{280}$  – relative 280 nm Absorption. Die Säule wurde kalibriert mit Dextran (2000 kDa), Thyroglobulin (670 kDa),  $\gamma$ -globulin (158 kDa), Ovalbumin (44 kDa) und Myoglobin (17 kDa). Die Eichkurve ist als blaue Linie über dem Elutionsprofil dargestellt.

■ – Messpunkte der Kalibrierung;  $M$  – Molekulargewicht. *Ober:* Ein Aliquot von jeder der sechzehn 5 ml Fraktionen wurde nach SDS-PAGE im Western-Blot mit Anti-NCS-1-Antikörpern analysiert. Das detektierte Antigen wird rechts genannt. Die Western-Blot-Analyse wurde so angeordnet, dass die Fraktionen 1-16 entsprechend dem zugehörigen Elutionsvolumen ( $V_e$ ) über der X-Achse abgebildet sind. ┌ – Fraktionen 3-6 wurden in der folgenden Immunpräzipitation eingesetzt.

## 4.6.2 Anti-GFP-Co-Immunpräzipitation

Eine detaillierte Übersicht über die Versuchsdurchführung zeigt Abb 4.16.

### Versuchsdurchführung



**Abb. 4.16, Übersicht über die Versuchsdurchführung**

Insgesamt wurden 30 Mäuse präpariert. Je 6 Mäusehirne wurden zusammen in Lysisbuffer homogenisiert. Das Hirnllysats wurde zentrifugiert, der Überstand wurde gelchromatographisch fraktioniert. Die hochmolekularen, NCS-1-EGFP und NCS-1 enthaltenden Fraktionen 3-6 wurden durch Ultrafiltration aufkonzentriert. Aus 30 Hirnen wurden 25 ml 4-fach Konzentrat erhalten. Diese wurden in 5 parallelen Ansätzen mit jeweils 100 µl Antikörper-beschichteter Matrix für die Co-Immunpräzipitation (Co-IP) eingesetzt. In jedem Ansatz wurden 5 ml 4-fach Konzentrat, in 500 µl Aliquots, sukzessive in 10 Schritten, über dieselben 100 µl Antikörper-beschichteter Matrix gegeben. So wurde die Antikörper-beschichtete Matrix nicht mehr als 1:5 verdünnt und es wurde zu jedem Zeitpunkt eine relativ hohe Antikörperkonzentration gewährleistet. Das Eluat der vereinten Co-IP Ansätze wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt.

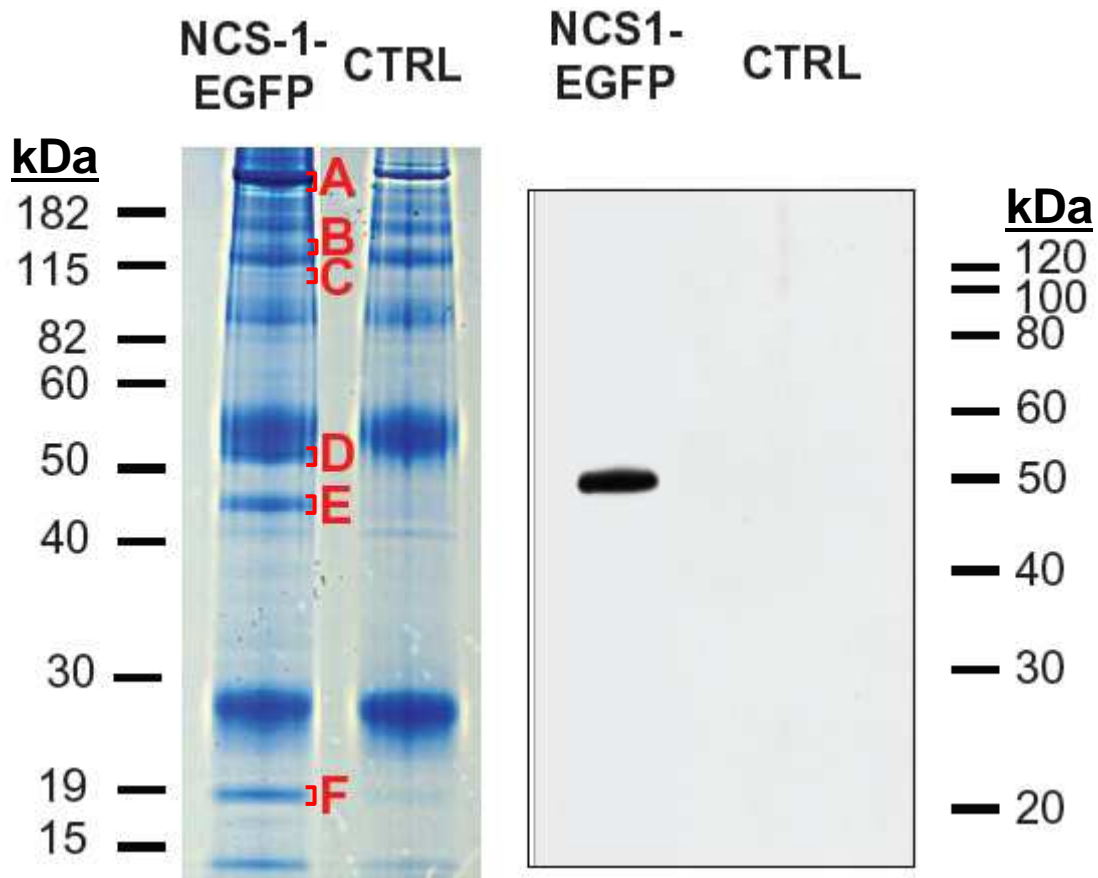
Co-IP – Co-Immunpräzipitation; Dynabeads – Antikörper-beschichtete Affinitätsmatrix (Dynabeads® Protein G, Invitrogen + Anti-GFP-Antikörper, Roche); FPLC – Fast Protein Liquid Chromatography (Äkta, GE); GF – Gelfiltration = Größenausschluss-Chromatographie; P2 – 30000x g Pellet; PAGE – SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese; S2 – 30000x g Überstand.



Es wurden in fünf parallelen Ansätzen jeweils 6 Maus-Vorderhirne präpariert. Die hochmolekularen, NCS-1-EGFP und NCS-1 enthaltenden Fraktionen 3-6 der Gelchromatographie wurden durch Ultrafiltration vierfach aufkonzentriert und anschließend für die Co-IP eingesetzt. Dabei wurden mit Protein-G beschichtete Polystyrol-mikro-Kügelchen (Dynabeads<sup>®</sup> Protein-G, Dynal/Invitrogen) eingesetzt. Zunächst wurden Anti-GFP-Antikörper (Roche) kovalent an Protein-G beschichtete Dynabeads gebunden. Um die Antikörper mit möglichst viel Protein abzusättigen, wurden die aufkonzentrierten Proteinfractionen in Aliquots sukzessive mit denselben Antikörper-beschichteten Dynabeads inkubiert.

### **SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese des Immunpräzipitats**

Das Immunpräzipitat wurde im Gel-Ladepuffer aufgenommen und im Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (NuPAGE, Invitrogen). Dabei wurde jeweils eine Hälfte des gesamten Ansatzes aufgetragen, und das Gel mit Coomassie angefärbt (Abb 4.17). Im Vergleich zu den Kontrollproben wurden im NCS-1-EGFP-Immunpräzipitat mehrere zusätzliche, mit Coomassie angefärbte Banden in den Molekulargewichtsbereichen 250 kDa, 130 kDa, 110 kDa, 55 kDa, 45 kDa und 20 kDa gefunden. Diese wurden möglichst exakt ausgeschnitten, mit Acetonitril dehydriert und getrocknet. Die entsprechenden Regionen des Kontroll-experiments wurden ebenfalls ausgeschnitten, wobei der Kontrollbereich etwas größer gefasst wurde (etwa + 1mm auf beiden Seiten der Region in der sich im Experiment mit NCS-1-EGFP exprimierenden Tieren die Bande befand). Die ausgeschnittenen Gel-Stücke wurden mit Acetonitril dehydriert und getrocknet. Die in den Gelstücken enthaltenen Proteine wurden im Gel einer tryptischen Hydrolyse unterzogen. Tryptische Peptide wurden extrahiert und durch an Flüssigchromatographie gekoppelte Tandem-Massenspektroskopie (LC-MS/MS) identifiziert.



**Abb. 4.17, SDS-PAGE und NCS-1 Western-Blot der Anti-GFP-Co-Immünpräzipitation**

*Links:* Coomassie-Färbung des elektrophoretisch aufgetrennten Anti-GFP-Immünpräzipitats der Fraktionen 3-6. Molekulargewichtsstandards (in kDa) sind links angegeben. Die roten Buchstaben markieren Peptidbanden, die nicht (oder deutlich schwächer) in dem Kontrolleexperiment auftauchten und die ausgeschnitten wurden, um enthaltene Proteine durch LC-MS/MS zu identifizieren. *Rechts:* Aliquots der Co-IP wurden nach SDS-PAGE im Western-Blot mit Anti-NCS-1-Antikörpern analysiert, Molekulargewichtsstandards (in kDa) sind rechts angegeben.

#### 4.6.3 Massenspektroskopische Analyse der präzipitierten Proteine

Die tryptische Proteolyse im Gel und die LC-MS/MS Analyse der Peptidzusammensetzungen wurden von Dr. Alexandre Zougman bei Professor Dr. Matthias Mann in der Abteilung Proteomics und Signaltransduktion des Max Planck Instituts (MPI) für Biochemie in Martinsried durchgeführt. Die automatisierte Datenanalyse erfolgte am MPI mit der Mascot Suchmaschine (Perkins *et al.*, 1999). Mit den generierten MS-Daten wurde die IPI Protein Datenbank des Internationalen Protein Indexes (Kersey *et al.*, 2004) durchsucht. Aus den sechs ausgeschnittenen

Banden des NCS-1-EGFP Co-Präzipitats wurden 2907 tryptische Peptide aus 283 Proteinen identifiziert. Aus den entsprechenden, allerdings etwas größer ausgeschnittenen, Regionen des Kontrollexperiments wurden 4120 tryptische Peptide aus 411 Proteinen identifiziert. Proteine, die in beiden Experimenten detektiert wurden, wurden als unspezifisch gebunden klassifiziert. Diese wurden möglicherweise an EGFP oder direkt an die Antikörper oder an die Antikörper bindende, Protein-G-beschichtete Matrix gebunden. Danach blieben immer noch 119 Proteine übrig, die nicht im Kontrollexperiment identifiziert wurden (s. Anhang).

Zur Bewertung der Ergebnisse wurde versucht zu ermitteln, welche Proteine jeweils die Hauptmenge in den, mit Coomassie angefärbten, ausgeschnittenen Banden stellten. Da die massenspektroskopische Analyse keine direkten quantitativen Informationen über die identifizierten Proteine liefert, diente in erster Näherung die Anzahl der identifizierten Peptide pro Protein als Anhaltspunkt. Es wurde dabei eine positive Korrelation zwischen der Anzahl der identifizierten Peptide eines Proteins und der Menge des entsprechenden Proteins in der Probe angenommen. Die Anzahl der identifizierten Peptide wurde dann mit der Proteingröße in Beziehung gesetzt. Des Weiteren wurde die prozentuale Sequenz-Abdeckung des identifizierten Proteins herangezogen. Diese bezeichnet den Anteil der Aminosäure-Sequenz eines Proteins, der in den für dieses Protein identifizierten Peptiden enthalten ist.

Aufgrund dieser Überlegungen wurden die folgenden Kriterien aufgestellt, um die Hauptproteine in jeder Bande zu ermitteln:

- 1.) Peptide des Proteins durften nicht im Kontrollexperiment identifiziert worden sein.
- 2.) Typische Kontaminationen (wie z. B. Keratin) und Proteine, von denen wenig-spezifische Bindungen an eine Vielzahl von Proteinen bekannt sind (wie z. B. ribosomale Proteine, Proteasom-Untereinheiten, Chaperone und Proteine, die die Proteinfaltung kontrollieren, Ribonucleoproteine, z.T. Cytoskelett-Proteine), wurden aussortiert.
- 3.) Das Molekulargewicht des identifizierten Proteins sollte zur elektrophoretischen Mobilität, also zu dem zu erwartenden Molekulargewicht der Proteine der jeweils ausgeschnittenen Bande, passen.
- 4.) Eine hohe Sequenz-Abdeckung eines Proteins, durch identifizierte Peptide, wurde als Indiz für eine hohe Konzentration des Proteins in der Probe gewertet. Die Sequenz-Abdeckung wurde prozentual (% der Gesamtsequenz) ausgewertet (Abb.4.18).
- 5.) Die Identifizierung langer Peptide (mit mehr als 15 Aminosäuren) wurde als ein zusätzlicher wichtiger Hinweis auf eine hohe Konzentration des entsprechenden Proteins in der Probe genommen.

Im Allgemeinen ging die Identifizierung längerer Peptide mit einer hohen Sequenz-Abdeckung einher (Pearson-Korrelation = 0,77 für alle 25 nach Kriterien 1. bis 3. übrig gebliebenen Proteine bzw. 0,87 für die 16 Proteine in den drei Banden mit 20 kDa, 45 kDa und 55 kDa). Aufgrund dieser fünf Kriterien wurden acht Proteine als Hauptbestandteile von vier der sechs ausgeschnittenen Coomassie-Banden klassifiziert (Abb. 4.18). Aus der 130 kDa Bande genügte kein identifiziertes Protein den oben aufgestellten Kriterien. Aus der 250 kDa Bande entsprachen zwar zwei Proteine weitgehend diesen Kriterien, jedoch war deren Sequenz-Abdeckung sehr gering. Gemäß der Annahme, dass die Menge eines Proteins in einer der Banden mit der Spezifität der Interaktion mit NCS-1-EGFP korreliert, wurden diese acht Proteine als mögliche NCS-1-Interaktionspartner betrachtet und weitergehend untersucht.

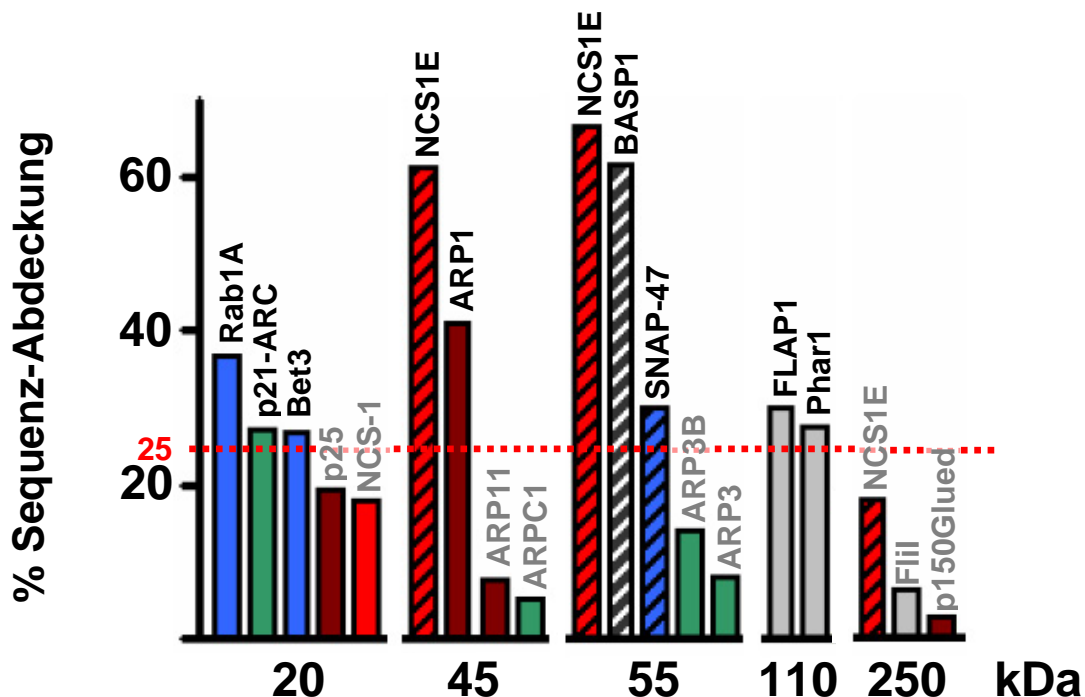
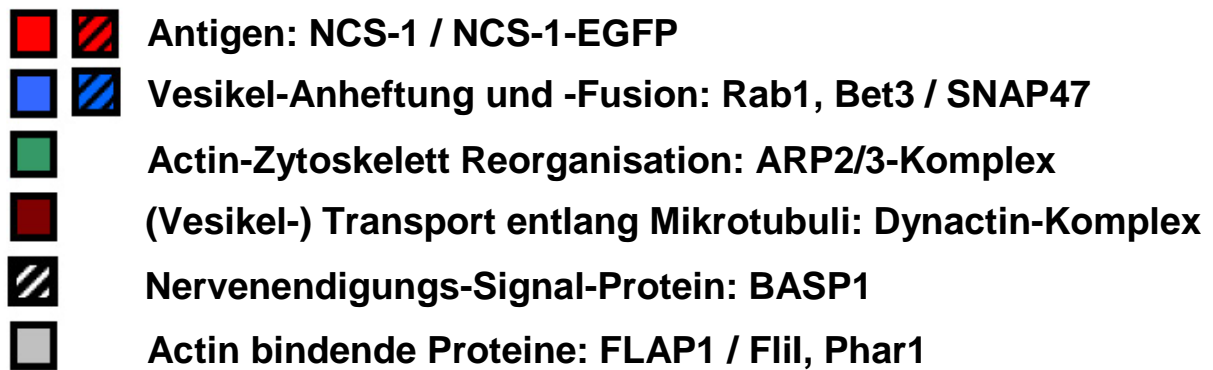


Abb. 4.18, Übersicht über identifizierte Proteine und die Sequenzabdeckung durch die identifizierten Peptide

Die Balkendiagramme zeigen, nach Proteinbanden sortiert, die Sequenz-Abdeckung der identifizierten Proteine. Eine vollständige Liste der identifizierten Proteine befindet sich im Anhang. Die Färbung der Balken des Diagramms entspricht der im oberen Teil der Abbildung dargestellten, beschriebenen Funktion des jeweiligen Proteins. Graue Beschriftung – Proteine mit weniger als 25% Sequenzabdeckung sind nur dargestellt, wenn sie an eines der, mit mehr als 25% Sequenzabdeckung identifizierten Proteine binden; ARP – *Actin related protein*; ARPC1 – *Actin related protein 2/3 complex subunit 1*; BASP1 – *brain acidic soluble protein 1*; FLAP1 – *Fliil associated protein*, Fliil – *flightless 1*; p21-ARC – *Actin related protein 2/3 complex subunit 3*; p25 – *Dynactin subunit p25*; Phar – *phosphatase and actin regulatory protein*.

Die acht als mögliche NCS-1-Interaktionspartner betrachteten Proteine waren:

- BASP1 (*brain acidic soluble protein 1*)
- die ARP1-Untereinheit des Dynactin-Komplexes
- Rab1A
- FLAP1
- SNAP-47 (*synaptosomal associated protein 47*)
- Phar1
- p21-ARC (ARPC3), eine Untereinheit des ARP2/3-Komplexes
- die Bet3-Untereinheit des TRAPP (*transport protein particle*)-Komplexes

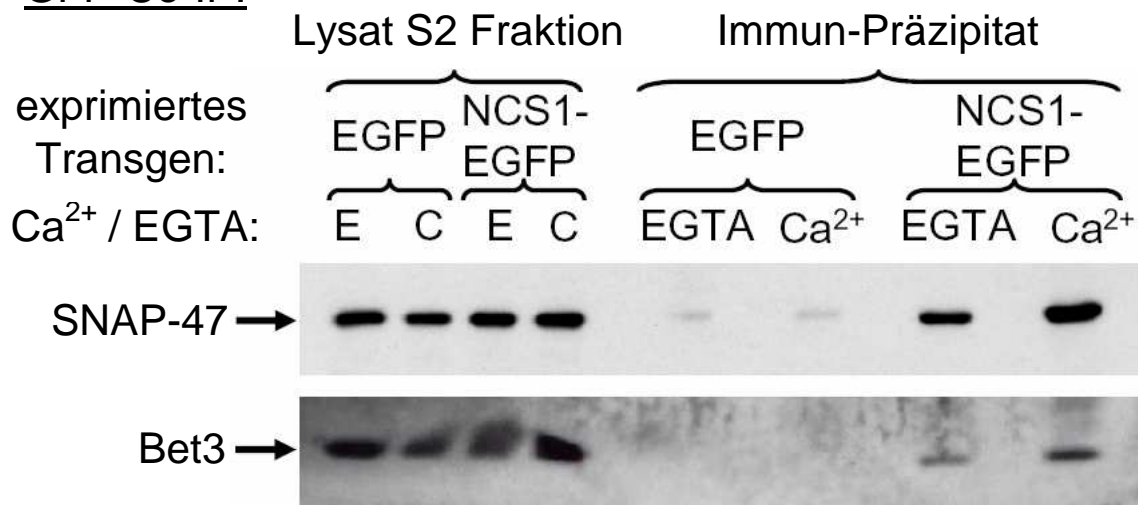
Abbildung 4.18 zeigt neben diesen acht Proteinen weitere Proteine, die zwar mit einer geringeren Sequenzabdeckung identifiziert wurden, die aber die ersten drei der zuvor aufgestellten Kriterien erfüllten und deren Bindung an einen der acht möglichen NCS-1-Interaktionspartner bekannt ist. Unter den so insgesamt 16 identifizierten Proteinen waren vier Untereinheiten des ARP2/3-Komplexes (Goley und Welch, 2006), vier Untereinheiten des Dynactin-Komplexes (Schroer, 2004), die Bet3-Untereinheit des TRAPP-Komplexes (Loh *et al.*, 2005), der als Guaninnucleotid-Austauschfaktor (GEF, *guanine nucleotide exchange factor*) für die ebenfalls identifizierte kleine GTPase Rab1A fungiert, das SNARE-Protein (*soluble n-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor*) SNAP-47 (Holt *et al.*, 2006) und BASP1 (Mosevitsky *et al.*, 1997). Außerdem wurden die Aktincytoskelett-assoziierten Proteine Flii-assoziiertes Protein 1 (FLAP1) und Flii (*Flightless I*) sowie Phar1 (*Phosphatase and actin regulator 1*) identifiziert. Somit wurden Proteine identifiziert, die an Vesikel-Transport (Dynactin, ARP2/3-Komplex; Caviston *et al.*, 2006; Campellone *et al.*, 2008), Membranfusion (SNAP-47; Holt *et al.*, 2006), Golgi-Traffic (Bet3/TRAPP, Rab1A; Loh *et al.*, 2005) oder Aktincytoskelettorganisation (Phar1, FLAP1/Flii, Allen *et al.*, 2004; Campbell *et al.*, 2000) beteiligt sind. Ein Pik1-Ortholog wurde nicht gefunden.

Zur Validierung der Ergebnisse wurden die Interaktionen von NCS-1-EGFP und NCS-1 mit den Proteinen ARP1, ARP3, BASP1, FLAP1, sowie mit Bet3, SNAP-47 und Rab1A in Co-Immünpräzipitations-Experimenten weiter untersucht. Die Ergebnisse sind im Folgenden beschrieben. Da gegen Phar1 keine Antikörper erhalten werden konnten wurde es nicht weiter untersucht.

#### 4.6.4 Bestätigung der NCS-1-EGFP-Interaktionen mit Bet3 und SNAP-47

Es wurden anti-GFP-Co-Immunpräzitationen aus der löslichen Fraktion (S2) des Hirnlysats transgener NCS-1-EGFP exprimierender Mäuse durchgeführt und das Präzipitat wurde im Western-Blot untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass Bet3 und SNAP-47 mit NCS-1-EGFP co-präzipitiert werden konnten (Abb. 4.19). In beiden Fällen wurde in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ( $[\text{Ca}^{2+}] > 1,5 \mu\text{M}$ ) mehr Protein co-präzipitiert als unter nominell  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen. Das weist auf eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der NCS-1-EGFP-Interaktion mit Bet3 bzw. SNAP-47 hin. In Kontrollexperimenten mit entsprechenden Lysaten EGFP exprimierender Mäuse wurde lediglich für SNAP-47 eine unspezifische, sehr schwache Hintergrundbindung festgestellt. Im Ergebnis bestätigten die Co-IP-Experimente, dass die in den hochmolekularen chromatographischen Fraktionen gefundenen Proteine Bet3 und SNAP-47 mit NCS-1-EGFP in einem großen Proteinkomplex vorkommen.

#### GFP-Co-IP:



**Abb. 4.19, SNAP-47- (oben) bzw. Bet3- (unten) Western-Blot der Anti-GFP-Co-Immunpräzitation**

Vorderhirnlysate transgener NCS-1-EGFP-Fusionsprotein exprimierender Mäuse (tgCaMKII-NCS1E) wurde präpariert und nach einem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand S2 für die anti-GFP Immunpräzitation eingesetzt. Als Kontrolle diente die S2-Fraktion von Vorderhirnlysate transgener Tiere, die EGFP, nicht jedoch NCS-1-EGFP-Fusionsprotein exprimierten (tgCaMKII-EGFP). C /  $\text{Ca}^{2+}$  – Lysispuffer enthielt  $> 1,5 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ ; E / EGTA – Lysispuffer enthielt 2 mM EGTA und war nominell  $\text{Ca}^{2+}$ -frei; NCS1-EGFP – Mäuse exprimierten transgenes NCS-1-EGFP; EGFP – Mäuse exprimierten transgenes EGFP

Die Dynactin-Untereinheit ARP1, sowie FLAP1 wurden zwar co-immunpräzipitiert, allerdings wurden sie ebenso stark auch im Kontroll-Präzipitat nachgewiesen, so dass keine spezifische Interaktion mit NCS-1-EGFP angenommen wurde. Die Untereinheiten des ARP2/3-Komplexes p21-ARC und ARP3, konnten zwar im Hirnlysate, aber nicht im Immunpräzipitat nachgewiesen werden. Rab1A und BASP1 konnten durch keine der eingesetzten Antikörper (Santa Cruz Biotech, Abcam, ProteinTech Group) im Western-Blot detektiert werden, so dass ihre Co-Immunpräzipitation nicht untersucht werden konnte. Somit verblieben für die weiteren Untersuchungen die Proteine Bet3 und SNAP-47.

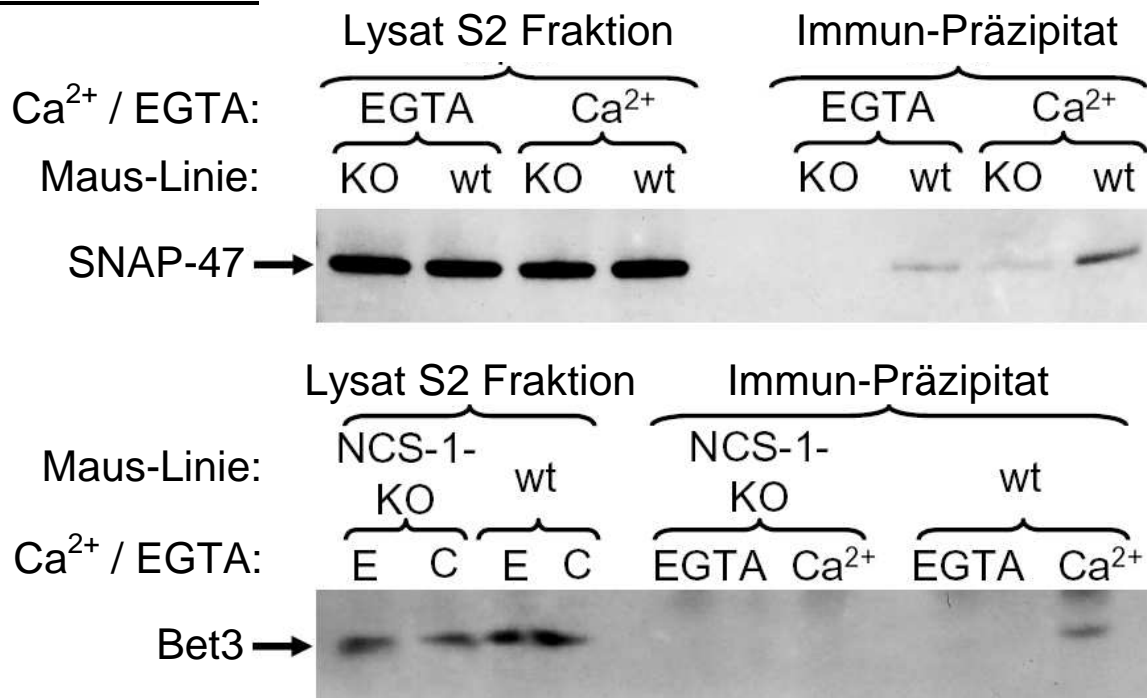
### **4.7 Protein-Interaktionen von NCS-1 in Wildtyp-Tieren**

Die Anwesenheit von NCS-1 in den hochmolekularen Fraktionen 3-6 der Gelchromatographie (Abb.4.15) zusammen mit NCS-1-EGFP ließ vermuten, dass auch endogenes NCS-1 mit einem oder mehreren der gefundenen NCS-1-EGFP-Bindungspartner interagiert. Um dies zu überprüfen wurden, analog zu den vorherigen Co-IP-Experimenten, Lysate aus Hirnen von Wildtyp-Mäusen angefertigt. In diesem Fall diente als Kontrolle Lysat, das aus NCS-1<sup>-/-</sup> Mäusen (NCS-1-Knockout) präpariert worden war.

Die Ergebnisse von anti-NCS-1-Co-IP-Experimenten (Abb. 4.20) zeigten, dass sowohl Bet3, als auch SNAP-47 mit anti-NCS-1-Antikörpern spezifisch mit NCS-1 co-immunpräzipitiert werden konnten. Allerdings wurden auch hier in Kontrollexperimenten geringe Mengen von SNAP-47 präzipitiert. Es war wiederum eine deutliche Ca<sup>2+</sup>-Abhängigkeit der Co-IP Ergebnisse festzustellen. Somit wurde eine biochemische Interaktion von NCS-1 mit Bet3 und SNAP-47 in Lysaten des Wildtyp-Maus-Gehirns nachgewiesen.



NCS-1 Co-IP:



**Abb. 4.20, SNAP-47- (oben) bzw. Bet3- (unten) Western-Blot der Anti-NCS-1-Co-Immunpräzipitation**

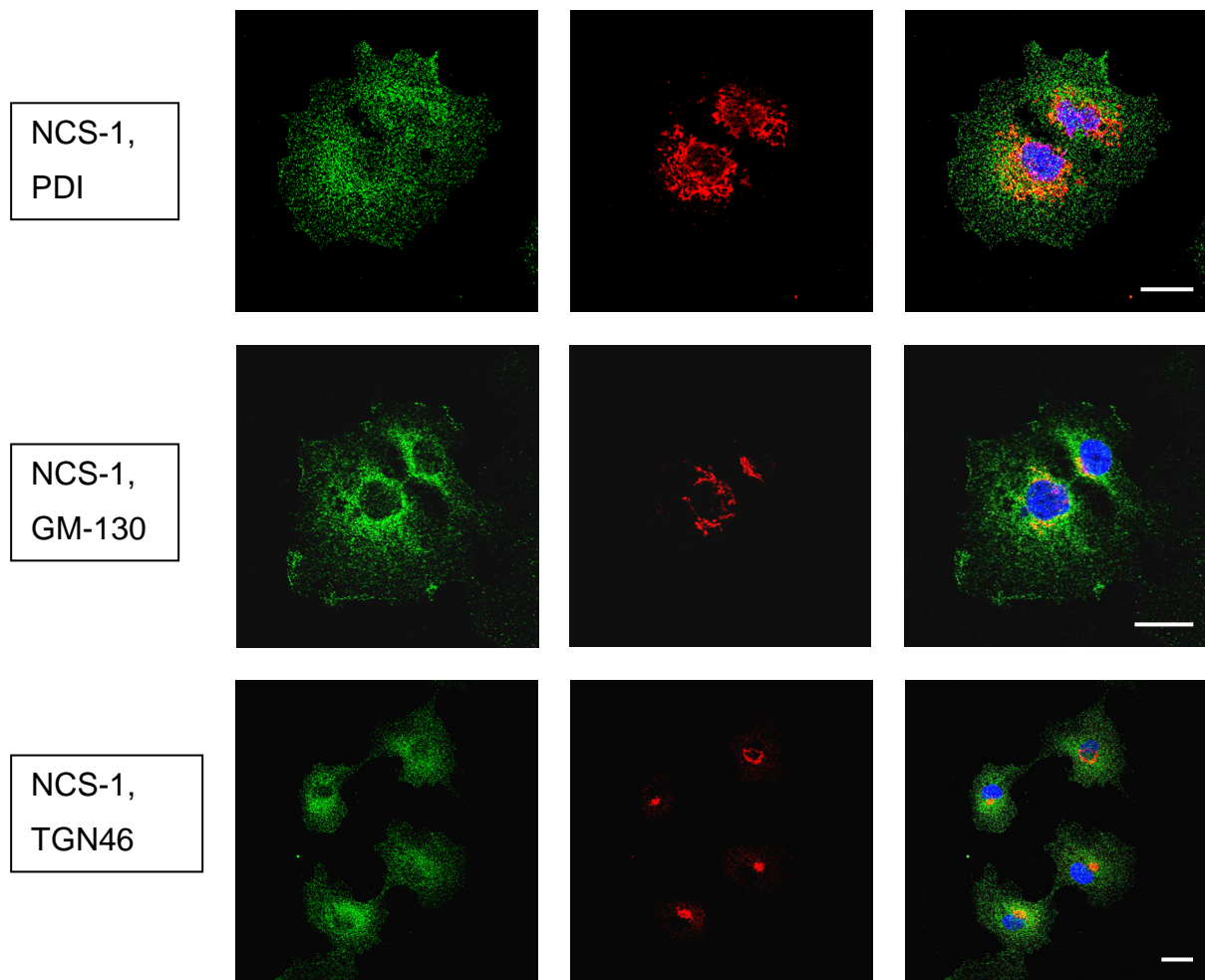
Vorderhirnlysat von Wildtyp-Mäusen wurde präpariert und nach einem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand S2 für die Anti-NCS-1-Co-Immunpräzipitation eingesetzt. Als Kontrolle diente die S2-Fraktion vom Vorderhirnlysat von NCS-1<sup>-/-</sup>-Mäusen, die NCS-1 nicht exprimierten. C / Ca<sup>2+</sup> – Lysispuffer enthielt >1,5 µM Ca<sup>2+</sup>; E / EGTA – Lysispuffer enthielt 2 mM EGTA und war nominell Ca<sup>2+</sup>-frei; wt – Wildtyp-Mäuse; NCS-1-KO – NCS-1<sup>-/-</sup>-Mäuse, die kein NCS-1 exprimierten.

Wiederum wurden die p21-ARC- und die ARP3- Untereinheiten des ARP2/3-Komplexes nicht co-präzipitiert. FLAP1 und ARP1 wurden auch hierbei im Kontrollexperiment co-präzipitiert, so dass die Annahme der unspezifischen Co-Präzipitation dieser beiden Proteine bestätigt wurde.

Der Anti-SNAP-47-Antikörper konnte auch für Immunpräzipitationen eingesetzt werden. Es gelang jedoch nicht, SNAP-47 vollständig aus dem Lysat zu präzipitieren sowie NCS-1 oder Bet3 mit SNAP-47 zu co-präzipitieren.

### 4.8 Subzelluläre Lokalisation von NCS-1 und neu identifizierten NCS-1-bindenden Proteinen

Die Funktionen der neu identifizierten NCS-1-Bindungspartner sind zum Teil bekannt, die NCS-1-Interaktionen waren bisher allerdings nicht bekannt. SNAP-47 ist ein SNARE-Protein, für das zwar *in vitro* eine katalytische Funktion bei der Membranfusion gezeigt werden konnte, dessen physiologisches Substrat allerdings unbekannt ist (Holt *et al.*, 2006). Bet3 ist eine Untereinheit des TRAPP-Komplexes und ist am ER-Golgi-Transport beteiligt (Loh *et al.*, 2005). Der TRAPP-Komplex ist ein hochkonservierter Anheftungskomplex (*tethering factor*), der den Prozess der Vesikelanheftung an Ziel-Membranen steuert. Er befindet sich am Golgi-Apparat und ist beteiligt an der Anheftung von COPI- (*coat protein complex*) und COPII-haltigen Vesikeln und wirkt als Rab1-GEF (Cai *et al.*, 2008). Rab1 reguliert nach Aktivierung durch den TRAPP-Komplex die SNARE-vermittelte Fusion anterograd transportierter COPII-Vesikel mit der Ziel-Membran (Allan *et al.*, 2000; Pind *et al.*, 1994). COPI-Vesikel sind am intra-Golgi Transport, sowie am retrograden Transport vom Golgi-Apparat zum endoplasmatischen Reticulum (ER) beteiligt, COPII-Vesikel am anterograden Transport vom ER zum Golgi-Apparat. Es wurde daher besonders die Lokalisation von NCS-1 an diesen intrazellulären Kompartimenten untersucht. Weil die intrazelluläre Lokalisation von an Transportprozessen beteiligten Proteinen in Gewebeschnitten schwer zu beurteilen ist, wurden kultivierte Zellen untersucht. Die hierfür eingesetzten COS-7 Zellen boten den Vorteil, endogen NCS-1 zu exprimieren, wobei die beschriebene perinucleäre Lokalisation (Bourne *et al.*, 2001) die Untersuchung der Co-Lokalisation mit Komponenten des frühen sekretorischen Transports erleichterte. Zudem besitzen COS-7 Zellen einen ausgedehnten cytoplasmatischen Bereich, in dem die Kompartimente fluoreszenzmikroskopisch besser unterschieden werden konnten. Die Abbildungen 4.21 - 4.23 zeigen die Immunfluoreszenzen endogener Proteine und subzellulärer Marker.



**Abb. 4.21, Immunfluoreszenz von endogenem NCS-1 und subzellulären Markerproteinen in COS-7 Zellen**

Immunfluoreszenz von NCS-1 (grün) und Marker-Protein (rot)

*oben:* für das endoplasmatische Reticulum (PDI – Protein-Disulfid-Isomerase),

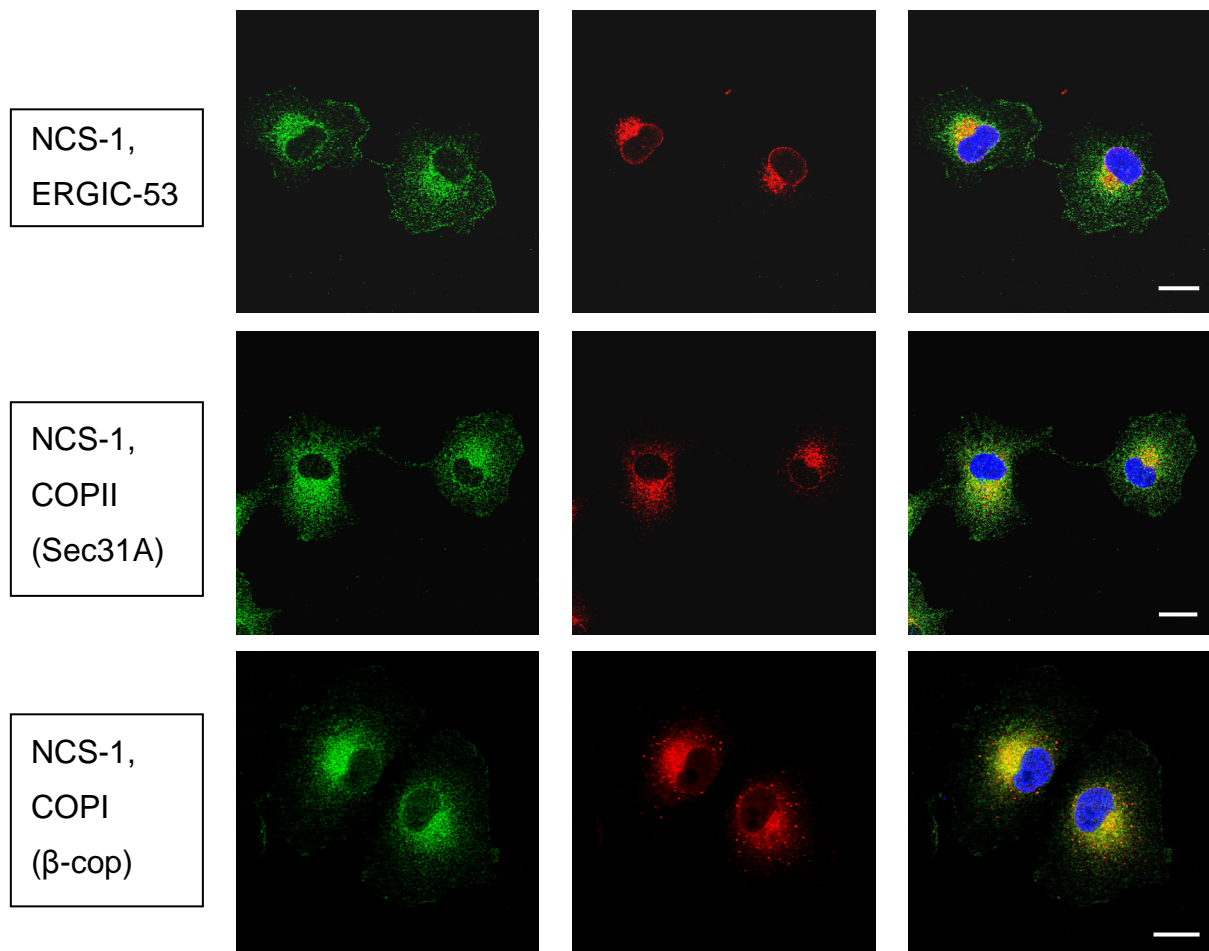
*mitte:* für das *cis*-Golgi Kompartiment (GM130 – 130 kDa Golgi Matrix Protein)

*unten:* für das *trans*-Golgi Kompartiment (TGN46 – 46 kDa *trans*-Golgi Netzwerk Protein)

*rechts:* Kompositbilder der Einzelaufnahmen, Maßstabsbalken – 20  $\mu\text{m}$

Neben der perinucleären Lokalisation war NCS-1 auch an einigen Bereichen der Zellmembran angereichert. Die Co-Färbungen von endogenem NCS-1 und subzellulären Markerproteinen für ER oder Golgi-Apparat zeigten zwar perinucleäre Überlappungen, die NCS-1-Verteilung war aber deutlich ausgedehnter als die der ER- oder Golgi-Marker.

Eine stärkere Überlappung der Immunfluoreszenzen wurde festgestellt für NCS-1 und Markerproteine, die an Komponenten des Transports zwischen ER und Golgi-Apparat lokalisiert sind (Abb. 4.22).



**Abb. 4.22, Immunfluoreszenz von endogenem NCS-1 und subzellulären Markerproteinen des vesikulären Transports zwischen ER und Golgi in COS-7 Zellen**

Immunfluoreszenz von NCS-1 (grün) und Marker-Protein (rot)

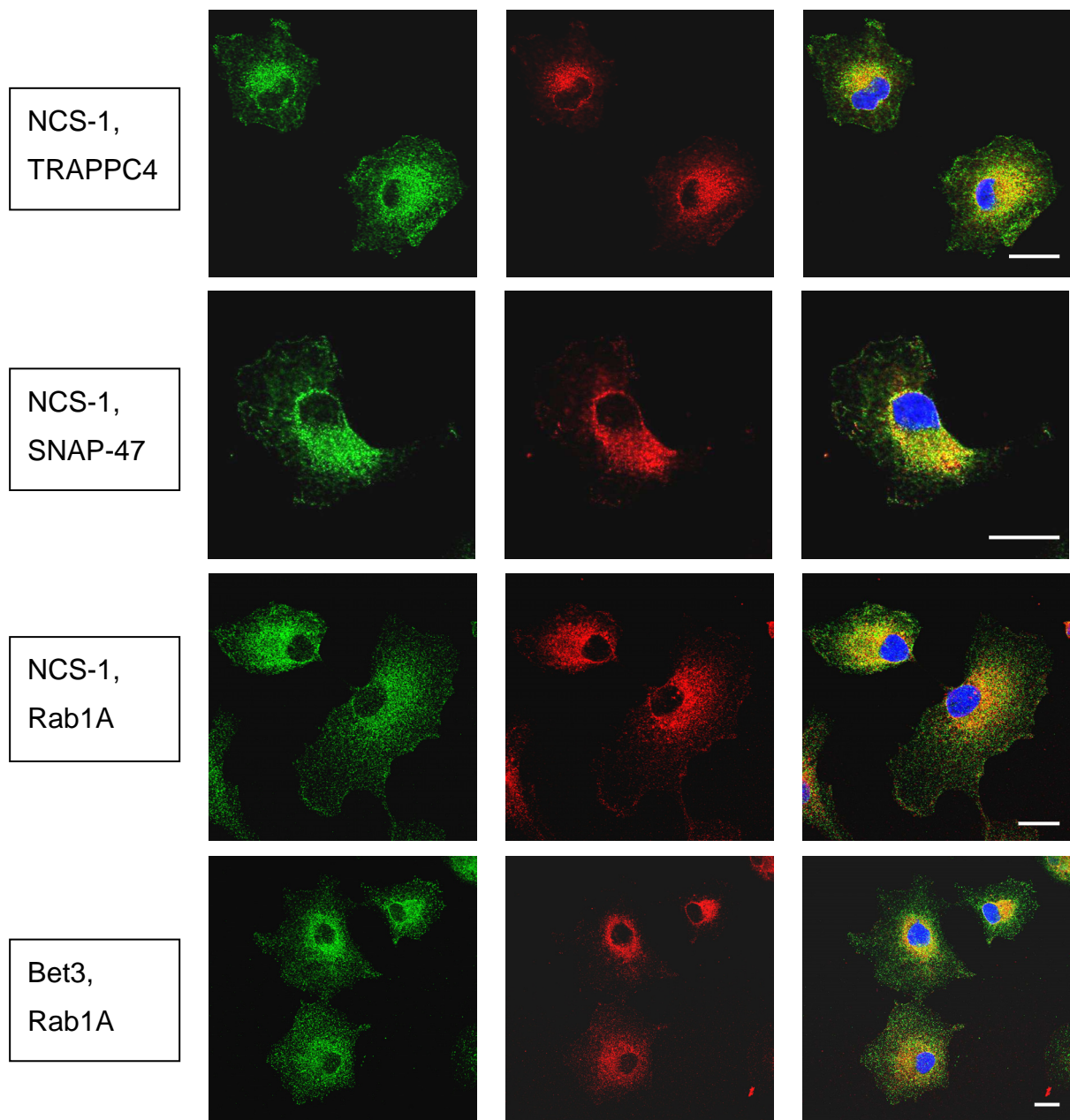
*oben:* für das endoplasmatische Reticulum-Golgi intermediäre Kompartiment (ERGIC-53 – 53 kDa *endoplasmic reticulum Golgi intermediate compartment protein*),

*mitte:* für COPII Vesikel (COPII Untereinheit Sec31A)

*unten:* für COPI Vesikel (COPI Untereinheit  $\beta$ -cop)

*rechts:* Kompositbilder der Einzelaufnahmen, Maßstabsbalken – 20  $\mu$ m

Mit dem COPI-Vesikelmarker  $\beta$ -cop wurde die stärkste NCS-1-Co-Lokalisation festgestellt. Aber auch das ER-Golgi intermediäre Kompartiment (ERGIC) – gezeigt durch ERGIC-53 Immunfluoreszenz – und der COPII-Vesikelmarker Sec31A waren mit NCS-1 co-lokalisiert. Die NCS-1-Lokalisation war allerdings auch hier ausgedehnter, als die der beiden letztgenannten Markerproteine. Der COPII-Vesikel-Coat ist weniger stabil als der COPI-Coat (Duden, 2003). Von COPII-Vesikeln abgeleitete Vesikel könnten, durch Dissoziation des Markerprotein Sec31A, der Detektion entgangen sein.



**Abb. 4.23, Immunfluoreszenz von endogenem NCS-1 und mutmaßlich NCS-1-bindenden Proteinen**

Immunfluoreszenz von NCS-1 (grün) und putativem Interaktionspartner (rot)

*oben:* Auf Grund von Inkompatibilität des Anti-Bet3- und des Anti-NCS-1-Antikörper wurde die TRAPP Untereinheit TRAPPC4 gefärbt.

*mitte oben:* SNAP-47

*mitte unten:* Rab1A

*unten:* Co-Färbung von Bet3 (grün) und Rab1A (rot)

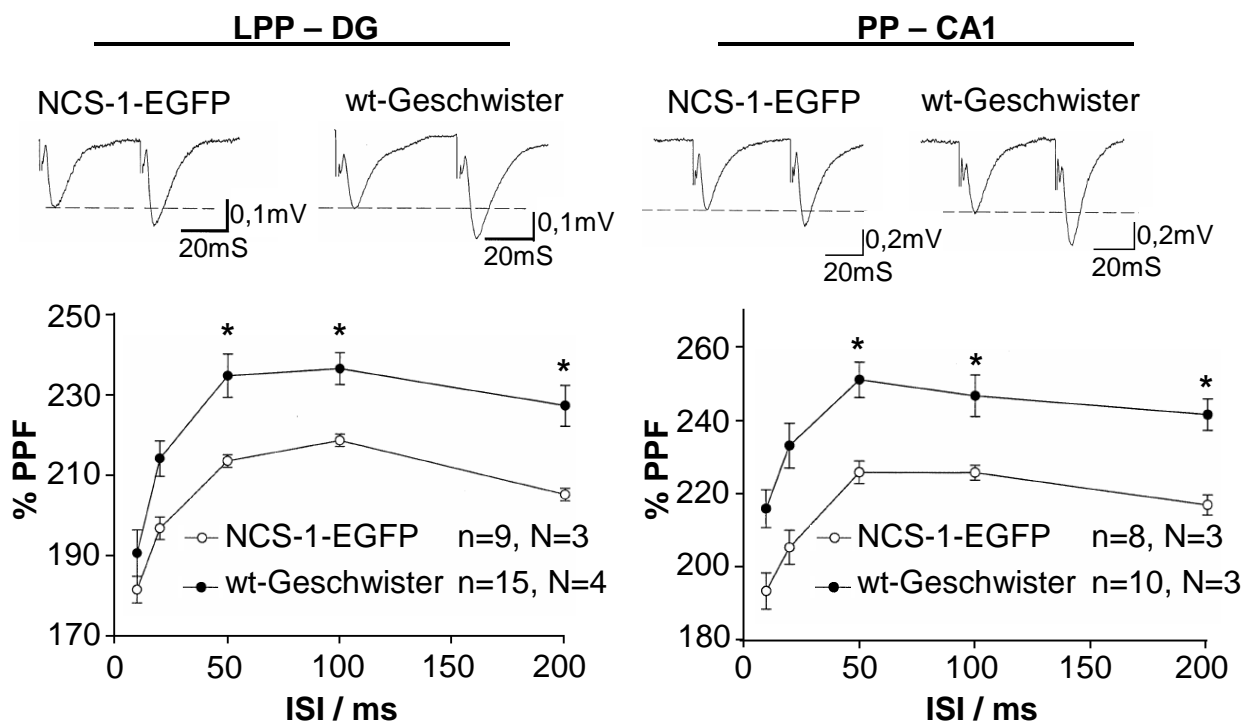
rechts: Kompositbilder der Einzelaufnahmen, Maßstabsbalken – 20 µm

Die Co-Lokalisation von NCS-1 mit identifizierten NCS-1-bindenden Proteinen konnte für SNAP-47 direkt untersucht werden. Abb. 4.23 zeigt die nahezu vollständige Co-Lokalisation der Immunfluoreszenzen von NCS-1 und SNAP-47. Die Co-Lokalisation mit der Untereinheit des TRAPP-Komplexes Bet3 (TRAPPC3) konnte aufgrund der Inkompatibilität der verfügbaren Antikörper, die beide aus Kaninchen stammten, nicht direkt untersucht werden. Es konnte aber für TRAPPC4, einer weiteren Untereinheit des TRAPP-Komplexes, die Co-Lokalisation mit NCS-1 gezeigt werden. Darüber hinaus wurde in voneinander unabhängigen Färbungen, sowohl für NCS-1, als auch für Bet3 die Co-Lokalisation mit dem kleinen G-Protein Rab1A festgestellt. So konnte indirekt gezeigt werden, dass NCS-1 und Bet3, da sie mit den gleichen Proteinen co-lokalisiert sind, auch miteinander co-lokalisiert sein müssen.

Die Immunfärbungen stehen im Einklang mit den Ergebnissen der Massenspektroskopie und den durch Co-Immunpräzipitation validierten Ergebnissen. Somit zeigt die intrazelluläre Co-Lokalisation von NCS-1 mit den biochemisch identifizierten Bindungspartnern Bet3 und SNAP-47, sowie mit Rab1A, die räumliche Möglichkeit einer physiologischen Funktion der Protein-Protein-Interaktion im Protein- und Membran-Transport.

## 4.9 Elektrophysiologische Charakterisierung der hippocampalen Kurzzeit-Plastizität

Die Überexpression von Frequenin, dem NCS-1-Ortholog in *D. melanogaster* in V7-Mutanten, führte zu Übererregbarkeit und veränderter Plastizität an der neuromuskulären Synapse (Pongs *et al.*, 1993). Eine veränderte Kurzzeit-Plastizität zeigte sich auch in der Doppelpuls-Fazilitierung in transient mit NCS-1 transfizierten, kultivierten Nagerneuronen (Sippy *et al.*, 2003). Die neu identifizierten NCS-1-Interaktionspartner (4.7), sowie die elektronenmikroskopisch festgestellte NCS-1-Lokalisation an, aber nicht in der postsynaptischen Verdichtung (4.5.3) stehen im Einklang mit der, von Jo *et al.* (2008) beschriebenen NCS-1-Funktion bei der Regulation des synaptischen Neurotransmitterrezeptor-Transports. Die mittels Doppelpuls-Stimulationsexperimenten gemessene Kurzzeit-Plastizität kann durch Modulation des Transports synaptischer Neurotransmitterrezeptoren reguliert werden (Heine *et al.*, 2008). Daher wurde in Gehirnschnitten transgener Mäuse der elektrophysiologische Phänotyp in den NCS-1-EGFP stark exprimierenden Regionen des Hippocampus untersucht. Dazu wurde die Doppelpuls-Fazilitierung analysiert. Exzitatorische postsynaptische Feldpotentiale wurden als Antwort auf präsynaptische Doppelpuls-Stimulierung exzitatorischer Bahnen im Hippocampus gemessen. Das inter-Stimulus-Intervall wurde im Bereich von 10 ms – 200 ms variiert (Abb. 4.24).



**Abb. 4.24, Doppelpuls-Fazilitierung an hippocampalen Synapsen des *Tractus perforans***

*Ober:* In akuten Gewebeschnitten wurden exzitatorische postsynaptische Feldpotentiale (fEPSP) extrazellulär im *Gyrus dentatus* (DG, links) oder in der CA1-Region (rechts) abgeleitet. Die fEPSP wurden durch extrazelluläre Stimulierung mit einer, im *Tractus perforans* platzierten, Reizelektrode ausgelöst. Dargestellt sind paarweise hervorgerufene fEPSP, als Antwort auf eine Doppelpuls-Stimulierung, mit einem 50 ms inter-Stimulus-Intervall.

*Unten:* Die Doppelpuls-Fazilitierung (PPF – *paired pulse facilitation*) wurde gemessen als das Verhältnis der initialen Steigungen der beiden fEPSP, die als Antwort auf den zweiten und den ersten Stimulus gemessen wurden. Die PPF ist für verschiedene inter-Stimulus-Intervalle (ISI) dargestellt. Die fEPSP wurden bei einer Stimulusstärke gemessen, die 50% des Schwellenwertes für das Auslösen eines postsynaptischen Aktionspotentials betrug. Bei Überlappung des ersten und des zweiten fEPSP (bei ISI < 50 ms) wurden, durch Einzelpuls-Stimulierung hervorgerufene, fEPSP von den beiden durch Doppelpuls-Stimulierung hervorgerufenen, ineinander übergehenden fEPSP subtrahiert.

LPP – lateraler *Tractus perforans*; PP – *Tractus perforans*; ISI – inter-Stimulus-Intervall; PPF – Doppelpuls-Fazilitierung; Fehlerbalken – Standardfehler des Mittelwertes; n = Anzahl der gemessenen Hirnschnitte; N = Anzahl der Mäuse; \* –  $p < 0,05$  (tTest)

Gehirnschnitte aus NCS-1-EGFP exprimierenden transgenen Mäusen zeigten im Hippocampus eine Synapsen-spezifische Veränderung der Kurzzeit-Plastizität. Im Gegensatz zu neuromuskulären Synapsen der *V7 D. melanogaster* Mutante zeigten Doppelpuls Experimente in den transgenen Mäusen keine Verstärkung, sondern je



## Ergebnisse

---

nach Synapse entweder keine Veränderung oder eine Abschwächung der Doppelpuls-Fazilitierung (PPF). Die PPF in den Schaffer-Kollateralen war normal (Daten nicht gezeigt). Eine signifikante PPF-Verringerung für ISI zwischen 50 und 200 ms wurde an Synapsen des *Tractus perforans* (PP) festgestellt (Abb. 4.24), und zwar sowohl in der CA1-Region des Hippocampus, als auch im *Gyrus dentatus*.

# 5 Diskussion

## 5.1 Einfluss der Myristylierbarkeit auf die NCS-1-Lokalisation

Fusionsproteine Neuronaler Calcium-Sensoren (NCS) mit GFP und seinen Derivaten (EGFP, EYFP, ECFP) zeigten in transfizierten Zellen eine ähnliche Lokalisation wie das entsprechende endogene Protein in untransfizierten Zellen (O'Callaghan *et al.*, 2002; Bourne *et al.*, 2001). Der Einfluss der N-Myristylierung auf die intrazelluläre Lokalisation verschiedener NCS-Proteine wurde durch Mutation der Myristylierungskonsensussequenz fluoreszierender Fusionsproteine untersucht (O'Callaghan und Burgoyne, 2003; Scalettar *et al.*, 2002). N-Myristylierung bezeichnet die kovalente Bindung von Myristinsäure an das N-terminale Glycin eukaryotischer Proteine. Es handelt sich um eine irreversible Modifikation, die co-translational, nach Abspaltung des Initiator-Methionins durch Methionin-Aminopeptidasen, stattfindet (Farazi *et al.*, 2001). Generell wird angenommen, dass die Mutation des Glycins in der Konsensussequenz für die Myristylierung diese verhindert und, dass das mutierte Protein ansonsten unbeeinflusst bleibt. Obwohl G2A-Mutationen von NCS-1 mehrfach als nicht myristyliert und nicht-myristylierbar bezeichnet wurden (O'Callaghan *et al.*, 2002; O'Callaghan und Burgoyne, 2004), wurde das experimentell noch nicht schlüssig bewiesen. Gezeigt wurde allerdings, dass NCS-1 in *E.coli* von co-transfizierter N-Myristyltransferase (NMT) myristyliert wird (McFerran *et al.*, 1999). Des Weiteren wurde festgestellt, dass für die N-Myristylierung durch NMT ein N-terminales Glycin absolut notwendig ist. Alle bekannten N-myristylierten Proteine enthalten ein Glycin am N-Terminus (Towler *et al.*, 1987; Nadolski und Linder, 2007). Mit exogen zugeführter, Tritium-markierter Myristinsäure konnte in der Hefe *S. cerevisiae*, vor genetischem *frq1Δ*-Hintergrund, nach Transfektion mit Plasmid-codiertem Frq1 oder Frq1(G2A), tatsächlich gezeigt werden, dass die G2A-Mutation die Myristylierung von Frq1 verhindert (Hendricks *et al.*, 1999). Da NCS-1 sein Ortholog Frq1 in der Hefe ersetzen kann (Strahl *et al.*, 2003), deutet dies darauf hin, dass auch in Säugern NCS-1 myristyliert wird und dies durch G2A-Mutation der Konsensussequenz unterdrückt wird.

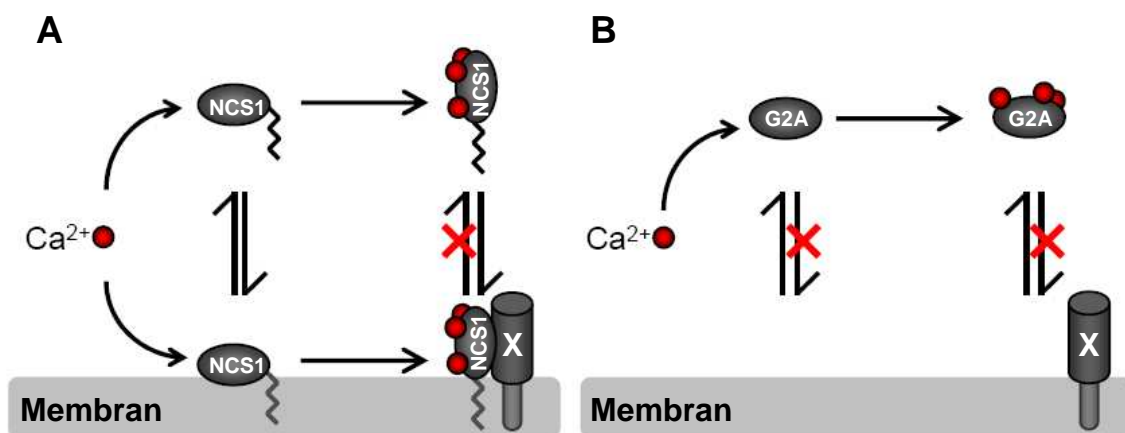
In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die G2A-Mutation der Konsensussequenz für die N-Myristylierung des NCS-1-EGFP-Fusions-Proteins die Membranlokalisation in stabil transfizierten HEK-Flp<sup>TM</sup> Zelllinien verringert (4.1.1), und dass die Myristylierbarkeit die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Membranassoziation von NCS-1-EGFP verstärkt (4.1.2). Neben der perinucleären Lokalisation wurde eine starke zellmembrannah Lokalisation von NCS-1-EGFP festgestellt. Sowohl die perinucleäre, als auch die zellmembrannah Lokalisation war abhängig von der Myristylierbarkeit des Proteins. Endogenes NCS-1 war in HEK-Zellen, wie in COS-7 Zellen (siehe auch Bourne *et al.*, 2001) vor allem perinucleär lokalisiert. Die Lokalisation an der Plasmamembran war weniger stark und auf kleinere Bereiche der Zellmembran beschränkt. Fluoreszierende NCS-1-Fusionsproteine lokalisierten in anderen Zellsystemen ebenfalls stärker perinucleär als zellmembrannah (Grafelmann, 2004; O'Callaghan *et al.*, 2002; Scalettar *et al.*, 2002). Es ließ sich nur die membrannah, nicht jedoch die perinucleäre Lokalisation gegenüber der gesamten intrazellulären Lokalisation quantifizieren. Qualitativ war eine Abhängigkeit von der Myristylierbarkeit sowohl für die zellmembrannah, als auch für die perinucleäre Lokalisation von NCS-1-EGFP offensichtlich (Abb. 4.1 – 4.3). Da Veränderungen der zellmembrannahen Lokalisation mit Veränderungen der perinucleären Lokalisation korrelierten, wurde angenommen, dass die relative Änderung der zellmembrannahen Lokalisation auch ein Maß für Änderungen der perinucleären Lokalisation, bzw. für die Lokalisation an zellulären Membranen insgesamt ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen im Einklang mit der Annahme, dass die Myristylierung zum einen als Lipidanker die Membranaffinität erhöht, darüber hinaus allerdings, als allosterischer Effektor (Ames *et al.*, 2000), durch Erhöhung der Kooperativität und der Affinität der Ca<sup>2+</sup>-Bindung (Jeromin *et al.*, 2004), die Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität der Membranassoziation verstärkt.

NCS-1 wurde in der Literatur sowohl als Ca<sup>2+</sup>-Myristyl-Schalter-Protein (*calcium-myristoyl-switch*) (Fik-Rymarkiewicz *et al.*, 2006) als auch als ein myristyliertes Ca<sup>2+</sup>-bindendes Protein, das keinen Ca<sup>2+</sup>-Myristyl-Schalter besitzt (O'Callaghan und Burgoyne, 2004) beschrieben. Tatsächlich ist die Definition eines Ca<sup>2+</sup>-Myristyl-Schalters eine strukturelle und wurde ursprünglich für das neuronale Calcium-Sensor-Protein Recoverin beschrieben (Ames *et al.*, 1997). Dieses schließt im Ca<sup>2+</sup>-freien Zustand die Myristinsäure in den hydrophoben Kernbereich des Proteins ein. Nach Ca<sup>2+</sup>-Bindung kommt es zu einer strukturellen Veränderung des Proteins, so

dass die Myristinsäure nicht mehr innerhalb einer hydrophoben Tasche gebunden werden kann und Solvens-exponiert wird. Daraufhin erhöht sich die Membranaffinität von Recoverin und es bindet, unterstützt durch den Myristin-Anker, an zelluläre Membranen. Für Recoverin wurde dieser Mechanismus durch umfangreiche strukturelle Analysen aufgeklärt. Dazu gehörten die Kristallstrukturen  $\text{Ca}^{2+}$ -freien (PDB 2D8N) und ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion gebundenen nicht-myristylierten Recoverins (Flaherty *et al.*, 1993), sowie die NMR-Strukturen des zwei  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen gebundenen nicht-myristylierten Proteins (Ames *et al.*, 2006) und der drei entsprechenden Zustände mit unterschiedlich vielen gebundenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen des myristylierten Proteins (Tanaka *et al.*, 1995; Ames *et al.*, 2002; Ames *et al.*, 1997). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Verstärkung der Membranaffinität von NCS-1 geht nicht mit den Konformationsänderungen eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Myristyl-Schalter Proteins einher (O'Callaghan und Burgoyne, 2004). Für Hefe-Frq1 zeigten NMR-Experimente, dass sich die Umgebung der Myristingruppe, auch ohne Detergenzien, nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung nicht veränderte (Ames *et al.*, 2000) und dass die Myristingruppe  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig der wässrigen Umgebung exponiert war. Sowohl myristyliertes, als auch nicht myristyliertes rekombinantes NCS-1 bindet  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig an hydrophobe Interaktionschromatographie-Matrix (z.B. Phenyl-Sepharose) und kann unter  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen – z.B. mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator EGTA – eluiert werden (Fisher *et al.*, 2000). Dieses, für die Mitglieder der NCS-Familie typische Verhalten, kann nicht durch einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Myristylschalter vermittelt sein und zeigt, dass auch im nicht-myristylierten Protein die Hydrophobizität durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung erhöht wird.

In ausschließlich auf Grund von Lipid-Modifikationen membranassoziierten Proteinen der ras-Familie wird die transiente Membranassoziation durch die Kombination reversibler Palmitoylierung und stabiler Geranylierung reguliert (Brunsveld *et al.*, 2009). Mit diesem *kinetic trapping model* (Nadolski und Linder, 2007) steht die Hypothese im Einklang, dass sich NCS-1, wie andere einfach acylierte Proteine, in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen membranassoziierter und cytoplasmatischer Lokalisation befindet und nur zusammen mit einem zweiten Membranbindungssignal stabil an Membranen assoziiert. Im Rahmen dieses *two signal model* (Resh, 1999) wurden als mögliches zweites Signal Cluster basischer Aminosäuren, die mit Phospholipid-Kopfgruppen der inneren Zellmembran interagieren (Thelen *et al.*, 1991; Senin *et al.*, 2007), sowie zusätzliche Acylierungen (Shahinian und Silvius, 1995; Rocks *et al.*, 2005) oder Protein-Protein Interaktionen

mit Membranproteinen (Baran *et al.*, 2007) beschrieben. NCS-1 enthält keine Cluster basischer Aminosäuren und keine bekannten Protease-Zielsequenzen. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Verstärkung hydrophober Interaktionen des nicht myristylierten rekombinanten NCS-1-Proteins führt zusammengenommen mit der Myristylierungs-abhängigen,  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Membranassoziation zu der Hypothese, dass für NCS-1 ebenfalls zwei Komponenten für eine stabile Membranassoziation notwendig sind, und dass das erste Signal die stabile Myristylierung ist, das zweite allerdings eine durch transiente  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung Myristylierungs-unabhängig verstärkte Interaktion mit einem weiteren Membranprotein.



**Abb. 5.1, Zwei-Signal-Modell der Membranassoziation von NCS-1**

**A:** N-myristyliertes NCS-1 befindet sich im dynamischen Gleichgewicht zwischen membranassoziiertem und cytoplasmatischem Zustand. Die N-myristylierung ist ein Signal für eine stabile Membranassoziation.  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung an NCS-1 induziert eine Konformationsänderung, die die Affinität zu NCS-1-bindenden Membranproteinen erhöht. Diese  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Bindung an membranassoziierte Bindungspartner stabilisiert, als zweites Signal, N-myristyliertes,  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenes NCS-1 an der Membran.

**B:** Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung nicht-myristylierten NCS-1(G2A)-Proteins führt zu keiner Verstärkung der Membranassoziation.

X bezeichnet ein hypothetisches Membranprotein, das  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenes, myristyliertes, membranassoziiertes NCS-1 bindet. G2A bezeichnet nicht-myristylierbares NCS-1(G2A)-Protein.

Vor allem die Zelltyp-unabhängig beobachtete  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige perinucleäre Lokalisation von NCS-1 (s. auch O'Callaghan *et al.*, 2002) weist auf eine Funktion beim vesikulären Transport zwischen intrazellulären Kompartimenten hin. Dieses entspricht der für die Hefe beschriebenen Funktion des NCS-1-Orthologs Frq1 und dessen Zielprotein Pik1 beim Transport sekretorischer Vesikel am Golgi-Apparat. Die

NCS-1-Lokalisation und die Abhängigkeit der Lokalisation von Myristylierung und  $\text{Ca}^{2+}$  sind zwischen Frq1 und NCS-1 also konserviert. Eine mögliche funktionelle Konservierung wurde in transgenen und Wildtyp-Mäusen untersucht.

## 5.2 NCS-1-EGFP Expression in transgenen Mäusen

NCS-1-GFP-Fusionsproteine wurden in mehreren Arbeitsgruppen zur Untersuchung möglicher zellulärer NCS-1-Funktionen eingesetzt. So konnte z.B. NCS-1-RNA-Interferenz (RNAi) mit siRNA in PC12-Zellen die, gleichermaßen durch Überexpression des NCS-1-interagierenden Proteins IL1RAPL1 oder des NCS-1-EYFP-Fusionsproteins hervorgerufene, Reduktion des N-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms aufheben (Gambino *et al.*, 2007). In einem eleganten Kontrollexperiment zeigten Jo *et al.* (2008), dass, durch veränderte Codon-Nutzung NCS-1-siRNA-resistentes NCS-1\*-EGFP die, durch NCS-1-siRNA ausgeschaltete, von metabotropen Glutamatrezeptoren vermittelte Langzeitdepression (mGluR-LTD) wieder herstellte, wenn die entsprechende cDNA mit dem RNAi-Konstrukt co-transfiziert wurde. Auch die durch NCS-1 vermittelte D2-Dopamin-Rezeptor-Desensitivierung wurde mit NCS-1-EGFP-Fusionsprotein gezeigt (Kabbani *et al.*, 2002).

Bei der Erzeugung transgener Mäuse erfolgt die genomische Integration des Transgens, anders als bei der Erzeugung von Nullmutationen bzw. Gendeletionen nicht durch homologe Rekombination (Cho *et al.*, 2009). Der Integrationslokus ist nicht vorhersehbar. Um den Einfluss möglicher Positionseffekte des Integrationslokusses im Genom, auf die weiteren Untersuchungen zu minimieren, wurden zwei unabhängige transgene Linien erzeugt, die sich phänotypisch nicht unterschieden.

Als physiologische Kontrolltiere dienten tgCaMKII $\alpha$ -tTA-Mäuse (Mayford *et al.*, 1996), die zwar das tTA-Transgen exprimierten, jedoch kein NCS-1-EGFP-Transgen trugen. Diese Kontrolltiere gingen wie die doppelt-transgenen tgCaMKII $\alpha$ -NCS1-E Mäuse ebenfalls aus Verpaarungen der einfach-transgenen Promotor- und Antwort-Linien tgCaMKII $\alpha$ -tTA und tgTRE-NCS1-E hervor und hatten daher einen vergleichbaren genetischen Hintergrund wie ihre doppelt-transgenen Geschwister. Für die biochemische Identifikation NCS-1-EGFP-bindender Proteine dienten sowohl Wildtyp-Tiere als auch transgene tgCaMKII $\alpha$ -G9 Mäuse, die EGFP exprimierten als Kontrolle (Krestel *et al.*, 2001). Da diese transgenen Tiere jedoch einen, durch Co-

Expression der beiden Reportergene EGFP und  $\beta$ -Galactosidase verursachten, neuropathologischen Phänotyp aufwiesen (Krestel *et al.*, 2004), wurden sie nicht als Kontrolltiere für physiologische Experimente eingesetzt.

### 5.3 Protein-Protein-Interaktionen von NCS-1-EGFP und NCS-1

Die Funktionalität von NCS-1-EGFP wurde bezüglich verschiedener NCS-1-Funktionen gezeigt (Gambino *et al.*, 2007; Jo *et al.*, 2008; Kabbani *et al.*, 2002). Demnach wird die NCS-1-Funktionalität durch die EGFP-Markierung nicht gestört. Die mikroskopische Analyse zeigte die Expression transgenen NCS-1-EGFP-Fusionsproteins in Hirnregionen in denen auch endogenes NCS-1 exprimiert wurde (4.3, 4.5). Die subzelluläre Lokalisation von NCS-1-EGFP überlappte mit der von endogenem NCS-1 (4.5). Transgenes NCS-1-EGFP war demnach an der richtigen Stelle lokalisiert, um *in vivo* Interaktionen mit physiologischen NCS-1-Bindungspartnern auszubilden. Vorangegangene Ansätze zur Identifizierung von NCS-1-Interaktionspartnern lieferten keine eindeutigen Ergebnisse und in der Literatur sind erstaunlich viele NCS-1-Funktionen beschrieben (Stockebrand und Pongs, 2006). Calmodulin ist ein Beispiel eines  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden EF-Hand-Proteins, das mit einer Vielzahl von Zielproteinen interagiert und vielfältige zellbiologische Prozesse und Signalwege reguliert (O'Day, 2003). Für NCS-1 jedoch ist nicht klar, wie vielfältig die physiologisch relevanten Interaktionen sind. In dem Bestreben zwar nicht möglichst viele, aber nach Möglichkeit physiologisch relevante NCS-1-Interaktionspartner zu finden, wurde die Suche von vornherein auf einen begrenzten Teil des Proteoms beschränkt. Deshalb wurde in dieser Arbeit nur die lösliche Fraktion (S2) von Hirnlysate eingesetzt, so dass mit der angewandten Methode zwar lösliche Proteine, wie z.B. der beschriebene NCS-1-Interaktionspartner PICK1 (Jo *et al.*, 2008), jedoch keine integralen Membranproteine, wie z.B. die beschriebenen NCS-1-Interaktionspartner IL1RAPL1 (Bahi *et al.*, 2003), D2R (Kabbani *et al.*, 2002) oder Ionenkanäle (Nakamura *et al.*, 2001; Boehmerle *et al.*, 2006), identifiziert werden konnten. Der gewählte Ansatz schloss nicht aus, dass NCS-1-Fusionsprotein *in vivo* oder während der anschließenden Lyse unspezifische Bindungen einging. Die Western-Blot Analysen der Gelchromatographie (Abb. 4.15) zeigten, dass stabile NCS-1-Interaktionen zu großen, NCS-1 enthaltenden Komplexen (> 200 kDa) führten

(4.6.1). Nach der gelchromatographischen Präfraktionierung wurden die in hochmolekularen Komplexen vorliegenden NCS-1-EGFP-bindenden Proteine immunpräzipitiert.

Bei den durchgeführten Immunpräzipitationen wurden mit den durchgeführten Kontrollen zwei mögliche Fehlerquellen berücksichtigt. Zum einen konnten die eingesetzten Anti-GFP-Antikörper unspezifische Wechselwirkungen mit anderen Proteinen eingehen; zum anderen bestand die Möglichkeit, dass EGFP selbst mit Proteinen Komplexe eingeht, die mit anti-GFP-Antikörpern präzipitiert wurden.

Nach der Gelelektrophorese des Immunpräzipitats wurden fünf Coomassie-gefärbte Banden identifiziert, die in Kontrollexperimenten nicht vorkamen (4.6.2), was auf mögliche Interaktionspartner hindeutete. Die in den distinkten, Coomassie-gefärbten Banden im Polyacrylamidgel auftretenden Proteine wurden durch LC-MS/MS analysiert. Unter diesen Banden waren drei auffallend stark. Die elektrophoretischen Mobilitäten dieser drei Hauptbanden entsprachen Molekulargewichten von etwa 20, 45 und 55 kDa. Auf Grund der scharfen Färbung wurde erwartet, dass jede dieser Banden ein Hauptprotein oder wenige Hauptproteine enthielt, durch das oder die der Großteil des Proteins der jeweiligen Bande ausgemacht wurde. Die massenspektroskopische Analyse lieferte allerdings zunächst kein eindeutiges Ergebnis (119 Proteine, die nicht in Gelfragmenten aus dem Kontrollexperiment auftraten, s. Anhang).

Die nano-LC-MS/MS Analyse ist weit sensitiver als die Coomassie-Färbung. Bei der nano-LC-MS/MS-Analyse erfolgte die Ionisation der Peptide durch Elektrospray-Ionisation (ESI) (Smith, 2006). Die für die Analyse in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Methode mit einem Hybridgerät aus linearer und Orbitrap Ionenfalle (*LITQ-Orbitrap*) zeichnet sich durch eine hohe Massengenauigkeit (im ppm Bereich, Olsen *et al.*, 2005), hohe Auflösung (60000 bzw. 15000; ebd.) und eine hohe Sensitivität aus, so dass mit kleinen Volumen (im nl Bereich) fmol-Mengen Peptid detektiert werden können (Lee *et al.*, 2000, Gatlin *et al.*, 1998). Mit Flussraten < 200 nl/min können aus 10 µl eluierter, im Gel tryptisch hydrolysierter Protein-Bande hunderte Spektren erfasst und entsprechend viele Peptide pro Lauf identifiziert werden. Mit kolloidaler Coomassie-Färbung können Proteinmengen im Bereich bis 100 ng detektiert werden, was für ein 50 kDa Protein bedeutet, dass die Detektionsgrenze etwa bei 2 pmol liegt. Daher konnten auch aus ungefärbten Gelbereichen des Kontrollgels ebenso viele Peptide identifiziert werden, wie aus den



Coomassie-gefärbten Banden. Tatsächlich wurden zwischen 317 und 458 Peptide in jeder der drei Hauptbanden identifiziert und zwar auch in den entsprechenden Gelbereichen des Kontrollexperiments. Die Intensitäten der Peaks einzelner Ionen können trotz gleicher Menge der Peptide in der ursprünglichen Probe um mehrere Größenordnungen schwanken (Carr und Annan, 2000). Deshalb liefert diese Form der Analyse *per se* keine quantitativen Informationen über die Zusammensetzung des Ausgangsmaterials (Krüger und Mann, 2006). Es erfolgte eine automatische datenabhängige Erfassung der Fragmentspektren der jeweils fünf bis acht intensivsten Peptidpeaks (*automatic data dependent acquisition*) (Zhang *et al.*, 2006; Zougman *et al.*, 2008). Da ein Zyklus vom Erfassen des primären *full-scan* Massenspektrums des kontinuierlich injizierten LC-Eluats, über die Selektion und Fragmentierung der fünf intensivsten Ionen (bzw. *m/z*-Peaks) bis zum Erfassen der entsprechenden Fragmentmassenspektren etwa 5 s dauerte (Olsen *et al.*, 2005), wurde bei gleicher Elutionsdauer der nano-LC auch eine vergleichbare Anzahl an Peptiden identifiziert. Nachdem die nano-LC-ESI-MS/MS Analyse 37, 30, bzw. 22 Proteine in den drei Hauptbanden identifiziert hatte, die nicht im Kontrollexperiment vorkamen, wurde ein einheitliches Auswahlverfahren (4.6.3) für die Ermittlung der Hauptproteine in den jeweiligen Banden erstellt.

Von den acht, als potentiell NCS-1-bindend klassifizierten Proteinen – Rab1A, p21-ARC, Bet3, ARP1, BASP1, SNAP-47, FLAP1 und Phar1 (4.6.3) – konnte in unabhängigen Co-IP-Experimenten nur für Bet3 und SNAP-47 die spezifische NCS-1-EGFP-Bindung validiert werden, wobei für beide NCS-1-EGFP-Bindungen eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit festgestellt wurde (4.6.4). Anschließend wurde auch für endogenes NCS-1-Protein aus Wildtyp-Mäusen die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Bindung beider Proteine gezeigt (4.7). Diese NCS-1-Interaktionen sind neu und wurden hier erstmalig beschrieben. SNAP-47 konnte mit Anti-SNAP-47-Antikörpern immunpräzipitiert werden. Dabei wurden weder NCS-1 noch Bet3 co-präzipitiert. Es gelang allerdings nicht, auch nicht nach Erhöhung der Antikörperkonzentration, SNAP-47 vollständig aus dem eingesetzten Lysat zu präzipitieren. Weshalb sich ein Teil des SNAP-47-Proteins nicht präzipitieren ließ, blieb unklar. Somit konnte die SNAP-47-NCS-1-Interaktion zwar nicht auf diese Weise ("Gegen Co-IP von Antigen 1 durch Antikörper gegen Antigen 2") durch ein unabhängiges Experiment bestätigt werden, allerdings wurden sowohl SNAP-47, als auch Bet3 in unabhängigen

Experimenten mit zwei verschiedenen Antikörpern gegen unterschiedliche Epitope (Anti-NCS-1 und Anti-GFP) mit NCS-1 bzw. mit NCS-1-EGFP co-präzipitiert.

Rab1A, BASP1 und Phar1 konnten nicht weiter untersucht werden, da keine entsprechenden Antikörper erhalten werden konnten. ARP1 und FLAP1 wurden in Validierungsexperimenten auch im Kontroll-Immunpräzipitat identifiziert und somit unspezifisch co-präzipitiert. Die Untereinheiten des ARP2/3-Komplexes (p21-ARC oder ARP3B) konnten zwar im Hirnlysate, nicht jedoch im Präzipitat detektiert werden, so dass die NCS-1-Interaktionen dieser Proteine nicht verifiziert wurden. In Übereinstimmung mit der massenspektroskopischen Identifizierung von Proteinen, die die Aktincytoskelettorganisation regulieren (FLAP1, Phar1, ARP2/3-Komplex) als mutmaßliche NCS-1-Interaktionspartner, weist die verstärkte Bläschenbildung NCS-1-EGFP-exprimierender HEK-Zellen (4.1.1) auf eine veränderte Aktincytoskelettorganisation hin. Die physiologische Relevanz dieses Überexpressionsphänotyps bleibt allerdings fraglich. Möglicherweise handelte es sich bei der verstärkten Bläschenbildung um einen *off-target*-Effekt, der auf Grund der starken NCS-1-EGFP Expression auftrat.

Es wurden keine bereits bekannten NCS-1-Interaktionen identifiziert. In publizierten affinitätschromatographischen Experimenten mit GST-NCS-1-Fusionsprotein und Rinderhirncytosol als Ausgangsmaterial wurden die kleine GTPase Arf1, Calcium/Calmodulin-abhängige cyclo-Nucleotid-3',5'-Phosphodiesterase (CaM-PDE), Adaptin-Untereinheiten der AP1- und AP2-Clathrinadapterkomplexe, sowie das Ca<sup>2+</sup>-abhängige Aktivator Protein für die Sekretion (CAPS1), der TGFβ-Rezeptor (TGFβR) und die vacuoläre H<sup>+</sup> ATPase (V-ATPase) als NCS-1-bindende Proteine identifiziert (Haynes *et al.*, 2006). In den Experimenten wurde an Glutathion-Sepharose immobilisiertes Glutathion-S-Transferase-NCS-1-Fusionsprotein (GST-NCS-1) verwendet und mit homogenisiertem Rinderhirncytosol inkubiert, so dass sämtliche cytosolischen Rinderhirn-Proteine gleichermaßen physischen Kontakt zu dem NCS-1-Fusionsprotein ausbilden konnten und auch unspezifische Bindungen an freiem immobilisiertem NCS-1-Fusionsprotein angereichert werden konnten. Als Kontrolle diente dabei immobilisiertes GST-Protein.

In der vorliegenden Arbeit wurden die, als spezifisch mit NCS-1 interagierend beschriebenen Untereinheiten der AP1- und AP2-Clathrinadapterkomplexe oder der V-ATPase im Immunpräzipitat der Kontrollexperimente identifiziert, so dass diese unter den hier vorliegenden experimentellen Bedingungen unspezifisch co-

präzipitierten und nicht als spezifisch NCS-1-bindend klassifiziert wurden. Außerdem wurde zwar eine cyclo-Nucleotid-Phosphodiesterase mit NCS-1-EGFP co-präzipitiert, allerdings handelte es sich dabei nicht um CaM-PDE, sondern um CNP1, eine 2',3'-cyclo-Nucleotid-3'-Phosphodiesterase, die anders als NCS-1 nicht in Neuronen, sondern in Oligodendrozyten exprimiert wird (Vogel und Thompson, 1988; Lappe-Siefke *et al.*, 2003) und dementsprechend kein physiologisches Zielprotein von NCS-1 ist, welches nicht in Oligodendrozyten exprimiert wird (Olafsson *et al.*, 1997).

In vorangegangenen Hefe-zwei-Hybrid-Experimenten wurden die MAP-Kinase-Kinase-Kinasen MLK1 und MLK2 als NCS-1-Bindungspartner identifiziert (Dannenberg, 2000). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zwar das MLK1 ähnliche Protein MLKL1 spezifisch in dem Immunpräzipitat NCS-1-EGFP-exprimierender Mäuse identifiziert, allerdings mit sehr geringer Sequenzabdeckung (2,5% bei über 25% für die Hauptproteine). Die bereits affinitätschromatographisch identifizierten mutmaßlichen NCS-1-Interaktionspartner Tubulin und Aktin (Hauenschild, 1997) wurden, mit hoher Sequenzabdeckung auch in den Kontrollexperimenten identifiziert, so dass auch sie nicht als spezifisch NCS-1-bindend klassifiziert wurden.

### 5.4 Modell der NCS-1-Funktion im vesikulären Transport

Die Identifikation der spezifisch NCS-1-bindenden Proteine Bet3 und SNAP-47 (4.7) weist auf eine NCS-1-Funktion beim vesikulären Transport hin, ebenso das massenspektroskopisch als NCS-1-EGFP-bindend identifizierte Protein Rab1A (4.6.3). Für diese drei Proteine wurde entweder direkt oder indirekt die perinucleäre Co-Lokalisation mit NCS-1 in COS-7 Zellen gezeigt (4.8). Bei dem frühen sekretorischen Transport zwischen dem endoplasmatischen Reticulum (ER) und dem Golgi-Apparat wirkt Rab1 nach (*downstream* von) der Bet3-Untereinheit des TRAPP-Komplexes (Loh *et al.*, 2005).

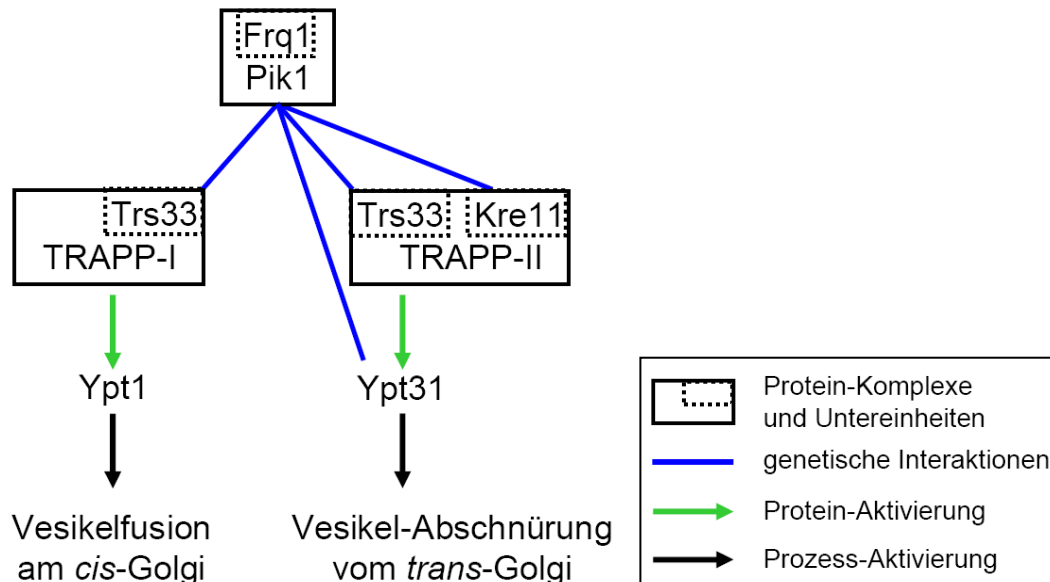
Analog zu der Funktion von Frq1 in der Hefe *S. cerevisiae* (Hendricks *et al.*, 1999) und dessen einzigen essentiellen Zielprotein Pik1 (Audhya *et al.*, 2000; Hama *et al.*, 1999; Walch-Solimena und Novick, 1999; Sciorra *et al.*, 2005) wurde für NCS-1 bereits eine Rolle beim anterograden vesikulären Export vom *trans*-Golgi-Netzwerk beschrieben (Haynes *et al.*, 2005), wobei NCS-1 durch Ca<sup>2+</sup>-abhängige, direkte Interaktion mit der kleinen GTPase Arf1 die Aktivität und Rekrutierung (Godi *et al.*,

1999) der Phosphatidylinositolphosphat 4-Kinase (PI4K) PI4K $\beta$  reguliert. Phosphatidylinositol-4-Phosphat (PI4P), das Reaktionsprodukt der PI4K, wirkt als Anheftungspunkt für den Clathrinadapterkomplex AP1 (Wang *et al.*, 2003). AP1 initiiert die Bildung Clathrin-umhüllter Transportvesikel und deren Abschnürung vom trans-Golgi (Robinson, 2004) (Abb. 5.3).

Bevor in der vorliegenden Arbeit die Bet3-Untereinheit des TRAPP-Komplexes als NCS-1-Interaktionspartner in der Maus identifiziert wurde, war interessanter Weise bereits in *S. cerevisiae* die synthetische Letalität – also die genetische Interaktion – von *PIK1*-Mutationen und Deletionen von *KRE11* oder *TRS33*, zwei Genen nicht-essentieller Untereinheiten des TRAPP-Komplexes, bekannt (Sciorra *et al.*, 2005). In *S. cerevisiae* kommen zwei TRAPP-Komplexe vor, TRAPP-I und TRAPP-II, die auf Grund ihrer Größe voneinander unterschieden werden können (Sacher *et al.*, 2001). Trs33 ist in der Hefe in beiden TRAPP-Komplexen enthalten und orthologe TRAPPC6-Proteine sind in Säuger-TRAPP-Komplexen konserviert (Kümmel *et al.*, 2008). Kre11 ist eine Untereinheit des TRAPP-II-Komplexes, für die keine Orthologen in Vertebraten bekannt sind (Cox *et al.*, 2007; Sacher *et al.*, 2008). Die Funktionen der TRAPP-Komplexe der Hefe sind weitgehend charakterisiert worden. Beide fungieren als Anheftungsfaktoren (*tethering factor*), die Transport-Vesikel an deren Zielmembranen anheften, bevor (*upstream* von) SNARE-Proteine die Membranfusion vermitteln (Kümmel und Heinemann, 2008). TRAPP-I, mit einem apparentem Molekulargewicht von etwa 300 kDa, ist am *cis*-Golgi lokalisiert und dort ein Anheftungsfaktor für COPII-umhüllte Vesikel, die aus dem ER hervorgegangen sind (Sacher *et al.*, 2001). Nach der Anheftung von COPII-Vesikeln an *cis*-Golgi-Membranen durch direkte Bindung von COPII-Untereinheiten an TRAPP-I (Cai *et al.*, 2007), aktiviert TRAPP-I als Guaninnucleotid-Austauschfaktor (GEF – *guanine nucleotide exchange factor*) das Rab1-Ortholog Ypt1 (Wang *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2000). Daraufhin katalysiert ein SNARE-Komplex aus Sed5, Bos1, Sec22 und Bet1 (Parlati *et al.*, 2000) die Membranfusion (Miller, 2007).

TRAPP-II, weist ein apparentes Molekulargewicht von etwa 1000 kDa auf und enthält zusätzlich zu den sieben TRAPP-I-Untereinheiten noch drei weitere, TRAPP-II-spezifische Untereinheiten (Cox *et al.*, 2007) und besitzt, wie TRAPP-I, GEF-Aktivität. Allerdings resultieren die drei zusätzlichen Untereinheiten in einer veränderten Spezifität, so dass TRAPP-II GEF-Aktivität für die Rab11-Orthologen Ypt31/Ypt32 besitzt (Morozova *et al.*, 2006). Der TRAPP-II-Komplex ist am *trans*-Golgi lokalisiert

wo er am anterograden (Morozova *et al.*, 2006) oder retrograden (Kümmel und Heinemann, 2008) Vesikeltransport beteiligt ist. Abb. 5.2 zeigt eine Übersicht über Frq1 und Pik1 beim Vesikeltransport am Golgi.



**Abb. 5.2, Frq1 und Pik1 beim Vesikeltransport am Golgi-Apparat der Hefe**

Frq1 ist eine regulatorische Untereinheit der PI 4-Kinase Pik1. Genetische Interaktionen des PIK1-Gens mit den Genen der TRAPP-Komplex-Untereinheiten Trs33 (TRAPP-I und TRAPP-II) und Kre11 (TRAPP-II), sowie mit dem Gen der Rab-GTPase Ypt31 sind durch blaue Linien gezeigt. TRAPP-I aktiviert das Rab1-Ortholog Ypt1, woraufhin es zur Vesikelfusion am *cis*-Golgi kommt. TRAPP-II aktiviert Ypt31 und ermöglicht dadurch die Vesikel-Abschnürung vom *trans*-Golgi.

Die genetischen Interaktionen von PIK1 (Sciorra *et al.*, 2005) weisen auf mögliche Funktionen von Frq1 in der Hefe, bei dem Vesikeltransport zum Golgi hin (über TRAPP-I) und vom Golgi weg (über TRAPP-II), hin.

Die Situation in Säugerzellen ist weniger klar als in der Hefe. Anhand der Größe konnte in Säugerzellen nur ein TRAPP-Komplex, mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 700 kDa, identifiziert werden (Sacher und Ferro-Novick, 2001; Loh *et al.*, 2005). Es wurden allerdings verschiedene TRAPP-Isokomplexe identifiziert, die unterschiedliche TRAPPC6-Paraloge (TRAPPC6-A1, TRAPPC6-A2, TRAPPC6-B) enthielten (Kümmel *et al.*, 2008). Möglicherweise werden in Säugern auf diese Weise unterschiedliche Spezifitäten für bestimmte Transportwege erreicht. Bisher konnte keine GEF-Aktivität von Säuger-TRAPP gezeigt werden (Sacher *et al.*, 2008), obwohl auf Grund der strukturellen Konservierung von Ypt1 und Rab1

einerseits (Cai *et al.*, 2008) sowie der, aus mehreren Untereinheiten konstituierten, Ypt1-Interaktionsfläche im TRAPP-Komplex (Kim *et al.*, 2006) andererseits, Rab1-GEF-Aktivität für Säuger-TRAPP postuliert wurde (Sacher *et al.*, 2008). Ein großer Teil der Untereinheiten des Säuger-TRAPP liegt im Zelllysate nicht im stabilen Komplex, sondern in dissoziierter Form vor (Sacher und Ferro-Novick, 2001; Loh *et al.*, 2005).

Anders als in der Hefe kommt es im Säuger während des ER-Golgi-Transports anstelle der (heterotypischen) Fusion COPII-umhüllter Vesikel direkt an Membranen des *cis*-Golgi, zunächst zur (homotypischen) Fusion von COPII-Vesikeln miteinander, dadurch zur Konstituierung eines ER-Golgi-intermediären Kompartiments in der Zelle (ERGIC – *ER-Golgi intermediate Compartment*; auch VTC – *vesicular tubular clusters*) (Xu und Hay, 2004; Appenzeller-Herzog und Hauri, 2006) und erst daraufhin zum Transport zum *cis*-Golgi (Baines *et al.*, 2007). Zwar ist Bet3 essentiell für die homotypische COPII-Vesikel-Anheftung in Säugerzellen (Yu *et al.*, 2006), es ist aber nicht bekannt, ob Säuger-TRAPP an weiteren Membranfusionen zwischen ER und Golgi beteiligt ist (Fromme *et al.*, 2008), bzw. ob unterschiedliche Spezifitäten verschiedener TRAPP-Isokomplexe für einzelne dieser Membranen (COPII, ERGIC, *cis*-Golgi) bestehen. Tatsächlich zeigten die Untersuchungen in Säugerzellen vor allem eine Beteiligung der TRAPP-Untereinheit Bet3 am ER-Golgi-Transport (Loh *et al.*, 2005; Cai *et al.*, 2007). Das lässt die Möglichkeit offen, dass nur Bet3 und nicht der gesamte TRAPP-Komplex an der homotypischen COPII-Vesikelfusion beteiligt ist (Sacher *et al.*, 2008). Unabhängig von den molekularen Mechanismen der einzelnen Schritte beim ER-Golgi-Transport in Säugerzellen konnten Loh *et al.* (2005) für den Transport des Hüllen-Glycoproteins des Vesicular Stomatitis Virus (VSV-G) in permeabilisierten (semi-intakten) Zellen folgenden Ablauf zeigen:

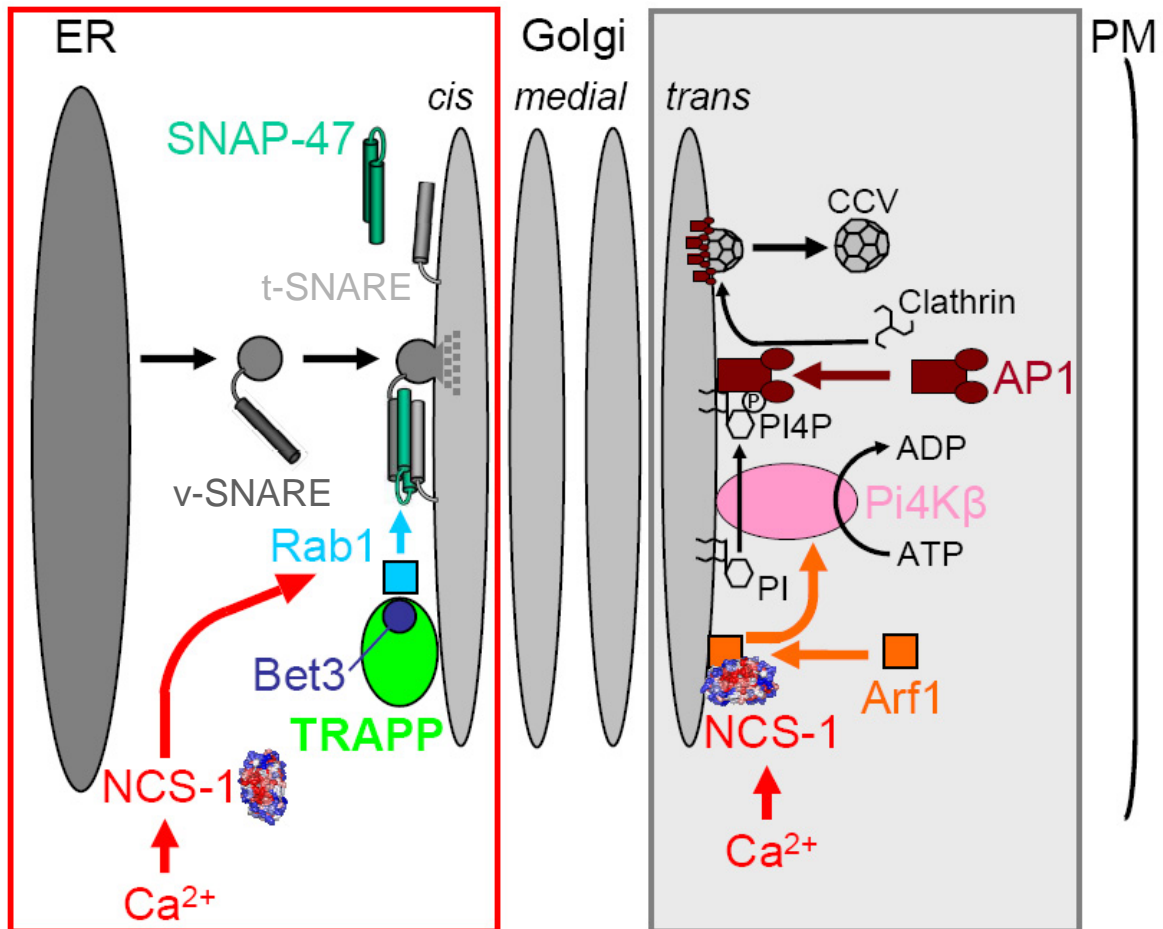
ER-Vesikel-Knospung – COPII-Vesikel-Transport – Vesikel-Anheftung –  
Rab1-Aktivierung – SNARE-Aktivierung – Membran-Fusion

Wobei dieser Abfolge die unten gezeigte Sequenz der Aktionen folgender Moleküle zu Grunde lag:

COPII → Bet3 (TRAPP?) → Rab1 →  $\alpha$ -SNAP →  $\text{Ca}^{2+}$  → GS28 SNARE

$\alpha$ -SNAP ist ein lösliches NSF-*attachment protein* (*soluble n-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein*). Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor, der die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit (bzw. die EGTA-Sensitivität) des Vesikeltransports zwischen ER und Golgi vermittelt (Pind *et al.*, 1994) ist unbekannt. In gelchromatographischen Experimenten wurde für Bet3 (Loh *et al.*, 2005) und weitere Untereinheiten des TRAPP-Komplexes (Kümmel *et al.*, 2008) gezeigt, dass die nativen Proteine in Zelllysaten, ebenso wie NCS-1, in zwei Pools unterschiedlichen Molekulargewichts vorkommen. Der hochmolekulare Pool eluierte dabei, wie NCS-1 in der vorliegenden Arbeit (4.6.1), bei einem Molekulargewicht zwischen 500 und 700 kDa, obwohl das rechnerische Molekulargewicht niedriger ist (Hefe-TRAPP-I: 254 kDa, [apparentes Molekulargewicht: 300 kDa]; Hefe-TRAPP-II: 569 kDa [apparentes Molekulargewicht: 1000 kDa]; Säuger-TRAPP: apparentes Molekulargewicht 670 kDa; Summe der TRAPP-I-orthologen Säuger-TRAPP-Untereinheiten mit entsprechender Stöchiometrie: 136 kDa; Summe der TRAPP-II-Orthologen der Säuger mit entsprechender Stöchiometrie: 418 kDa).

SNAP-47, ein SNARE-Protein, das Membranfusionen katalysiert, dessen physiologische Zielmembranen allerdings unbekannt sind, ist in Neuronen perinucleär und dendritisch lokalisiert (Holt *et al.*, 2006). Zusammengenommen weisen diese Ergebnisse auf eine Funktion von NCS-1 im vesikulären Transport am Golgi-Apparat hin (Abb. 5.3). Es liegt demzufolge eine teilweise funktionelle Konservierung zwischen den orthologen Proteinen Frq1 in der Hefe und NCS-1 in der Maus vor, obwohl keine Konservierung der Interaktion mit einer PI 4-Kinase festgestellt wurde. Auf Grund dieser Ergebnisse wird das in Abb. 5.3 dargestellte Modell für NCS-1-Funktionen am Golgi-Apparat von Säugerzellen vorgeschlagen.



**Abb.5.3, Modell der NCS-1-Funktion beim Vesikeltransport am Golgi-Apparat im Säuger**

Rechts (hellgrau hinterlegt) ist das vorgeschlagene Modell der bereits beschriebene NCS-1-Funktion beim Export Clathrin-ummantelter Vesikel (CCV – *clathrin coated vesicle*) vom trans-Golgi dargestellt: NCS-1 bindet  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig an die kleine GTPase der ras-Familie Arf1 und rekrutiert diese zum trans-Golgi. Arf1 rekrutiert und aktiviert die Phosphatidylinositol 4-Kinase PI4K $\beta$ . PI4K $\beta$  produziert Phosphatidylinositol-4-Phosphat (PI4P). Der Clathrinadapterkomplex AP1 bindet an PI4P und gegebenenfalls zu transportierende Proteine, rekrutiert Clathrin und induziert die Abschnürung Clathrin-umhüllter Vesikel.

Links (rot umrahmt) ist ein Modell des Vesikeltransports zwischen ER und cis-Golgi dargestellt: Der TRAPP-Komplex wirkt als Anheftungsfaktor von Transportvesikeln. Nach Vesikelanheftung aktiviert der TRAPP-Komplex als Guaninnucleotid-Austauschfaktor, die kleine GTPase der ras-Familie Rab1. Rab1-GTP aktiviert die SNARE-vermittelte Vesikelfusion mit dem Zielkompartiment. Auf Grund der in der vorliegenden Arbeit identifizierten Interaktionspartner wird eine Funktion von NCS-1 bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Regulation dieses Prozesses postuliert. Das SNARE-Protein SNAP-47 wird auf Grund der Interaktion mit NCS-1 als eines der beteiligten SNARE-Proteine vorgeschlagen. Die direkten Zielmembranen könnten neben dem cis-Golgi auch COPII-Vesikel oder das ER-Golgi intermediäre Kompartiment (ERGIC) sein. ER – endoplasmatisches Reticulum; PM – Plasmamembran, PI – Phosphatidylinositol.



Die Überlebensfähigkeit von NCS-1-Knockout-Mäusen zeigte, dass die NCS-1-Funktion nicht essentiell war (Joanna Hermainski, persönliche Mitteilung). Es ist daher unwahrscheinlich, dass NCS-1 den konstitutiven Vesikeltransport reguliert, an dem SNARE-Komplexe beteiligt sind, die aus Syn5, GS27, Bet1 und Sec22b (Volchuk *et al.*, 2004) oder Syn5, GS28, Bet1 und Ykt6 (Zhang und Hong, 2001) bestehen. Vielmehr muss angenommen werden, dass NCS-1 seine mutmaßliche regulative Funktion mit TRAPP / Rab1 / SNAP-47 in einem alternativen Vesikeltransportweg ausübt, so dass der NCS-1-Funktionsverlust, zumindest unter normalen Lebensbedingungen im Säuger, anders als in der Hefe (Hendricks *et al.*, 1999), kompensiert werden kann.

Die Kompensation des NCS-1-Funktionsverlustes könnte durch Redundanz auf Gen- oder Proteinebene innerhalb eines Transportweges, oder durch Umleitung in einen anderen Transportweg geschehen. Interessanterweise wurde für Rab1A in Neuronen ein Transportweg beschrieben, der alternativ zu dem Proteintransport vom ER durch den Golgi, direkt vom glatten ER bzw. von Prä-Golgi-Kompartimenten zur Plasmamembran führt und offensichtlich eher dem Transport und Recycling von Membran und Membranlipiden dient, als dem Protein-Transport (Sannerud *et al.*, 2006). In diesem Zusammenhang wurde für das ER-Golgi-intermediäre Kompartiment (ERGIC), analog zum endosomalen endocytotischen recycling Kompartiment (ERC) eine Funktion als biosynthetisches recycling Kompartiment (BRC) vorgeschlagen (Saraste und Goud, 2007). Die Lokalisation von NCS-1 am Spine-Apparatus (4.5.3) entspricht einer Funktion bei der Regulation des Membrantraffickings zwischen glattem ER und Zellmembran, in einer Zellregion, in der der Membrantransport zwischen Plasmamembran und intrazellulären Kompartimenten aktivitätsabhängig reguliert wird (Park *et al.*, 2006; Holbro *et al.*, 2009).

### **5.5 Veränderte Kurzzeit-Plastizität in transgenen Mäusen**

Die Verringerung der Doppelpuls-Fazilitierung der Synapsen des *Tractus perforans* im Hippocampus NCS-1-EGFP-exprimierender Mäuse (4.9) kann prä- oder postsynaptisch vermittelt worden sein.

Die NCS-1-Lokalisation, angrenzend an die postsynaptische Dichte (PSD) (4.5.3), wo sich die endocytotische Region befindet (Racz *et al.*, 2004), sowie die Interaktion mit

Proteinen, die den vesikulären Transport regulieren passen zu einer Funktion beim Neurotransmitter-Rezeptor-*Trafficking*, ebenso die NCS-1-Interaktion mit PICK1 (*Protein interacting with C-kinase*) (Jo *et al.*, 2008). Gardner *et al.* (2005) und Hanley *et al.* (2002) zeigten, dass PICK1 das Zirkulieren von AMPA-Typ Glutamat-Rezeptoren zwischen extrasynaptischer Membranlokalisation, synaptischer Lokalisation und intrazellulärer (vesikulärer) Lokalisation reguliert. Auch wurde gezeigt, dass NCS-1 für, durch metabotrope Glutamatrezeptoren vermittelte, Langzeitdepression (mGluR-LTD) notwendig ist (Jo *et al.*, 2008), und dass mGluR-LTD auf der Internalisierung und verringerten Oberflächenexpression von AMPA-Typ Glutamatrezeptoren beruht (Carroll *et al.*, 1999; Colledge *et al.*, 2003; Huber *et al.*, 2001; Moulton *et al.*, 2006; Oliet *et al.*, 1997; Snyder *et al.*, 2001). Heine *et al.* (2008) konnten einen postsynaptischen Mechanismus zur Regulation der kurzzeit-Plastizität zeigen. An Stelle der in Hirnschnitten beobachtbaren Doppelpulsfazilitierung (PPF – *paired pulse facilitation*) tritt in neuronaler Zellkultur eine Doppelpuls-Depression auf (PPD) (Sippy *et al.*, 2003). Eine Verringerung der lateralen Mobilität postsynaptischer AMPA-Typ Glutamatrezeptoren in der Zellmembran verstärkte die PPD, da der Austausch inaktivierter synaptischer Rezeptoren durch aktivierbare extrasynaptische Rezeptoren verlangsamt war (Heine *et al.*, 2008). Eine Veränderung des Transports von AMPA-Typ Glutamat-Rezeptoren wäre somit eine mögliche Erklärung für die Verringerung der PPF durch postsynaptische Mechanismen in NCS-1-EGFP-exprimierenden Mäusen.

Gemäß gängiger Erklärungsmodelle präsynaptischer Mechanismen der Kurzzeit-Plastizität, ergibt sich zunächst keine NCS-1-Funktion bei deren Regulation. Die präsynaptische Neurotransmitterausschüttung wird durch eine Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration ausgelöst, die von Synaptotagmin, dem  $Ca^{2+}$ -Sensor der Freisetzungsmaschinerie, detektiert wird (Katz und Miledi, 1970; Schneggenburger und Neher, 2005). Die drei präsynaptischen Erklärungsmodelle der PPF (Pan und Zucker, 2009), beruhen auf der aktivitätsabhängigen Verstärkung des Transmitterausschüttung-induzierenden  $Ca^{2+}$ -Signals (residuales Calcium Modell), bzw. auf der Veränderung von  $Ca^{2+}$ -Sensitivität (*multi-site* Rezeptor Modell) oder  $Ca^{2+}$ -Pufferung (partiell Calcium-Puffer-Sättigungs Modell) (Burnashev und Rozov, 2005; Zucker und Regehr, 2002). Wie bereits erwähnt kommt NCS-1 auf Grund seiner hohen  $Ca^{2+}$ -Affinität nicht als ein, die Transmitterausschüttung direkt modulierender  $Ca^{2+}$ -Sensor in Frage, zumal NCS-1 nicht an synaptische Vesikel

assoziiert ist (Dannenberg 2000; Takamori *et al.*, 2006). Zwar hätte die verstärkte Expression des hochaffin  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Proteins NCS-1-EGFP zu einer erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer-Kapazität im präsynaptischen Milieu führen können, Winks *et al.* (2005) haben jedoch in kultivierten, NCS-1 überexprimierenden Neuronen eine normale, unveränderte  $\text{Ca}^{2+}$ -Pufferkapazität festgestellt.

Die, in Analogie zu den Befunden aus der Hefe, in Zellkultur beschriebene NCS-1-Funktion bei der Regulation der Phosphatidylinositolphosphat-Signalwege (Rajebhosale *et al.*, 2003) könnte allerdings die Erregbarkeit präsynaptischer Neuronen beeinflussen und dadurch auch die Neurotransmitterausschüttung. In kultivierten Dorsalganglien-Neuronen (DRG-Neuronen) führte eine verstärkte NCS-1-Expression zu einer erhöhten Membrankonzentration von Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat ( $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ ). Diese ging unter bestimmten Bedingungen einher mit einem verstärkten M-Strom (Winks *et al.*, 2005) – einem inhibitorischen  $\text{K}^+$ -Strom durch Kaliumkanäle der  $\text{K}_v7$ -Kanalfamilie, benannt nach seiner Inhibierbarkeit durch muscarinerge Acetylcholin-Rezeptoren (Constanti und Brown, 1981; Delmas *et al.*, 2005). Der M-Strom ist abhängig von  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  in der Membran (Li *et al.*, 2005; Gamper und Shapiro 2007) und reguliert, z.B. durch seinen Beitrag zu der auf Aktionspotentiale folgenden Nachhyperpolarisation, das Feuerungsverhalten von Neuronen während der Frequenz-Adaptation von Aktionspotential-Salven. Die genetische Inaktivierung des M-Stroms hob die Frequenzadaptation auf (Peters *et al.*, 2004). Vorläufige Experimente an Hirnschnitten NCS-1-EGFP-exprimierender Mäuse zeigten eine Verstärkung dieser Adaptation. Während eine Verringerung des M-Stroms mit einer Übererregbarkeit einherging, könnte die verringerte Erregbarkeit in Hirnschnitten der NCS-1-EGFP-exprimierenden Mäuse auch auf einem verstärkten M-Strom oder möglicherweise auf der Veränderung anderer, durch  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  regulierter Ionenströme (Gamper *et al.*, 2004; Hilgemann *et al.*, 2001) beruhen.

Trotz dieser Spekulationen bleibt allerdings offen, ob und wie die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Veränderung der Kurzzeitplastizität mit den identifizierten NCS-1-Interaktionspartnern zusammenhängt. Dieses wäre in zukünftigen Experimenten zu untersuchen.

### 5.6 Ausblick

Nachdem die Ergebnisse dieser Arbeit eine Funktion von NCS-1 beim vesikulären Transport nahe legen wäre in zellbiologischen Experimenten zu untersuchen, ob beim frühen sekretorischen Transport bestimmte Wege NCS-1-abhängig reguliert werden. Es böten sich das semi-intakten Zellsystem von Loh *et al.* (2005) oder die bereits Haynes *et al.* (2005) beschriebenen pulse-chase Experimenten mit temperatursensitivem <sup>ts</sup>VSV-G-Protein-GFP-Fusionsprotein um NCS-1 Einflüsse auf den frühen Vesikeltransport zwischen ER und Golgi zu untersuchen. Zum Beispiel könnte untersucht werden, ob NCS-1-Knockdown durch siRNA das Glykosylierungsmuster von <sup>ts</sup>VSV-G-Protein verändert. Es gilt allerdings zu berücksichtigen, dass NCS-1 vor allem neuronal exprimiert wird. Gerade in Dendriten, wo NCS-1 auch lokalisiert ist, gibt es zusätzliche Vesikel-Transportwege (Horton und Ehlers 2004). In Neuronen könnten NCS-1-Einflüsse auf spezielle dendritische Transportwege zwischen ER und Golgi (Horton und Ehlers 2003), oder der von Sannerud *et al.* (2006) beschriebene Rab1-abhängige Membrantransportweg untersucht werden.

Schließlich müsste sich eine physiologische Relevanz von NCS-1-Funktionen beim Vesikeltransport, unter Bedingungen, die sich aus den zellbiologischen Experimenten ergeben könnten, in den gentechnisch veränderten Mäusen feststellen lassen.

Besonderes Augenmerk wird, hinsichtlich der Funktion von NCS-1 bei mGluR-LTD (Jo *et al.*, 2008), auf das AMPA-Rezeptor Trafficking zu legen sein. Hier besteht die Möglichkeit die transgenen Tiere mit verstärkter NCS-1-Expression mit NCS-1-Knockout-Tieren zu vergleichen mit Wildtyp-Tieren zu vergleichen. Gegensätzliche Effekte von NCS-1-Funktionsverlust (im Knockout) und von NCS-1-Überfunktion (in den in dieser Arbeit beschriebenen transgenen Mäusen), wären ein starkes Indiz für physiologische Wichtigkeit etwaig festgestellter NCS-1-Funktionen.

# 6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde einerseits der Einfluss der N-Myristylierung auf die intrazelluläre Lokalisation des Neuronalen Calcium-Sensors-1 (NCS-1) in kultivierten Zelllinien untersucht, andererseits wurden, mit Hilfe transgener Mäuse, NCS-1-Interaktionspartner identifiziert.

Zellkulturexperimente mit stabil transfizierten Zellen bestätigten die, in anderen Zellen bereits gezeigte, Notwendigkeit der N-Myristylierung für die Membranlokalisation und für die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Membranassoziation von NCS-1.

Es waren bereits NCS-1-Funktionen bei der Regulation der synaptischen Stärke und des Vesikeltransports vorgeschlagen worden. Frq1, das NCS-1-Ortholog der Hefe, ist eine regulatorische Untereinheit der Phosphatidylinositol 4-Kinase Pik1, mit einer wichtigen Funktion beim Vesikeltransport am Golgi-Apparat. Auf Grund der hohen Sequenz-Konservierung des NCS-1 Proteins, über die Grenzen verschiedener *Phylae* hinaus, wurde die Hypothese formuliert, dass Säuger-NCS-1 ebenfalls bei der Regulation des vesikulären Transports am Golgi-Apparat beteiligt ist.

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden transgene Mauslinien etabliert, die GFP-markiertes NCS-1 (NCS-1-EGFP) im Vorderhirn exprimierten. Verglichen mit der endogenen NCS-1-Expression war die Transgen-Expression in diesem Gewebe verstärkt. Die transgenen Mäuse zeigten keinen auffälligen Phänotyp. Es wurde allerdings in Gewebeschnitten des Hirns transgener Mäuse eine veränderte Erregbarkeit bestimmter Synapsen (am *Tractus perforans* im Hippocampus) festgestellt.

Mit dem Ziel NCS-1-Interaktionspartner zu identifizieren, wurden NCS-1-EGFP-enthaltende Proteinkomplexe, durch Gelchromatographie und anschließende Immunpräzipitation mit anti-GFP-Antikörpern, aus Vorderhirn-Lysat transgener Mäuse isoliert. Das Immunpräzipitat wurde durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. In einem Kontrollexperiment wurde Vorderhirn-Lysat von transgenen Mäusen, die nur EGFP unter Kontrolle desselben Promotors exprimierten, sowie von Wildtyp-Mäusen eingesetzt. Spezifische Coomassie-gefärbte Proteinbanden, die nicht im Kontrollexperiment auftraten, wurden ausgeschnitten und, nach tryptischer Hydrolyse, massenspektroskopisch (LC-MS/MS) analysiert.

In der MS-Analyse wurden mehrere potentielle NCS-1-Interaktionspartner identifiziert. Ein Pik1-Ortholog befand sich allerdings nicht darunter. Stattdessen wurden zwei

## Zusammenfassung

---

neue mutmaßliche NCS-1-Interaktionspartner identifiziert, Bet3 und SNAP-47, die beide eine Funktion beim Vesikeltransport haben. Die Interaktion beider Proteine mit NCS-1 wurde durch Co-Immünpräzipitation mit NCS-1-Antikörpern bestätigt. Als Ausgangsmaterial diente dabei Hirnlysat von Wildtyp-Mäusen oder in Kontrollexperimenten Hirnlysat von NCS-1-Knockout-Mäusen. Die NCS-1-Interaktionen mit Bet3 und SNAP-47 waren  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig. Immunfluoreszenz-Analysen zeigten die perinucleäre Co-Lokalisation von NCS-1 mit Bet3 und SNAP-47. Diese Ergebnisse wurden zusammengefasst in einem Modell, das eine NCS-1-Funktion bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Regulation des vesikulären Transports am Golgi-Apparat im Säuger impliziert.

Obwohl keine Konservierung der Interaktionspartner festgestellt wurde, geht die strukturelle Konservierung zwischen Frq1 und NCS-1 also einher mit der Konservierung einer Funktion beider Proteine beim vesikulären Transport am Golgi-Apparat.

## 7 Abstract

This work addressed on one hand the influence of *N*-myristoylation on localisation of neuronal calcium sensor-1 (NCS-1) in cell culture, on the other hand the identification of NCS-1 interaction-partners using transgenic mice as starting point.

Cell culture experiments in stably transfected cell lines confirmed the importance of *N*-myristoylation for membrane localization and  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent membrane association of NCS-1.

NCS-1 had already been implicated in regulation of synaptic strength and vesicular trafficking. The yeast NCS-1 orthologue Frq1 functions as a regulatory subunit of phosphatidylinositol 4-kinase Pik1, playing an important role in Golgi function and vesicle trafficking. Given the high sequence conservation of NCS-1 proteins across phyla, I hypothesized that mammalian NCS-1 also functions in vesicular trafficking at the Golgi.

To address this hypothesis, I generated transgenic mice expressing GFP-tagged NCS-1 (NCS-1-EGFP) in forebrain. In comparison with endogenous NCS-1 expression levels in wildtype mice, transgene expression levels were increased. Transgenic mice displayed no obvious excitability phenotype. However, isolated brain tissue exhibited altered excitability of some synapses (i.e. at the hippocampal perforant path).

To identify NCS-1 interaction partners I prepared forebrain lysates and isolated NCS-1-EGFP containing protein complexes by size-exclusion chromatography followed by immunoprecipitation with anti-GFP antibodies. Immunoprecipitated proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. For control, I used brain lysates from transgenic mice expressing only EGFP under control of the same promoter as well as from wildtype mice. Specific coomassie-stained protein bands, not apparent in controls were isolated and characterized by mass spectrometry (LC-MS/MS).

The MS-analysis indicated several candidate interaction partners of NCS-1, but a mammalian Pik1 orthologue was not among them. Instead, I identified two novel candidate proteins, Bet3 and SNAP-47, which both have an, albeit ill-defined, role in vesicular trafficking in eukaryotic cells. Their interaction with NCS-1 could be confirmed by co-immunoprecipitation with anti-NCS-1 antibodies from brain lysate of wild type mice using NCS-1 knockout mice for control. These interactions were  $\text{Ca}^{2+}$ -

## Abstract

---

dependent. Immunofluorescence analysis showed perinuclear co-localization of NCS-1 with Bet3 and SNAP-47. These results were summarized in a model with mammalian NCS-1 playing a role in  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent regulation of intracellular vesicle trafficking *in vivo*.

Although conservation of interaction partners was not confirmed, structural conservation between Frq1 and NCS-1 went along with conservation of a function for both proteins in vesicle trafficking at the Golgi.



## 8 Literaturverzeichnis

Abramoff M.D., Magelhaes P.J., Ram S.J. (2004) Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*, **11** (7), 36-42.

Allan B.B., Moyer B.D., Balch W.E. (2000) Rab1 Recruitment of p115 into a cis-SNARE Complex: Programming Budding COPII Vesicles for Fusion. *Science* **289**, 444-448.

Allen P.B., Greenfield A.T., Svenningsson P., Haspeslagh D.C., Greengard P., (2004) Phactrs 1–4: A family of protein phosphatase 1 and actin regulatory proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **101** (18), 7187-7192.

Ames J.B., Hamasaki N., Molchanova T. (2002) Structure and Calcium-Binding Studies of a Recoverin Mutant (E85Q) in an Allosteric Intermediate State. *Biochemistry* **41** (18), 5776-5787.

Ames J.B., Hendricks K.B., Strahl T., Huttner I.G., Hamasaki N., Thorner J. (2000) Structure and Calcium-Binding Properties of Frq1, a Novel Calcium Sensor in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **39** (40), 12149-12161.

Ames J.B., Ishima R., Tanaka T., Gordon J.I., Stryer L., Ikura M. (1997) Molecular mechanics of calcium-myristoyl switches. *Nature* **389**, 198-202.

Ames J.B., Levay K., Wingard J.N., Lusin J.D., Slepak V.Z. (2006) Structural Basis for Calcium-induced Inhibition of Rhodopsin Kinase by Recoverin. *J.Biol.Chem.* **281** (48), 37237-37245.

Angaut-Petit D., Toth P., Rogero O., Faille L., Tejedor FJ., Ferrus A. (1998) Enhanced neurotransmitter release is associated with reduction of neuronal branching in a *Drosophila* mutant overexpressing frequenin. *Eur.J.Neurosci* **10** (2), 423-434.

Appenzeller-Herzog C., Hauri H.-P. (2006) The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function. *J.Cell.Sci.* **119** (11), 2173-2183.

Aravind P., Chandra K., Reddy P.P., Jeromin A., Chary K.V., Sharma Y. (2008) Regulatory and Structural EF-Hand Motifs of Neuronal Calcium Sensor-1: Mg<sup>2+</sup> modulates Ca<sup>2+</sup> binding, Ca<sup>2+</sup>-Induced Conformational Changes, and Equilibrium Unfolding Transitions. *J.Mol.Biol.* **376** (4), 1100-1115.

Audhya A., Foti M., Emr S.D. (2000) Distinct Roles for the Yeast Phosphatidylinositol 4-Kinases, Stt4p and Pik1p, in Secretion, Cell Growth, and Organelle Membrane Dynamics. *Mol.Biol.Cell* **11**, 2673-2689.

Augustine G.J., Santamaria F., Tanaka K. (2003) Local Calcium Signaling in Neurons. *Neuron* **40**, 331-346.

Ausubel F.M. (Hrsg.) (1996) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, Inc., Brooklyn, New York.

- Babu Y.S., Bugg C.E., Cook W.J. (1988) Structure of Calmodulin Refined at 2.2 Å Resolution. *J.Mol.Biol.* **204**, 191-204.
- Bahi N., Friocourt G., Carrie A., Graham M.E., Weiss J.L., Chafey P., Fauchereau F., Burgoyne R.D., Chelly J. (2003) IL1 receptor accessory protein like, a protein involved in X-linked mental retardation, interacts with Neuronal Calcium Sensor-1 and regulates exocytosis. *J.Hum.Mol.Genet.* **12** (12), 1415-1425 .
- Baines A.C., Zhang B. (2007) Receptor-mediated protein transport in the early secretory pathway. *Trends.Biochem.Sci.* **32** (8), 381-388.
- Baran JA. Mundy D.I., VasANJI A., Parat M.-O. (2007) Altered localization of H-Ras in caveolin-1-null cells is palmitoylation-independent. *J.Cell Commun.Signal.* **1**, 195-204
- Berridge M.J., Bootman M.D., Roderick H.L. (2003) Calcium Signalling: Dynamics, Homeostasis and Remodelling. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **4**, 517-529
- Berridge M.J., Lipp P., Bootman M.D. (2000) The Versatility and Universality of Calcium Signalling. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **1**, 11-21
- Blaser H., Reichman-Fried M., Castanon I., Dumstrei K., Marlow F.L., Kawakami K., Solnica-Krezel L., Heisenberg C-P., Raz E. (2006) Migration of Zebrafish Primordial Germ Cells: A Role for Myosin Contraction and Cytoplasmic Flow. *Dev. Cell* **11**, 613-627.
- Boehmerle W., Splittgerber U., Lazarus M.B., McKenzie K.M., Johnston D.G., Austin D.J., Ehrlich B.E. (2006) Paclitaxel induces calcium oscillations via an inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and neuronal calcium sensor 1-dependent mechanism. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **103** (48), 18356-18361.
- Boehmerle W., Zhang K., Sivula M., Heidrich F.M., Lee Y., Jordt S.-E., Ehrlich B.E., (2007) Chronic exposure to paclitaxel diminishes phosphoinositide signaling by calpain-mediated neuronal calcium sensor-1 degradation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **104** (26): 11103-11108.
- Bourne Y., Dannenberg J., Pollmann V., Marchot P., Pongs O. (2001) Immunocytochemical Localization and Crystal Structure of Human Frequentin (Neuronal Calcium Sensor 1). *J.Biol.Chem.* **276** (15), 11949-11955.
- Braunewell K.-H., Gundelfinger E.D. (1999) Intracellular neuronal calcium sensor proteins: a family of EF-hand calcium-binding proteins in search of a function. *Cell Tissue Res.* **295**, 1-12.
- Brendel C., Rehbein M, Kreienkamp H.-J., Buck F., Richter D., Kindler S. (2004) Characterization of Staufin 1 ribonucleoprotein complexes. *Biochem.J.* **384**, 239-246
- Broach J.R., Hicks J.B. (1980) Replication and Recombination Functions Associated with the Yeast Plasmid, 2 $\mu$  Circle. *Cell* **21**, 501-508.

- Brunsveld L., Waldmann H., Huster D. (2009) Membrane binding of lipidated Ras peptides and proteins – The structural point of view. *Biochim.Biophys.Acta* **1788**, 278-288.
- Bukalo O., Dityatev A. (2006) Analysis of Neural Cell Functions in Gene Knockout Mice: Electrophysiological Investigation of Synaptic Plasticity in Acute Hippocampal Slices. *Methods Enzymol.* **417**, 52-66.
- Burgoyne R.D. (2007) Neuronal calcium sensor proteins: generating diversity in neuronal Ca<sup>2+</sup> signalling. *Nat.Rev.Neurosci.* **8**, 182-193.
- Burnashev N., Rozov A. (2005) Presynaptic Ca<sup>2+</sup> dynamics, Ca<sup>2+</sup> buffers and synaptic efficacy. *Cell Calcium* **37** (5), 489-495.
- Cai Y., Chin H.F., Lazarova D., Menon S., Fu C., Cai H., Sclafani A., Rodgers D.W., De La Cruz E.M., Ferro-Novick S., Reinisch K.M. (2008) The Structural Basis for Activation of the Rab Ypt1p by the TRAPP Membrane-Tethering Complexes. *Cell* **133**, 1202-1213.
- Cai H., Yu S., Menon S., Cai Y., Lazarova D., Fu C., Reinisch K., Hay J.C., Ferro-Novick S. (2007) TRAPP1 tethers COPII vesicles by binding the coat subunit Sec23. *Nature* **445**, 941-944
- Campbell H.D., Young I.G., Matthaei K.I. (2000) Mammalian Homologues of the *Drosophila melanogaster flightless I* Gene Involved in Early Development. *Curr.Genomics* **1**, 59-70.
- Campellone K.G., Webb N.J., Znameroski E.A., Welch M.D. (2008) WHAMM Is an Arp2/3 Complex Activator That Binds Microtubules and Functions in ER to Golgi Transport. *Cell* **134**, 148-161.
- Carr S.A., Annan S. (1996) Overview of Peptide and Protein Analysis by Mass Spectrometry. *Curr.Protoc.Protein Sci.* 4:16.1.1-16.1.27.
- Carroll R.C., Lissin D.V., von Zastrow M., Nicoll R.A., Malenka R.C. (1999) Rapid redistribution of glutamate receptors contributes to long-term depression in hippocampal cultures. *Nat.Neurosci.* **2** (5), 454-460.
- Caviston J.P., Holzbaur E.L.F. (2006) Microtubule motors at the intersection of trafficking and transport. *Trends Cell Biol.* **16** (10), 530-537.
- Charras G., Paluch E. (2008) Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **9**, 730-736
- Charras G.T. (2008) A short history of blebbing. *J.Microsc.* **231** (3), 466-478.
- Cho A., Haruyama N., Kulkarni A.B. (2009) Generation of Transgenic Mice. *Curr.Protoc.Cell Biol.* **42**, 19.11.1-19.11.22.

Colledge M., Snyder E.M., Crozier R.A., Soderling J.A., Jin Y., Langeberg L.K., Lu H., Bear M.F., Scott J.D. (2003) Ubiquitination Regulated PSD-95 Degradation and AMPA Receptor Surface Expression. *Neuron* **40**, 595-607.

Constanti A., Brown D.A. (1981) M-Currents in voltage-clamped mammalian sympathetic neurones. *Neurosci.Lett.* **24** (3), 289-294.

Cox J.A., Durussel I., Comte M., Nef S., Nef P., Lenz S.E., Gundelfinger E.D. (1994) Cation Binding and Conformational Changes in VILIP and NCS-1, Two Neuron-specific Calcium-binding Proteins. *J.Biol.Chem.* **269** (52), 32807-32813.

Cox R., Chen S.H., Yoo E., Segev N. (2007) Conservation of the TRAPP-II-specific subunits of a Ypt/Rab exchanger complex. *BMC.Evol.Biol.* **7**, 12.

Craig N.L. (1988) The mechanism of conservative site-specific recombination. *Annu.Rev.Genet.* **22**, 77-105.

Dannenberg J. (2000) Untersuchungen zur Funktion von Frequenin. Dissertation, Universität Hamburg.

De Castro E., Nef S., Fiumelli H., Lenz S.E., Kawamura S., Nef P. (1995) Regulation of rhodopsin phosphorylation by a family of neuronal calcium sensors. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **216** (1), 133-140

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

Delmas P., Brown D.A. (2005) Pathways modulating neural KCNQ/M (Kv7) Potassium Channels. *Nat.Rev.Neurosci.* **6**, 850-862.

Don R.H., Wainwright B.J., Baker K., Mattick J.S. (1991) 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* **19** (14), 4008.

Du J., Tao-Cheng J.-H., Zervas P., McBain C.J. (1998) The K<sup>+</sup> channel, Kv2.1, is apposed to astrocytic processes and is associated with inhibitory postsynaptic membranes in hippocampal and cortical prinipal neurons and inhibitory interneurons. *Neuroscience* **84** (1), 37-48.

Duden R. (2003) ER-to-Golgi transport: COP I and COP II function. *Mol.Membr.Biol.* **20** (3), 197-207.

Farazi T.A., Waksman G., Gordon J.I. (2001) The Biology and Enzymology of Protein N-Myristoylation. *J.Biol.Chem.* **276** (43), 39501-39504.

Fik-Rymakiewicz E., Duda T., Sharma R.K. (2006) Novel frequenin-modulated Ca<sup>2+</sup>-signaling membrane guanylate cyclase (ROS-GC) transduction pathway in bovine hippocampus. *Mol.Cell.Biochem.* **291**, 187-204

- Fisher J.R., Sharma Y., Iuliano S., Picciotti R.A., Krylov D., Hurley J., Roder J., Jeromin A. (2000) Purification of Myristoylated and Nonmyristoylated Neuronal Calcium Sensor-1 Using Single-Step Hydrophobic Interaction Chromatography. *Protein Expr.Purif.* **20**, 66-72.
- Flaherty K.M., Zozulya S., Stryer L., McKay D.B. (1993) Three-Dimensional Structure of Recoverin, a Calcium Sensor in Vision. *Cell* **75**, 709-716.
- Flanagan C.A., Thorner J. (1992) Purification and Characterization of a Soluble Phosphatidylinositol 4-Kinase from the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* **267** (33), 24117-24125.
- Fromme J.C., Orci L., Schekman R. (2008) Coordination of COPII vesicle trafficking by Sec23. *Trends Cell Biol.* **18** (7), 330-336.
- Gambino F., Pavlowsky A., Béglé A., Dupont J.-L., Bahi N., Courjaret R., Gardette R., Hadjkacem H., Skala H., Poulain B., Chelly J., Vitale N., Humeau Y. (2007) IL1-receptor accessory protein-like 1 (IL1RAPL1), a protein involved in cognitive functions regulates N-type Ca<sup>2+</sup>-channel and neurite elongation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **104**, 9063-9068.
- Gamper N., Reznikov V., Yamada Y., Yang J., Shapiro M.S. (2004) Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Signals Underlie Receptor-Specific G<sub>q/11</sub>-Mediated Modulation of N-Type Ca<sup>2+</sup> Channels. *J.Neurosci.* **24** (48), 10980-10992.
- Gamper N., Shapiro M.S. (2007) Regulation of ion transport proteins by membrane phosphoinositides. *Nat.Rev.Neurosci.* **8**, 921-934.
- Gardner S.M., Takamiya K., Xia J., Suh J.G., Johnson R., Yu S., Huganir R.L. (2005) Calcium-Permeable AMPA Receptor Plasticity Is Mediated by Subunit-Specific Interactions with PICK1 and NSF. *Neuron* **45**, 903-915.
- Gatlin C.L., Kleemann G.R., Hays L.G., Link A.J., Yates J.R., III. (1998) Protein Identification at the Low Femtomole Level from Silver-Stained Gels Using a New Fritless Electrospray Interface for Liquid Chromatography–Microspray and Nanospray Mass Spectrometry. *Anal.Biochem.* **263** (1), 93-101.
- Gierke P., Zhao C., Brackmann M., Linke B., Heinemann U., Braunewell K.-H. (2004) Expression analysis of members of the neuronal calcium sensor protein family: combining bioinformatics and Western blot analysis. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **323**, 38-43.
- Gluzman Y. (1981) SV40-Transformed Simian Cells Support the Replication of Early SV40 Mutants. *Cell* **23**, 175-182.
- Godi A., Pertile P., Meyers R., Marra P., Di Tullio G., Iurisci C., Luini A., Corda D., De Matteis M.A. (1999) ARF mediates recruitment of PtdIns-4-OH kinase- $\beta$  and stimulates synthesis of PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> on the Golgi complex. *Nat.Cell Biol.* **1**, 280-287.
- Goley E.D., Welch M.D. (2006) The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **7**, 713-726.

Gomez M., De Castro E., Guarin E., Sasakura H., Kuhara A., Mori I., Bartfai T., Gargmann C.I., Nef P. (2001)  $Ca^{2+}$  Signaling via the Neuronal Calcium Sensor-1 Regulates Associative Learning and Memory in *C. elegans*. *Neuron* **30**, 241-248.

Gossen M., Bujard H. (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **89**, 5547-5551.

Grafelmann B. (2004) Frequenin- Untersuchungen zur Funktion eines neuronalen Calcium-bindenden Proteins. Dissertation, Universität Hamburg.

Graham F.L., Smiley J., Russel W.C., Nairn R. (1977) Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *J.Gen.Virol.* **36**, 59-72.

Gromada J., Bark C., Smidt K., Efanov A.M., Janson J., Mandic S.A., Webb D.-L., Zhang W., Meister B., Jeromin A., Berggren P.-O. (2005) Neuronal calcium sensor-1 potentiates glucose-dependent exocytosis in pancreatic  $\beta$  cells through activation of phosphatidylinositol 4-kinase  $\beta$ . *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **102**, 10303-10308

Guo W., Malin S.A., Johns D.C., Jeromin A., Nerbonne J.M. (2002) Modulation of Kv4-encoded  $K^+$  Currents in the Mammalian Myocardium by Neuronal Calcium Sensor-1. (2002) *J.Biol.Chem.* **277** (29), 26436-26443.

Hama H., Schnieders E.A., Thorner J., Takemoto J.Y., DeWald D.B. (1999) Direct Involvement of Phosphatidylinositol 4-Phosphate in Secretion in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* **274** (48), 34294-34300.

Hanley J.G., Khatri L., Hanson P.I., Ziff E.B. (2002) NSF ATPase and  $\alpha$ -/ $\beta$ -SNAPs Disassemble the AMPA Receptor-PICK1 Complex. *Neuron* **34**, 53-67.

Hauenschild A. (1997) Frequenin: Untersuchungen zur Struktur und Funktion eines neuronalen Proteins, 1. Auflage, Wissenschaft und Technik-Verlag, Berlin.

Haynes L.P., Fitzgerald D.J., Wareing B., O'Callaghan D.W., Morgan A., Burgoyne R.D. (2006) Analysis of the interacting partners of the neuronal calcium-binding proteins L-CaBP1, hippocalcin, NCS-1 and neurocalcin  $\delta$ . *Proteomics* **6**, 1822-1832.

Haynes L.P., Sherwood M.W., Dolman N.J., Burgoyne R.D. (2007) Specificity, Promiscuity and Localization of ARF Protein Interactions with NCS-1 and Phosphatidylinositol-4 Kinase-III $\beta$ . *Traffic* **8**, 1080-1092.

Haynes L.P., Thomas G.M.H., Burgoyne R.D. (2005) Interaction of Neuronal Calcium Sensor-1 and ADP-ribosylation Factor 1 Allows Bidirectional Control of Phosphatidylinositol 4-Kinase  $\beta$  and *trans*-Golgi Network-Plasma Membrane Traffic. *J.Biol.Chem.* **280** (7), 6047-6054.

Heine M., Groc L., Frischknecht R., Béique J.-C., Lounis B., Rumbaugh G., Huganir R.L., Cognet L., Choquet D. (2008) Surface Mobility of Postsynaptic AMPARs Tunes Synaptic Transmission. *Science* **320**, 201-205.

Hendricks K.B., Wang B.Q., Schnieders E.A., Thorner J. (1999) Yeast homologue of neuronal frequenin is a regulator of phosphatidylinositol-4-OH kinase. *Nat.Cell Biol.* **1**, 234-241.

Hilgemann D.W., Feng S., Nasuhoglu C. (2001) The Complex and Intriguing Lives of PIP2 with Ion Channels and Transporters. *Sci.STKE* **111**, re19.

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

Holt M., Varoqueaux F., Wiederhold K., Takamori S., Urlaub H., Fasshauer D., Jahn R. (2006) Identification of SNAP-47, a Novel Qbc-SNARE with Ubiquitous Expression. *J.Biol.Chem.* **281** (25), 17076-17083.

Horton AC, Ehlers MD (2003) Dual Modes of Endoplasmic Reticulum-toGolgi Transport in Dendrites Revealed by Live-Cell Imaging. *J.Neurosci.* **23** (15), 6188-6199.

Horton AC, Ehlers MD (2004) Secretory trafficking in neuronal dendrites **6** (7), 585-591.

Huber K.M., Roder J.C., Bear M.F. (2001) Chemical Induction of mGluR5- and Protein Synthesis-Dependent Long-Term Depression in Hippocampal Area CA1. *J.Neurophysiol.* **86**, 321-325.

Hui H., McHugh D., Hannan M., Zeng F., Xu S.-Z., Khan S.-u.-H., Levenson R., Beech D.J., Weiss J.L. (2006) Calcium-sensing mechanism in TRPC5 channels contributing to retardation of neurite outgrowth. *J.Physiol.* **572**, 165-172.

Huttner I.G., Strahl T., Osawa M., King D.S., Ames J.B., Thorner J. (2003) Molecular Interactions of Yeast Frequentin (Frq1) with the Phosphatidylinositol 4-Kinase Isoform, Pik1. *J.Biol.Chem.* **278** (7), 4862-4874.

Ikura M., Ames J.B. (2006) Genetic polymorphism and protein conformational plasticity in the calmodulin superfamily: Two ways to promote multifunctionality. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **103** (5), 1159-1164.

Inouse H., Nojima H., Okayama H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28.

Jeromin A., Muralidhar D., Parameswaran M.N., Roder J., Fairwell T., Scarlata S., Dowal L., Mustafi S.M., Chary K.V.R., Sharma Y. (2004) N-terminal Myristoylation Regulates Calcium-induced Conformational Changes in Neuronal Calcium Sensor-1. *J.Biol.Chem.* **279** (26), 27158-27167.

Jinno S., Jeromin A., Roder J., Kosaka T. (2002) Immunocytochemical localization of neuronal calcium sensor-1 in the hippocampus and cerebellum of the mouse with special reference to presynaptic terminals. *Neuroscience* **113** (2), 449-461.

- Jo J., Heon S., Kim M.J., Son G.H., Park Y., Henley J.M., Weiss J.L., Sheng M., Collingridge G.L., Cho K. (2008) Metabotropic Glutamate Receptor-Mediated LTD Involves Two Interacting Ca<sup>2+</sup> Sensors, NCS-1 and PICK1. *Neuron* **60**, 1095-1111.
- Jones S., Newman C., Liu F., Segev N. (2000) The TRAPP Complex Is a Nucleotide Exchanger for Ypt1 and Ypt31/32. *Mol.Biol.Cell* **11**, 4403-4411.
- Kabbani N., Negyessy L, Lin R., Goldman-Rakic P., Levenson R. (2002) Interaction with Neuronal Calcium Sensor NCS-1 Mediates Desensitization of the D2 Dopamine Receptor. *J.Neurosci.* **22** (19), 8476-8486.
- Kapp-Barnea Y., Melnikov S., Shefler I., Jeromin A., Sagi-Eisenberg R. (2003) Neuronal Calcium Sensor-1 and Phosphatidylinositol 4-Kinase  $\beta$  Regulate IgE Receptor-Triggered Exocytosis in Cultured Mast Cells. *J.Immunol.* **171**, 5320-5327.
- Katz B., Miledi R. (1970) Further study of the role of calcium in synaptic transmission. *J.Physiol.* **207**, 789-801
- Kersey P.J., Duarte J., Williams A., Karavidopoulou Y., Birney E., Apweiler R. The International Protein Index: An integrated database for proteomics experiments. *Proteomics* **4**, 1985-1988.
- Kim Y.-G. Raunser S., Munger C., Wagner J., Song Y.-L., Cygler M., Walz T., Oh B.H., Sacher M. (2006) The Architecture of the Multisubunit TRAPP I Complex Suggests a Model for Vesicle Tethering. *Cell* **127**, 817-830.
- Koh P.O., Undie A.S., Kabbani N., Levenson R., Goldman-Rakic P.S., Lidow M.S. (2003) Up-regulation of neuronal calcium sensor-1 (NCS-1) in the prefrontal cortex of schizophrenic and bipolar patients. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **100**, 313-317.
- Koizumi S., Rosa P., Willars G.B. Challiss R.A.J., Taverna E., Francolini M., Bootman M.D., Lipp P., Inoue K., Roder J., Jeromin A. (2002) Mechanisms Underlying the Neuronal Calcium Sensor-1-evoked Enhancement of Exocytosis in PC12 Cells. *J.Biol.Chem.* **277** (33), 30315-30324.
- Krestel H.E., Mayford M.R., Seeburg P.H., Sprengel R. (2001) A GFP-equipped bidirectional expression module well suited form monitoring tetracycline-regulated gene expression in mouse. *Nucleic Acids Res.* **29** (7), e39.
- Krestel H.E., Mihaljevic A.L.A., Hoffman D.A., Schneider A. (2004) Neuronal co-expression of EGFP and  $\beta$ -galactosidase in mice causes neuropathology and premature death. *Neurobiol. Dis.* **17**, 310-318.
- Kretsinger R.H., Nockolds C.E. (1973) Carp Muscle Calcium-binding Protein. *J.Biol.Chem.* **248** (9), 3313-3326.
- Krüger M, Mann M. (2006) SILAC Präzise Methode zur MS-basierten quantitativen Proteomanalyse. *BIOspektrum* **12**, 378-380.



## Literatur

---

Kümmel D., Heinemann U. (2008) Diversity in structure and function of tethering complexes: evidence for different mechanisms in vesicular transport regulation. *Curr. Protein Pept. Sci.* **9** (2), 197-209.

Kümmel D., Oeckinghaus A., Wang C., Krappmann D., Heinemann U. (2008) Distinct isocomplexes of the TRAPP trafficking factor coexist inside human cells. *FEBS Lett.* **582** (27), 3729-2733.

Lappe-Siefke C., Goebbels S., Gravel M., Nicksch E., Lee J., Braun P.E., Griffiths I.R., Nave K.-A. (2003) Disruption of *Cnp1* uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination. *Nat. Genet.* **33**, 366-374

Lappe-Siefke C., Loebrich S., Hevers W., Waidmann O.B., Schweizer M., Fehr S., Fritschy J.-M., Dikic I., Eilers J., Wilson S.M., Kneussel M. (2009) The Ataxia (*ax<sup>1</sup>*) Mutation Causes Abnormal GABA<sub>A</sub> Receptor Turnover in Mice. *PLoS Genet.* **5** (9), e1000631.

Lee T.D., Moore R.E., Young M.K. (2000) Introducing Symplexes Directly into Electrospray Ionization Mass Spectrometers Using Microscale Capillary Liquid Chromatography. *Curr. Protoc. Protein Sci.* 22:16.9.1-16.9.7.

Lein E.S., *et al.*, (2007). Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature*, 168-176

Li Y., Gamper N., Hilgemann D.W., Shapiro M.S. (2005) Regulation of Kv7 (KCNQ) K<sup>+</sup> Channel Open Probability by Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate. *J. Neurosci.* **25** (43), 9825-9835.

Lindemeier J. (1995) Flub und Flics: Zwei neue Frequenz-verbundene, an der Signaltransduktion beteiligte Calcium-bindende Proteine. Dissertation, Freie Universität Berlin.

Loh E., Peter F., Subramaniam V.N., Hong W. (2005) Mammalian Bet3 functions as a cytosolic factor participating in transport from the ER to the Golgi apparatus. *J. Cell Sci.* **118** (6), 1209-1222.

Lourenszen S., Jeromin A., Roder J., Blennerhassett M.G. (2002) Intestinal inflammation modulates expression of the synaptic vesicle protein neuronal calcium sensor-1. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **282**, G1097-G1104.

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

Lüscher C., Nicoll R.A., Malenka R.C., Muller D. (2000) Synaptic plasticity and dynamic modulation of the postsynaptic membrane. *Nat. Neurosci.* **3** (6), 545-550.

Martone M.E., Edelman V.M., Ellisman M.H., Nef P. (1999) Cellular and subcellular distribution of the calcium-binding protein NCS-1 in the central nervous system of the rat. *Cell Tiss. Res.* **295**, 395-407.

Mayford M., Bach M.E., Huang Y.-Y., Wang L., Hawkins R.D., Kandel E.R. (1996) Control of Memory Formation Through Regulated Expression of a CaMKII Transgene. *Science* **274**, 1678-1683.

McFerran B.W., Graham M.E., Burgoyne R.D. (1998) Neuronal Ca<sup>2+</sup> Sensor 1, the Mammalian Homologue of Frequentin, Is Expressed in Chromaffin and PC12 Cells and Regulates Neurosecretion from Dense-core Granules. *J.Biol.Chem.* **273** (35), 22768-22772.

McFerran B.W., Weiss J.L., Burgoyne R.D. (1999) Neuronal Ca<sup>2+</sup> Sensor 1 characterization of the myristoylated protein, its cellular effects in permeabilized adrenal chromaffin cells, Ca<sup>2+</sup>-independent membrane association, and interaction with binding proteins, suggesting a role in rapid Ca<sup>2+</sup> signal transduction. *J.Biol.Chem.* **274** (42), 30258-30265.

Meinrenken C.J., Borst J.G.G., Sakmann B. (2002) Calcium Secretion Coupling at Calyx of Held Governed by Nonuniform Channel–Vesicle Topography. *J.Neurosci.* **22** (5), 1648-1667.

Miller E.A. (2007) Vesicle tethering: TRAPPING transport carriers. *Curr.Biol.* **17** (6), R211-R213.

Mills J.C., Stone N.L., Erhardt J., Pittman R.N. (1998) Apoptotic Membrane Blebbing Is Regulated by Myosin Light Chain Phosphorylation. *J.Cell Biol.* **140** (3), 627-636.

Mora S., Durham P.L., Smith J.R., Russo A.F., Jeromin A., Pessin J.E. (2002) NCS-1 Inhibits Insulin-stimulated GLUT4 Translocation in 3T3L1 Adipocytes through a Phosphatidylinositol 4-Kinase-dependent Pathway. *J.Biol.Chem.* **277** (30), 27494-27500.

Morozova N., Liang Y., Tokarev A.A., Chen S.H., Cox R., Andrejic J., Lipatova Z., Sciorra V.A., Emr S.D., Segev N. (2006) TRAPP2 subunits are required for the specificity switch of a Ypt-Rab GEF. *Nat.Cell Biol.* **8** (11), 1263-1269.

Mosevitsky M.I., Capony J.P., Skladchikova G.Yu., Novitskaya V.A., Plekhanov A.Yu., Zakharov V.V. (1997) The BASP1 family of myristoylated proteins abundant in axonal termini. Primary structure analysis and physico-chemical properties. *Biochimie* **79**, 373-384.

Moult P.R., Gladding C.M., Sanderson T.M., Fitzjohn M., Bashir Z.I., Molnar E., Collingridge G.L. (2006) Tyrosine Phosphatases Regulate AMPA Receptor Trafficking during Metabotropic Glutamate Receptor-Mediated Long-Term Depression. *J.Neurosci.* **26** (9), 2544-2554.

Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* **51** (Pt1), 263-273.

Nadolski M.J., Linder M.E. (2007) Protein lipidation. *FEBS J.* **274**, 5202-5210.

## Literatur

---

- Nakamura T.Y., Coetzee W.A. (2008) Functional and pharmacological characterization of a Shal-related K<sup>+</sup> channel subunit in Zebrafish. *BMC Physiol.* **8**, 2
- Nakamura T.Y., Pountney D.J., Ozalta A., Nandi S., Ueda S., Rudy B., Coetzee W.A. (2001) A role for frequenin, a Ca<sup>2+</sup>-binding protein, as a regulator of Kv4 K<sup>+</sup>-currents. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **98** (22), 12808-12813.
- Nakamura T.Y., Sturm E., Pountney D.J., Orenzoff B., Argman M., Coetzee W.A. (2003) Developmental Expression of NCS-1 (Frequenin), a Regulator of Kv4 K<sup>+</sup> Channels, in Mouse Heart. *Pediatr.Res.* **53** (4), 554-557.
- O'Callaghan D.W., Burgoyne R.D. (2003) Role of myristoylation in the intracellular targeting of neuronal calcium sensor (NCS) proteins. *Biochem.Soc.Trans.* **31** (5), 963-965.
- O'Callaghan D.W., Burgoyne R.D. (2004) Identification of Residues That Determine the Absence of a Ca<sup>2+</sup>/Myristoyl Switch in Neuronal Calcium Sensor-1. *J.Biol.Chem.* **279** (14), 14347-14354.
- O'Callaghan D.W., Ivings L., Weiss J.L., Ashby M.C., Tepikin A.V., Burgoyne R.D. (2002) Differential Use of Myristoyl Groups on Neuronal Calcium Sensor Proteins as a Determinant of Spatio-temporal Aspects of Ca<sup>2+</sup> Signal Transduction. *J.Biol.Chem.* **277** (16), 14227-14237.
- O'Day D.H. (2003) CaMBOT: profiling and characterizing calmodulin-binding proteins. *Cell.Signal.* **15**, 347-354.
- O'Gorman S., Fox D.T., Wahl G.M. (1991) Recombinase-Mediated Gene Activation and Site-Specific Integration in Mammalian Cells. *Science* **251**, 1351-1355.
- Olafsson P., Soares H.D., Herzog K.-H., Wang T., Morgan J.I., Lu B. (1997) The Ca<sup>2+</sup> binding protein, frequenin is a nervous system-specific protein in mouse preferentially localized in neurites. *Mol.Brain.Res.* **44**, 73-82.
- Olafsson P., Wang T., Lu B. (1995) Molecular cloning and functional characterization of the *Xenopus* Ca<sup>2+</sup>-binding protein frequenin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **92**, 8001-8005.
- Oliet S.H.R., Malenka R.C., Nicoll R.A. (1997) Two Distinct Forms of Long-Term Depression Coexist in CA1 Hippocampal Pyramidal Cells. *Neuron* **18**, 969-982.
- Olsen J.V., de Godoy L.M.F., Li G., Macek B., Mortensen P., Pesch R., Makarov A., Lange O., Horning S., Mann M. (2005) Parts per Million Mass Accuracy on an Orbitrap Mass Spectrometer via Lock Mass Injection into a C-trap. *Mol.Cell.Proteomics* **4** (12), 2010-2021.
- Pan C.-Y., Jeromin A., Lundstrom K., Yoo S.H., Roder J., Fox A.P. (2002) Alterations in Exocytosis Induced by Neuronal Ca<sup>2+</sup> Sensor-1 in Bovine Chromaffin Cells. *J.Neurosci.* **22** (7), 2427-2433.

- Pan B., Zucker R.S. (2009) A General Model of Synaptic Transmission and Short-Term Plasticity. *Neuron* **62**, 539-554.
- Park M., Salgado J.M., Ostroff L., Helton T.D., Robinson C.G., Harris K.M., Ehlers M.D. (2006) Plasticity-Induced Growth of Dendritic Spines by Exocytic Trafficking from Recycling Endosomes. *Neuron* **52**, 817-830.
- Parlati F., McNew J.A., Fukuda R., Miller R., Söllner T.H., Rothman J.E. (2000) Topological restriction of SNARE-dependent membrane fusion. *Nature* **407**, 194-198.
- Paxinos G., Franklin K.B.J. (2001) The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. 2. Auflage, Academic Press, San Diego.
- Perkins D.N., Pappin D.J.C., Creasy D.M., Cottrell J.S. (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **20**, 3551-3567.
- Peters H.C., Hu H., Pongs O., Storm J.F., Isbrandt D. (2004) Conditional transgenic suppression of M channels in mouse brain reveals functions in neuronal excitability, resonance and behavior. *Nat.Neurosci.* **8** (1) 51-60.
- Pind S.N., Nuoffer C., McCaffery J.M., Plutner H., Davidson H.W., Farquhar M.G., Balch W.E. (1994) Rab1 and Ca<sup>2+</sup> Are Required for the Fusion of Carrier Vesicles Mediating Endoplasmic Reticulum to Golgi Transport. *J.Cell Biol.* **125** (2), 239-252.
- Pongs O., Lindemeier J., Zhu X.R., Theil T., Engelkamp D., Krah-Jentgens I., Lambrecht H.-G., Koch K.W., Schwemer J., Rivosecchi R., Mallart A., Galceran J., Canal I., Barbas J.A., Ferrus A. (1993) Frequentin—A Novel Calcium-Binding Protein That Modulates Synaptic Efficacy in the Drosophila Nervous System. *Neuron* **11**, 15-28.
- Rácz B., Blanpied T.A., Ehlers M.D., Weinberg R.J. (2004) Lateral organization of endocytic machinery in dendritic spines. *Nat.Neurosci.* **7** (9), 917-918.
- Rajebhosale M., Greenwood S., Vidugiriene J., Jeromin A., Hilfiker S. (2003) Phosphatidylinositol 4-OH Kinase Is a Downstream Target of Neuronal Calcium Sensor-1 in Enhancing Exocytosis in Neuroendocrine Cells. *J.Biol.Chem.* **278** (8), 6075-6084.
- Rappsilber J., Ishihama Y., Mann M. (2003) Stop and Go Extraction Tips for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, Nanoelectrospray, and LC/MS Sample Pretreatment in Proteomics. *Anal.Chem.* **75**, 663-670.
- Ren X., Shand S.H., Takimoto K. (2003) Effective Association of Kv Channel-interacting Proteins with Kv4 Channel Is Mediated with Their Unique Core Peptide. *J.Biol.Chem.* **278** (44), 43564-43570.
- Resh M.D. (1999) Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim.Biophys.Acta* **1451**, 1-16.

- Rivosecchi R., Pongs O., Theil T., Mallart A. (1994) Implication of frequenin in the facilitation of transmitter release in *Drosophila*. *J.Physiol.* **474**, 223-232.
- Robinson M.S. (2004) Adaptable adaptors for coated vesicles. *Trends Cell Biol.* **14** (4), 167-174.
- Rocks O., Peyker A., Kahms M., Verveer P.J., Koerner C., Mubierres M., Kuhlmann J., Waldmann H., Wittinghofer A., Bastiaens P.I.H. (2005) An Acylation Cycle Regulates Localization and Activity of Palmitoylated Ras Isoforms. *Science* **307**, 1746-1752.
- Rousset M., Cens T., Gavarini S., Jeromin A, Charnet P. (2003) Down-regulation of Voltage-gated Ca<sup>2+</sup> Channels by Neuronal Calcium Sensor-1 Is  $\beta$  Subunit-specific. *J.Biol.Chem.* **278** (9), 7019-7026.
- Sacher M., Barrowman J., Wang W., Horecka J., Zhang Y., Pypaert M., Ferro-Novick S. (2001) TRAPP I Implicated in the Specificity of Tethering in ER-to-Golgi Transport. *Mol. Cell* **7**, 433-442.
- Sacher M., Ferro-Novick S. (2001) Purification of TRAPP from *Saccharomyces cerevisiae* and Identification of Its Mammalian Counterpart. *Methods Enzymol.* **329**, 234-241.
- Sacher M., Kim Y.-G., Lavie A., Oh B.-H., Segev N. (2008) The TRAPP Complex: Insights into its Architecture and Function. *Traffic* **9**, 2032-2042.
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sambrook J., Russel D.W. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger F., Nicklen S, Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **74** (12) 5463-5467.
- Sannerud R., Marie M., Nizak C., Dale H.A., Pernet-Gallay K., Perez F., Goud B., Saraste J. (2006) Rab1 Defines a Novel Pathway Connecting the Pre-Golgi Intermediate Compartment with the Cell Periphery. *Mol.Biol.Cell* **17**, 1514-1526.
- Saraste J., Goud B. (2007) Functional Symmetry of Endomembranes. *Mol.Biol.Cell* **18**, 1430-1436.
- Sauer B. (1994) Site-specific recombination: developments and applications. *Curr.Opin.Biotechnol.* **5**, 521-527.
- Scalettar B.A., Rosa P., Taverna E., Francolini M., Tsuboi T., Terakawa S., Koizumi S., Roder J., Jeromin A. (2002) Neuronal calcium sensor-1 binds to regulated secretory organelles and functions in basal and stimulated exocytosis in PC12 cells. *J.Cell Sci.* **115** (11), 2399-2412.

Schaad N.C., De Castro E., Nef S., Hegi S., Hinrichsen R., Martone M.E., Ellisman M.H., Sikkink R., Rusnak F., Sygush J., Nef P. (1996) Direct modulation of calmodulin targets. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **93**, 9253-9258.

Schneggenburger R., Neher E. (2005) Presynaptic calcium and control of vesicle fusion. *Curr.Opin.Neurobiol.* **15**, 226-274.

Schroer T.A. (2004) Dynactin. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* **20**, 759-779.

Sciorra V.A., Audhya A., Parsons A.B., Segev N., Boone C., Emr S.D. (2005) Synthetic Genetic Array Analysis of the PtdIns 4-kinase Pik1p Identifies Components in a Golgi-specific Ypt31/rab-GTPase Signaling Pathway. *Mol.Biol.Cell* **16**, 776-793.

Senin I.I., Churumova V.A., Philippov P.P., Koch K.-W. (2007) Membrane binding of the neuronal calcium sensor recoverin – modulatory role of the charged carboxy-terminus. *BMC Biochem.* **8**, 24

Shahinian S., Silvius J.R. (1995) Doubly-Lipid-Modified Protein Sequence Motifs Exhibit Long-Lived Anchorage to Lipid Bilayer Membranes. *Biochemistry* **34** (11), 3813-3822.

Shi R., Kumar C., Zougman A., Zhang Y., Podtelejnikov A., Cox J., Wiśniewski J.R., Mann M. Analysis of the mouse Liver Proteome Using Advanced Mass Spectrometry. *J.Proteome Res.* **6**, 2963-2972.

Sippy T., Cruz-Martín A., Jeromin A., Schweizer F.E. (2003) Acute changes in short-term plasticity at synapses with elevated levels of neuronal calcium sensor-1. *Nat.Neurosci.* **6** (10), 1031-1038.

Smith R.D. (2006) Future directions for electrospray ionization for biological analysis using mass spectrometry. *BioTechniques* **41**, 147-148.

Snyder E.M., Philpot B.D., Huber K.M., Dong X., Fallon J.R., Bear M.F. (2001) Internalization of ionotropic glutamate receptors in response to mGluR activation. *Nat.Neurosci.* **4** (11), 1079-1085.

Stockebrand M.C., Pongs O. (2006) Frequenin: A Highly Conserved Protein with a Conserved Function? In: Philippov P.P., Koch K.W., Hrsg., *Neuronal Calcium Sensor Proteins*, Nova Science Publishers, New York.

Strahl T., Grafelmann B., Dannenberg J., Thorner J., Pongs O. (2003) Conservation of Regulatory Function in Calcium-binding Proteins. *J.Biol.Chem.* **278** (49), 49589-49599.

Strahl T., Huttner I.G., Lusin J.D., Osawa M., King D., Thorner J., Ames J.B. (2007) Structural Insights into Activation of Phosphatidylinositol 4-Kinase (Pik1) by Yeast Frequenin (Frq1). *J.Biol.Chem.* **282** (42), 30949-30959.

Street M., Marsh S.J., Stabach P.R., Morrow J.S., Brown D.A., Buckley N.J. (2006) Stimulation of G $\alpha_q$ -coupled M1 muscarinic receptor causes reversible spectrin redistribution mediated by PLC, PKC and ROCK. *J.Cell Sci.* **119** (8), 1528-1536.

## Literatur

---

- Sun J., Pang Z.P., Qin D., Fahim A.T., Adachi R., Südhof T.C. (2007) A dual-Ca<sup>2+</sup>-sensor model for neurotransmitter release in a central synapse. *Nature* **450**, 676-683.
- Takamori S., Holt M., Stenius K., Lemke E.A., Grønborg M., Riedel D., Urlaub H., Schenck S., Brügger B., Ringler P., Müller S.A., Rammer B., Gräter F., Hub J.S., De Groot B.L., Mieskes G., Moriyama Y., Klingauf J., Grubmüller H., Heuser J., Wieland F., Jahn R. (2006) Molecular Anatomy of a Trafficking Organelle. *Cell* **127**, 831-846.
- Tanaka T., Ames J.B., Harvey T.S., Stryer L., Ikura M. (1995) Sequestration of the membrane-targeting myristoyl group of recoverin in the calcium-free state. *Nature* **376**, 444-447
- Tanner V.A., Ploug T., Tao-Cheng J.-H. (1996) Subcellular Localization of SV2 and Other Secretory Vesicle Components in PC12 Cells by an Efficient Method of Preembedding EM Immunocytochemistry for Cell Cultures. *J.Histochem.Cytochem.* **44** (12), 1481-1488.
- Taverna E., Francolini M., Jeromin A., Hilfiker S., Roder J., Rosa P. (2002) Neuronal calcium sensor 1 and phosphatidylinositol 4-OH kinase  $\beta$  interact in neuronal cells and are translocated to membranes during nucleotide-evoked exocytosis. *J.Cell.Sci.* **115** (20), 3909-3922.
- Thelen M, Rosen A, Nairn A.C., Aderem A. (1991) Regulation by phosphorylation of reversible association of a myristoylated protein kinase C substrate with the plasma membrane. *Nature* **351**, 320-322.
- Tournaviti S., Hannemann S., Terjung S., Kitzing T.M., Stegmayer C., Ritzerfeld J., Walther P., Grosse R., Nickel W., Fackler O.T. (2007) SH4-domain-induced plasma membrane dynamization promotes bleb-associated cell motility. *J.Cell Sci.* **120** (21), 3820-3829.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **76** (9), 4350-4354.
- Towler D.A., Eubanks S.R., Towery D.S., Adams S.P. Glaser L. (1987) Amino-terminal Processing of Proteins by *N*-Myristoylation substrate specificity of *N*-myristoyl transferase. *J.Biol.Chem.* **262** (3), 1030-1036.
- Tsujimoto T., Jeromin A., Saitoh N., Roder J.C., Takahashi T. (2002) Neuronal Calcium Sensor 1 and Activity-Dependent Facilitation of P/Q-Type Calcium Currents at Presynaptic Nerve Terminals. *Science* **295**, 2276-2279.
- Vogel U.S., Thompson R.J. (1988) Molecular Structure, Localization, and Possible Functions of the Myelin-Associated Enzyme 2',3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiesterase. *J.Neurochem.* **50** (6), 1667-1677.
- Volchuk A., Ravazzola M., Perrelet A., Eng W.S., Di Liberto M., Varlamov O., Fukasawa M., Engel T., Söllner T.H., Rothman J.E., Orci L. (2004) Countercurrent Distribution of Two Distinct SNARE Complexes Mediating Transport within the Golgi Stack. *Mol.Biol.Cell* **15**, 1506-1518.

## Literatur

---

- Walch-Solimena C., Novick P. (1999) The yeast phosphatidylinositol-4-OH kinase Pik1 regulates secretion at the Golgi. *Nat.Cell Biol.* **1**, 523-525.
- Wang C.Y., Yang F., He X., Chow A., Du J., Russel J.T., Lu B. (2001) Ca<sup>2+</sup> Binding Protein Frequenin Mediates GDNF-Induced Potentiation of Ca<sup>2+</sup> Channels and Transmitter Release. *Neuron* **32**, 99-112.
- Wang W., Sacher M., Ferro-Novick S. (2000) TRAPP Stimulates Guanine Nucleotide Exchange on Ypt1p. *J.Cell Biol.* **151** (2), 289-295.
- Wang Y.J., Wang J., Sun H.Q., Martinez M., Sun Y.X., Macia E., Kirchhausen T., Albanesi J.P., Roth M.G., Yin H.L. (2003) Phosphatidylinositol 4 Phosphate Regulates Targeting of Clathrin Adaptor AP-1 Complexes to the Golgi. *Cell* **114**, 299-310.
- Weiss J.L., Archer D.A., Burgoyne R.D. (2000) Neuronal Ca<sup>2+</sup> Sensor-1/Frequenin Functions in an Autocrine Pathway Regulating Ca<sup>2+</sup> Channels in Bovine Adrenal Chromaffin Cells. *J.Biol.Chem.* **275** (51) 40082-40087.
- Weiss. J.L., Burgoyne R.D. (2001) Voltage-independent Inhibition of P/Q-type Ca<sup>2+</sup> Channels in Adrenal Chromaffin Cells via a Neuronal Ca<sup>2+</sup> Sensor-1-dependent Pathway Involves Src Family Tyrosine Kinase. *J.Biol.Chem.* **276** (48), 44804-44811.
- Winks J.S., Hughes S., Fikippov A.K. Tatulian L., Abogadie F.C., Brown D.A., Marsh S.J. (2005) Relationship between Membran Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate and Receptor-Mediated Inhibition of Native Neuronal M Channels. *J.Neurosci.* **25** (13), 3400-3413.
- Xia Z., Storm D.R. (2005) The Role of Calmodulin as a Signal Integrator for Synaptic Plasticity. *Nat.Rev.Neurosci.* **6**, 267-276.
- Xu D., Hay J.C. (2004) Reconstitution of COPII vesicle fusion to generate a pre-Golgi intermediate compartment. *J.Cell Biol.* **167** (6), 997-1003.
- Yu S., Satoh A., Pypaert M., Mullen K., Hay J.C., Ferro-Novick S. (2006) mBet3p is required for homotypic COPII vesicle tethering in mammalian cells. *J.Cell Biol.* **174** (3), 359-368.
- Zhang T., Hong W. (2001) Ykt6 Forms a SNARE Complex with Syntaxin 5, GS28, and Bet1 and Participates in a Late Stage in Endoplasmic Reticulum-Golgi Transport. *J.Biol.Chem.* **276** (29), 27480-27487.
- Zhang Y., MacLean J.N., An W.F., Lanning C.C., Harris-Warrick R.M. (2003) KChIP1 and Frequenin Modify *shal*-Evoked Potassium Currents in Pyloric Neurons in the Lobster Stomatogastric Ganglion. *J.Neurophysiol.* **89**, 1902-1909.
- Zhang Y, Zhang Y., Adachi J., Olsen J.V., Shi R., de Souza G., Pasini E., Foster L.J., Macek B., Zougman A., Kumar C., Wiśniewski J.R., Jun W., Mann M. (2007) MAPU: Max-Planck Unified database of organellar cellular, tissue and body fluid proteomes. *Nucleic Acids Res.* **35**, D771-D779.



## Literatur

---

Zhao X., Várnai P., Tuymetova G., Balla A., Tóth Z.E., Oker-Blom C., Roder J., Jeromin A., Balla T. (2001) Interaction of Neuronal Calcium Sensor-1 (NCS-1) with Phosphatidylinositol 4-Kinase  $\beta$  Stimulates Lipid Kinase Activity and Affects Membrane Trafficking in Cos-7 Cells. *J.Biol.Chem.* **276** (43), 40183-40189.

Zheng Q., Bobich J.A., Vidugiriene J., McFadden S.C., Thomas F., Roder J., Jeromin A. (2005) Neuronal calcium sensor-1 facilitates neuronal exocytosis through phosphatidylinositol 4-kinase. *J.Neurochem.* **92**, 442-451.

Zhu X.-D., Sadowski P.D. (1995) Cleavage-dependent Ligation by the FLP Recombinase. *J.Biol.Chem.* **270** (39), 23044-23054.

Zougman A., Pilch B., Podtelejnikov A., Kiehnopf M., Schnabel C., Kumar C., Mann M. (2008) Integrated Analysis of the Cerebrospinal Fluid Peptidome and Proteome. *J.Proteome Res.* **7**, 386-399.

Zucker R.S., Regehr W.G. (2002) Short-Term Synaptic Plasticity. *Annu.Rev.Physiol.* **64**, 335-405.

## Anhang

### A Abkürzungsverzeichnis

Ø	Durchmesser
µ	micro ( $10^{-6}$ )
Σ	Summe
x g	-fache Erdbeschleunigung ( $\times 9,81 \text{ m/s}^2$ )
°C	Grad Celsius
Å	Ångström, ( $10^{-10} \text{ m}$ )
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
Arf	ADP-Ribosilierungsfaktor
ARP	<i>actin related protein</i> , Actin verwandtes Protein
ATP	Adenosintriphosphat
$A_x$	Absorption <sub>Wellenlänge</sub>
bp	Basenpaare
BASP1	<i>brain acidic soluble protein 1</i>
BGH	<i>bovine growth hormone</i> , <i>bovines</i> Wachstumshormon
BRC	biosynthetisches recycling Kompartiment
BSA	<i>bovine serum albumine</i> , Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CA	<i>Cornu ammonis</i>
CaM	Calmodulin
CaMK	$\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CNP	cyclo-Nucleotid-Phosphodiesterase
Co-IP	Co-Immunpräzipitation
COP	<i>coat protein complex</i>
CTP	Cytosintriphosphat
Da	Dalton
dATP	2'-Desoxyadenosintriphosphat

## Anhang

---

dCTP	2'-Desoxycytidintriphosphat
DAB	3',3'-Diaminobenzidin
DG	<i>dentate gyrus, Gyrus dentatus</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	2'-Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMP	Dimethyl-pimelimidat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECACC	<i>European Collection of Cell Cultures</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	Enhanced GFP
EGTA	Ethylenglycol-bis( $\beta$ -Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERC	endocytotisches recycling Kompartiment
ERGIC	<i>ER-Golgi intermediate compartment</i>
f	femto ( $10^{-15}$ )
f.c.	<i>final concentration</i> , Endkonzentration
FCS	<i>fetal calf/cattle serum</i> , fötales Rinder-/Kälber-Serum
fEPSP	<i>field excitatory postsynaptic potential</i> , exzitatorisches postsynaptisches Feldpotential
FLAP	<i>Fil associated protein</i>
Flil	Flightless 1
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
FRT	<i>FLP Recombination Target</i>
g	Gramm
G	Guanosin
GAP	GTPase aktivierendes Protein

## Anhang

---

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GCAP	Guanylatcyclase aktivierendes Protein
GEF	Guaninnucleotid Austauschfaktor
GF	Gelfiltration (Gelchromatographie)
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GM-130	130kDa Golgi-Matrix-Protein
GRK	<i>G-protein coupled receptor kinase</i> , G-Protein-gekoppelter Rezeptor-Kinase
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-piperzino)-ethansulfonsäure
HEK	<i>human embryonic kidney</i> , embryonale humane Niere(n)
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
ILRAPL1	<i>interleukin 1 receptor accessory protein like 1</i>
IP	Immunpräzipitation
IPI	<i>international protein index</i>
ISI	inter-Stimulus-Intervall
kb	Kilobasenpaare
KChIP	<i>K-channel interacting protein</i> , Kalium-Kanal-interagierendes Protein
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
KO	<i>Knock out</i>
K <sub>v</sub>	Spannungsabhängiger Kaliumkanal
l	Liter
LB	Luria Bertani
LC	<i>liquid chromatography</i> , Flüssigchromatographie
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie-gekoppelte Tandem Massenspektroskopie
LTP	<i>long term potentiation</i> , Langzeitpotenzierung
LTD	<i>long term depression</i> , Langzeitdepression
m	milli (10 <sup>-3</sup> )
M	Molekulargewicht
M	Mol / l
MAPK	Mitogen aktivierte Protein Kinase

## Anhang

---

MEM	<i>minimal essential medium</i> , Minimalmedium
mGluR	metabotroper Glutamatrezeptor
min	Minute(n)
MLK	<i>mixed lineage kinase</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
MS	<i>mass spectrometry</i> , Massenspektroskopie
m/z	Masse-zu-(Elementar-)Ladungs-Verhältnis
n	nano ( $10^{-9}$ )
NCS	Neuronaler Calcium Sensor
NCS1E	NCS-1-EGFP
NEM	n-ethylmaleimid
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernspinresonanz
NMT	N-Myristyltransferase
NOS	<i>nitric oxide synthase</i> , NO (Stickstoffmonoxid)-Synthase
NSF	<i>NEM-sensitive factor</i> , oder <i>NEM sensitive fusion protein</i>
Nt	Nucleotid(e)
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte <sub>Wellenlänge</sub>
ORF	<i>open reading frame</i> , offener Leserahmen
p	pico ( $10^{-12}$ )
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PDB	<i>protein data base</i>
PDE	Phosphodiesterase
PDI	Proteindisulfid-Isomerase
PEG	Polyethylenglycol
Phar	<i>phosphatase and actin regulatory protein</i>
PI4K	PI 4-Kinase
PI	Phosphatidylinositol
PI(4)P	Phosphatidylinositol-(4)-Phosphat
PI(4,5)P <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-(4,5)-Bisphosphat
PICK	<i>protein interacting with C-kinase</i>
PIPES	Peperazin-N',N'-bis[2-ethansulfonsäure]
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

## Anhang

---

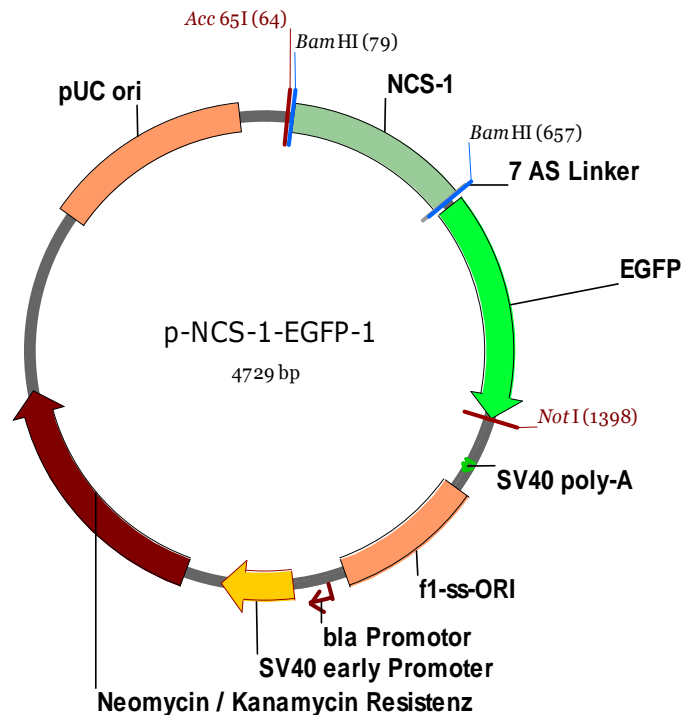
PP	<i>perforant path, Tractus perforans</i>
PPF	<i>paired pulse facilitation, Doppelpuls-Fazilitierung</i>
PPD	<i>paired pulse depression, Doppelpuls-Depression</i>
PSD	postsynaptische Dichte
rab	<i>ras related in brain</i>
ras	<i>rat sarcoma</i>
Rn	<i>Rattus norvegicus</i>
RNA <sub>i</sub>	RNA-Interferenz
si-RNA	<i>small interfering RNA</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat</i>
SNAP	<i>soluble NSF attachment protein, (z.B. α-SNAP)</i>
SNAP	<i>synaptosomal associated protein, Synaptosomal assoziiertes Protein (z.B. SNAP-25, SNAP-47)</i>
SNARE	<i>SNAP-Rezeptor (Soluble NSF-attachment protein Receptor)</i>
S.	<i>Stratum</i>
tTA	<i>tetracycline-controlled transactivator</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TE	Tris-EDTA
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskop
Tet	Tetracyclin
tg	<i>transgenic, transgen</i>
TGN46	46kDa <i>trans</i> -Golgi-Netzwerk Protein
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TRAPP	<i>transport protein particle</i>
TRE	Tet-responsives Element
TRP	<i>transient receptor potential, transientes rezeptor Potential</i>
tTA	Tetrazyklin-kontrollierter Transaktivator
U	<i>Unit, Enzymeinheit</i>
ü.N.	über Nacht
U/min	Umdrehungen pro Minute

## Anhang

---

V	Volt, Volumen
V-ATPase	vacuoläre H <sup>+</sup> ATPase
VILIP	<i>visinin like protein</i>
VSV	Vesicular Stomatitis Virus
VSV-G	Hüllen-Glycoprotein des VSV
VTC	<i>vesicular-tubular cluster</i>
v/v	<i>volume per volume</i> , Volumen pro Volumen
wt	Wildtyp
w/v	<i>weight per volume</i> , Gewicht pro Volumen
<i>X. laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>
ZMNH	Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg

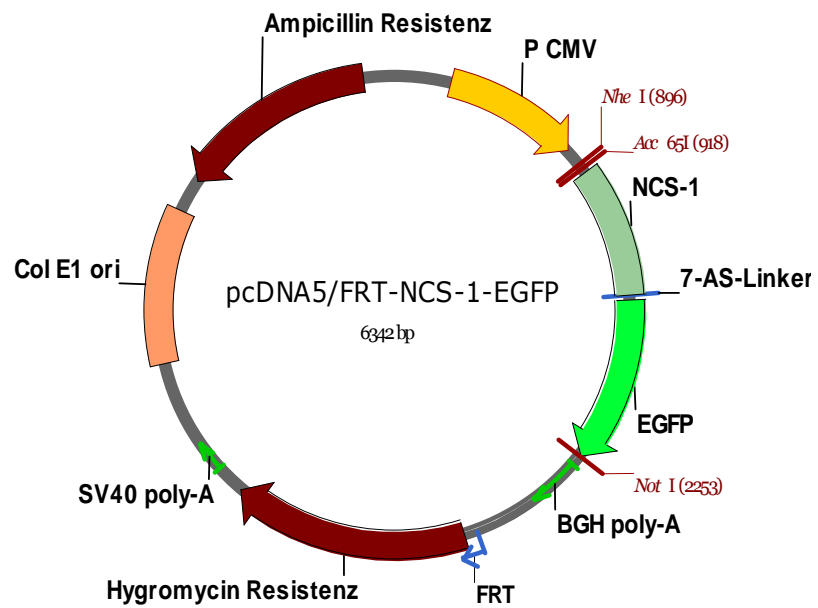
## B Plasmid-Konstrukte



### p-NCS-1-EGFP und p-NCS-1(G2A)-EGFP

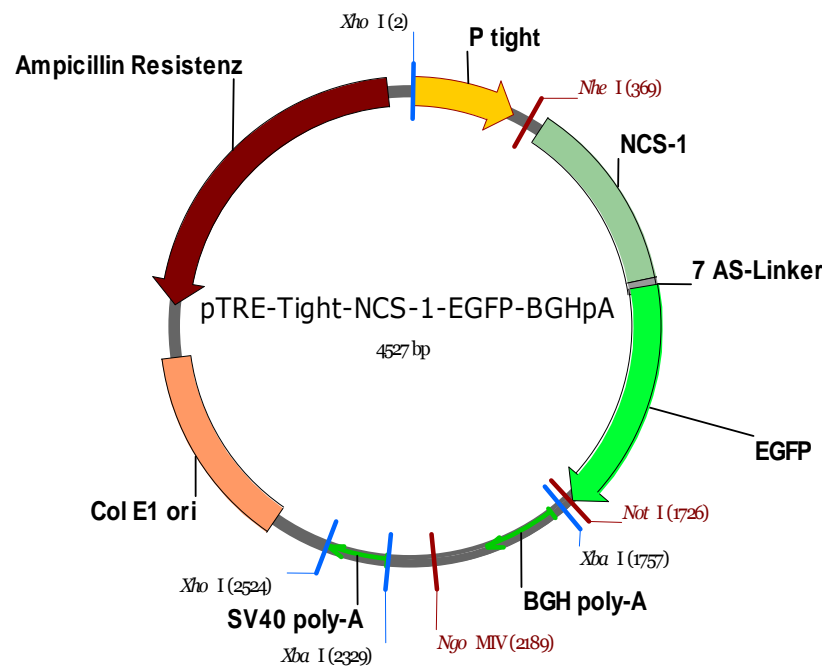
Durch Verwendung der Oligonucleotide *Bam*HI-NCS-1\_fw und *Bam*HI-NCS-1\_rv wurde in einer PCR, mit pSK<sup>-</sup>-flup (Lindemeier, 1995) als Matritze, eine von *Bam*HI-Schnittstellen flankierte, den NCS-1-codierenden Bereich vollständig enthaltende, NCS-1 cDNA (GenBank *acc. no.* nm\_024366) amplifiziert. Es wurde dabei unmittelbar an das Codon für das C-terminale Valin eine *Bam*HI-Schnittstelle angefügt, die das Stop-Codon ersetzte. Nach *Bam*HI-Restriktion wurde dieses Fragment in das mit *Bam*HI geschnittene Plasmid pEGFP-1 kloniert und es entstand p-NCS-1-EGFP. Dabei wurde der NCS-1-Leserahmen so mit dem EGFP-Leserahmen verknüpft, das ein NCS-1-EGFP-Fusionsprotein codiert wurde. Das Plasmid p-NCS-1(G2A)-EGFP, in der die NCS-1 cDNA die G2A Mutation enthält wurde auf die gleiche Weise erzeugt, allerdings wurde anstelle des Oligonucleotids *Bam*HI-NCS-1\_fw das Oligonucleotid *Bam*HI-G2A\_fw in der PCR eingesetzt. Die Karte zeigt funktionelle Elemente des Vektors, sowie die verwendeten Restriktionsschnittstellen. Unitäre Schnittstellen (*Acc*65I, *Not*I) sind rötlich dargestellt. sind eingezeichnet. Ori – Replikationsursprung; AS – Aminosäure; bla –  $\beta$ -Lactamase; ss – Einzelstrang; f1 – F1 Phage, SV40 – *Simian Virus* 40; poly-A – poly-Adenylierungsstelle.





**pcDNA5/FRT-NCS-1-EGFP und pcDNA5/FRT-NCS-1(G2A)-EGFP**

Ein durch *Acc65I*- und *NotI*-Restriktion aus pcNCS-1-EGFP-1 enthaltene 1235 bp Fragment, mit der cDNA für NCS-1-EGFP oder NCS-1(G2A)-EGFP wurde in die *Acc65I*- und *NotI*-Schnittstellen des Plasmids pcDNA5/FRT (Invitrogen) kloniert.



#### pTRE-Tight-NCS-1-EGFP-BGHpA

Ein durch *Xba*I-Restriktion aus pcDNA5/FRT (Invotrogen) isoliertes 572 bp Fragment, das das BGH poly-Adenylierungssignal enthielt, wurde in die *Xba*I-Restriktionsschnittstelle des Plasmids pTRE-Tight (ligiert, so dass das Plasmid pTRE-Tight-BGHpA entstand. Anschließend wurde aus dem Plasmid pcDNA5/FRT-NCS-1-EGFP durch *Nhe*I und *Not*I Restriktion das, die cDNA für das NCS-1-EGFP-Fusionsproteins enthaltende 1357 bp Fragment in die *Nhe*I und *Not*I Schnittstellen des Plasmids pTight-BGHpA kloniert.

## C Oligonucleotide

Bezeichnung	Sequenz	Beschreibung
Terd1	5'-CAAATGTTGCTTGTCTGGTG-3'	Genotypisierung
Terd2	5'GTCAGTCGAGTGCACAGTTT-3'	Genotypisierung
NCS1E_fw	5'-ATGTCGAGGTAGGCGTGTA-3'	Genotypisierung
NCS1E_rv	5'-CGGTGGTGCAGATGAACTT-3'	Genotypisierung
ttA6c	5'-CGCTGTGGGGCATTCTTACTTTAG-3'	Genotypisierung
ttA7nc	5'-CATGTCCAGATCGAAATCGTC-3'	Genotypisierung
GFP11	5'-GGACAGGGCCATCGCCAATTGG-3'	Genotypisierung
GFP12	5'-CAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGC-3'	Genotypisierung
BamHI-NCS1_fw	5'-ATAGGATCCATGGGGAAATCCAACAGCAAG-3'	BamHI-NCS-1- BamHI Fragment
BamHI-G2A_fw	5'-ATAGGATCCATGGCGAAATCCAACAGCAAG-3'	BamHI-NCS-1(G2A)- BamHI Fragment
BamHI-NCS1_rv	5'-ATAGGATCCCCTACCAGCCCGTCGTAGAG-3'	BamHI-NCS-1- BamHI Fragment

## D In der nano-LC-MS/MS-Analyse identifizierte Proteine

Proteine die nur in dem Experiment mit NCS-1-EGFP-exprimierenden Mäusen identifiziert wurden, nicht jedoch in dem Kontrollexperiment mit EGFP-exprimierenden und Wildtyp-Mäusen

IPI Accession	M / Da	Beschreibung	Peptide pro Bande					
			20 kDa	45 kDa	55 kDa	110 kDa	130 kDa	250 kDa
IPI00133206.1	49462	26S protease regulatory subunit 6A	0	0	6	0	0	0
IPI00135640.1	45597	26S protease regulatory subunit 8	0	0	11	0	0	0
IPI00126048.1	42782	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13	0	7	0	0	0	0
IPI00117569.2	18459	40S ribosomal protein S11	5	0	0	0	0	0
IPI00319231.3	16898	40S ribosomal protein S15	3	0	0	0	0	0
IPI00331461.3	20109	60S ribosomal protein L11	2	0	0	0	0	0
IPI00222547.5	15593	60S ribosomal protein L28	7	0	0	0	0	0
IPI00230623.7	15719	60S ribosomal protein L32	3	0	0	0	0	0
IPI00111412.2	46993	60S ribosomal protein L4	0	0	10	0	0	0
IPI00122413.2	21868	60S ribosomal protein L9	2	0	0	0	0	0
IPI00114593.1	41992	Actin, alpha cardiac muscle 1	0	5	0	0	0	0
IPI00221528.1	41977	ACTIN, CYTOPLASMIC TYPE 5 homolog	0	3	0	0	0	0
IPI00169851.3	75694	actin-binding LIM protein 1	0	0	0	4	0	0
IPI00762199.1	75538	Actin-binding LIM protein 2	0	0	0	2	0	0
IPI00137206.1	46192	Actin-related protein 10	0	3	0	0	0	0
IPI00153740.1	38093	Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1	0	2	0	0	0	0
IPI00137087.5	202110	ADP-ribosylation factor guanine nucleotide-exchange factor 2	0	0	0	0	0	2
IPI00121575.1	47374	Alpha-1,3-mannosyltransferase ALG2	0	2	0	0	0	0
IPI00118022.1	17007	AP-2 complex subunit sigma-1	2	0	0	0	0	0
IPI00120684.2	21381	Apoptosis regulator BAX, membrane isoform alpha	2	0	0	0	0	0
<b>IPI00113895.1</b>	42587	<b>ARP1, Alpha-centractin</b>	0	<b>11</b>	0	0	0	0
IPI00115627.3	47196	ARP3, Actin-like protein 3	0	0	2	0	0	0
IPI00380734.2	47549	<b>ARP3B, actin-related protein 3 B</b>	0	0	<b>6</b>	0	0	0
IPI00127987.1	41600	ARPC1, ARP 2/3 complex subunit 1A	0	2	0	0	0	0
<b>IPI00124829.4</b>	20380	<b>ARPC3, ARP 2/3 complex subunit 3</b>	<b>5</b>	0	0	0	0	0
IPI00134371.1	73838	ATP-dependent RNA helicase DDX3Y	0	0	0	3	0	0
<b>IPI00129519.2</b>	21943	<b>BASP1, Brain acid soluble protein 1</b>	0	0	<b>9</b>	0	0	0
<b>IPI00115056.1</b>	20289	<b>Bet3, Trafficking protein particle complex subunit 3, TRAPPC3</b>	<b>5</b>	0	0	0	0	0
IPI00622726.2	233857	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2B	0	0	0	0	0	2
IPI00108049.2	48394	C6orf152 homolog, (Lebercilin Isoform 2)	0	0	0	0	0	2
IPI00109203.3	37671	CD2 antigen cytoplasmic tail-binding protein 2	0	0	4	0	0	0
IPI00162949.1	23583	CDP-diacylglycerol--inositol 3-phosphatidyltransferase	3	0	0	0	0	0
IPI00115490.1	41641	Choline-phosphate cytidylyltransferase A	0	4	0	0	0	0
IPI00421085.1	59287	Cleavage and polyadenylation specificity factor 6	0	0	0	3	0	0
IPI00139637.1	20185	Coatomer subunit zeta-1	3	0	0	0	0	0
IPI00788462.1	25975	complement component 1, q subcomponent, gamma polypeptide	0	0	4	0	0	0
IPI00221725.1	54341	Coronin-2B	0	0	4	0	0	0
IPI00132208.1	44839	DnaJ homolog subfamily A member 1	0	0	4	0	0	0

## Anhang

IPI00131539.1	39095	<i>DnaJ homolog subfamily B member 5</i>	0	3	0	0	0	0
IPI00137212.8	20127	<b>Dynactin subunit 5</b>	4	0	0	0	0	0
IPI00115663.1	141636	<i>Dynactin-1</i>	0	0	0	0	0	3
IPI00229977.1	39464	<b>ELAV-like protein 4, Isoform 2</b>	0	5	0	0	0	0
IPI00380510.2	83009	<i>Enscosin, Isoform 2</i>	0	0	0	0	2	0
IPI00330477.4	60360	<b>Epsin-1, Isoform 2</b>	0	0	0	6	0	0
IPI00420975.1	175547	<i>FHOS2L splicing variant</i>	0	0	0	0	0	2
<b>IPI00117277.2</b>	71544	<b>FLAP1, Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 1, Isoform 2</b>	0	0	0	18	0	0
<b>IPI00467104.2</b>	144712	<b>Flii, flightless-1</b>	0	0	0	0	0	7
IPI00133580.1	39346	<i>fructose-bisphosphate aldolase</i>	0	2	0	0	0	0
IPI00279443.1	75167	<i>Heat shock 70 kDa protein 12A</i>	0	0	0	3	0	0
IPI00133208.3	70992	<i>Heat shock 70 kDa protein 1L</i>	0	0	0	2	0	0
IPI00387494.1	69884	<i>heat shock protein 2</i>	0	0	0	5	0	0
IPI00331546.2	69698	<i>Heat shock-related 70 kDa protein 2</i>	4	0	0	0	0	0
IPI00322304.5	61371	<i>Histidine-rich glycoprotein HRG</i>	0	0	0	3	0	0
IPI00115831.1	17584	Histone deacetylase complex subunit SAP18	7	0	0	0	0	0
IPI00230264.4	15002	<i>Histone H2A.x</i>	3	0	0	0	0	0
IPI00776012.1	89918	<i>Hmnr protein</i>	4	0	0	6	5	0
IPI00117087.1	44565	<i>Hsp90 co-chaperone Cdc37</i>	0	0	3	0	0	0
IPI00403586.3	45711	<i>hypothetical Lipolytic enzymes/Esterase/lipase/thioesterase family</i>	0	0	3	0	0	0
IPI00111509.1	42214	<b>hypothetical Oxidoreductase, N-terminal containing protein</b>	0	7	0	0	0	0
IPI00408909.3	299957	<i>Hypothetical protein</i>	0	0	0	0	0	2
IPI00785509.1	26592	<i>Hypothetical protein</i>	0	0	2	0	0	0
IPI00808449.1	291965	<i>hypothetical protein LOC70799</i>	2	0	0	0	0	0
IPI00664150.1	10654	<i>Ig heavy chain V region 914</i>	0	0	2	0	0	0
IPI00108830.1	13887	<i>Ig heavy chain V region HPCM6</i>	2	0	0	0	0	0
IPI00556888.1	25702	<i>Igk-C protein</i>	0	0	2	0	0	0
IPI00380780.7	149489	<i>inhibitor of kappa light polyp</i>	0	0	0	0	0	3
IPI00311598.3	73337	<b>JANUS KINASE AND MICROTUBULE-INTERACTING PROTEIN 1</b>	0	0	0	0	2	0
IPI00347110.2	58875	<i>Keratin 73</i>	2	0	0	0	0	0
IPI00124945.1	47082	<i>Keratin, type I cuticular Ha1</i>	0	2	0	0	0	0
IPI00331459.1	55723	<i>Keratin, type II cuticular Hb5</i>	2	4	0	0	0	0
IPI00322209.4	54400	<i>Keratin, type II cytoskeletal 8</i>	0	3	0	0	0	0
IPI00753928.1	68777	<i>Klc2 protein</i>	0	0	0	3	0	0
IPI00620145.1	68253	<i>Lysyl-tRNA synthetase</i>	0	0	0	5	0	0
IPI00115240.1	27151	<i>Myelin basic protein, Isoform 1</i>	2	0	0	0	0	0
IPI00118120.1	217112	<i>Myosin-5A</i>	0	0	0	0	2	0
IPI00331299.9	80270	<i>Neurochondrin</i>	0	0	0	2	0	0
<b>IPI00113521.4</b>	21791	<b>Neuronal calcium sensor 1</b>	3	11	13	2	2	3
IPI00137943.1	71396	<i>numb, Isoform 1</i>	0	0	0	3	0	0
<b>IPI00280984.5</b>	64835	<b>Numb1, Numb-like protein</b>	0	0	0	11	0	0
<b>IPI00480534.1</b>	73981	<b>Phosphatase and actin regulator 1, isoform 1</b>	2	3	0	17	0	0
IPI00468999.4	51280	<i>Phosphatidate cytidyltransferase 2</i>	0	4	0	0	0	0
IPI00315538.5	58401	<i>phosphoribosyl pyrophosphate synthetase-associated protein 1</i>	0	7	0	0	0	0
IPI00761930.1	81669	<i>Prolyl endopeptidase</i>	0	0	0	3	0	0
IPI00465946.1	45321	<i>Protein FAM98B</i>	0	0	2	0	0	0
IPI00263822.7	40682	<i>protein kinase, cAMP dependent, catalytic, beta</i>	0	3	0	0	0	0
IPI00127408.2	23417	<i>Rac1</i>	2	0	0	0	0	0
<b>IPI00114560.4</b>	22532	<b>Rab-1A</b>	7	0	0	0	0	0
IPI00408892.2	23475	<i>Rab-7</i>	2	0	0	0	0	0
IPI00315463.3	21476	<i>Receptor expression enhancing protein 5</i>	2	0	0	0	0	0

## Anhang

IPI00474959.2	41014	<i>reticulocalbin 2, full insert sequence</i>	0	3	0	0	0	0
IPI00338964.3	116437	<i>Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2, Isoform SERCA2B</i>	0	0	0	0	3	0
IPI00133374.4	48191	<i>Sequestosome-1, Isoform 1</i>	0	0	2	0	0	0
<i>IPI00318204.4</i>	34812	<i>Sid6061p</i>	0	5	0	0	0	0
IPI00115992.1	13700	<i>similar to 40S ribosomal protein S25</i>	3	0	0	0	0	0
<i>IPI00338382.4</i>	173963	<i>similar to Filaggrin</i>	8	0	0	11	9	0
IPI00224251.5	34639	<i>similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 isoform 2</i>	0	2	0	0	0	0
IPI00461800.1	37219	<i>similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 1</i>	0	3	0	0	0	0
IPI00674753.2	17544	<i>similar to Ig heavy chain V region 345 precursor</i>	0	0	2	0	0	0
IPI00757582.1	108667	<i>similar to Mitogen-activated protein kinase kinase 9; MLKL1</i>	0	0	0	0	3	3
<i>IPI00753099.1</i>	21645	<i>similar to Myosin light polypeptide 6</i>	0	4	0	0	0	0
IPI00755239.1	746533	<i>similar to Nebulin</i>	0	0	0	0	0	2
IPI00757392.1	37482	<i>similar to Protein FRA10AC1 homolog</i>	0	0	0	0	0	2
IPI00137687.3	16550	<i>similar to ribosomal protein L27a</i>	4	0	0	0	0	0
IPI00753466.1	333979	<i>similar to Ubiquitin-protein ligase EDD1</i>	0	0	0	0	0	2
<b>IPI00269408.1</b>	46495	<b>SNAP-47, Isoform-1</b>	0	0	<b>10</b>	0	0	0
IPI00221540.1	37848	<i>SPFH domain-containing protein 2 precursor</i>	0	2	0	0	0	0
IPI00331163.8	18700	<i>S-phase kinase-associated protein 1A</i>	5	0	0	0	0	0
IPI00454001.4	85094	<i>Sterile alpha and TIR motif-containing protein 1, Isoform 3</i>	0	0	0	2	0	0
IPI00134492.4	52818	<i>Synapsin-2, Isoform IIb</i>	0	0	0	3	0	0
IPI00128867.2	33750	<i>Transcriptional activator protein Pur-beta</i>	0	2	0	0	0	0
IPI00315100.1	21768	<i>Transforming protein RhoA precursor</i>	2	0	0	0	0	0
IPI00119478.1	39478	<i>Tropomodulin-3</i>	0	4	0	0	0	0
<i>IPI00117348.4</i>	50804	<i>Tubulin alpha-2 chain</i>	0	0	4	0	5	0
<i>IPI00117350.1</i>	49892	<i>Tubulin alpha-4 chain</i>	0	7	14	0	0	0
IPI00122350.3	31683	<i>U1 small nuclear ribonucleoprotein A</i>	2	0	0	0	0	0
IPI00123376.1	17351	<i>U1 small nuclear ribonucleoprotein C</i>	2	0	0	0	0	0
IPI00407692.2	68667	<i>V-ATPase, subunit A, isoform 1</i>	0	0	0	9	0	0

## E Gefahrstoffliste

Gefahrstoff	Klasse	R-Sätze	S-Sätze
Acetonitril	F,Xn	11-20/21/22-36	16-36/37
Acrylamid / bis-Acrylamid Lösung (40%ig, Mix 37,5:1)	T	45-46-20/21-25-36/38-43- 48/23/24/25-62	53-26-36/37-45
APS	O,Xn	8-22-36/37/38-42/43	22-24-26-37
Ampicillin	Xn	36/37/38-42/43	22-26-36/37
Bromphenolblau			22-24/25
CaCl <sub>2</sub>	Xi	36	26
Coomassie (kolloidal)	Xi	36/37/38	45
<i>p</i> -Coumarsäure	Xi	36/37/38	26-36
DAB (SIGMAfast)	Xn	22-36/37/38	26-36/37
DAPI			22-24/25
DMSO	Xi	36/37/38	23-26-36
DMP	Xi	38	22-24/25
Cresol rot	Xi	36/37/38	26-36
DTT	Xn	22-36/37/38	26-36
EDTA	Xi	36-52/53	26-61
EGTA			22-24/25
Essigsäure (Eisessig)	C	10-35	23-26-45
Ethanol	F	11	7-16
Ethidiumbromid	T+	22-26-36/37/38-68	26-28-36/37-45
Formamid	T	61	53-45
Glutardialdehyd (25% Lösung)	T	22-23-34-42/43	23-26-36/37/39-45
HCl (36,5-38,0%)	C	34-37	26-36/37/39-45
HCl (1M)	Xi	36/37/38	26
Hygromycin B	Xn	36-21/22-42/43	26-28-45
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Xn	22-41	26-39
KCl			22-24/25
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>			22-24/25
Luminol	Xi	36/37/38	26-36/37
$\beta$ -Mercaptoethanol	T,N	20/22-24-34-51/53	26-36/37/39-45-61
Methanol	F,T	11-23/24/25-39/23/24/25	7-16-36/37-45

## Anhang

---

<b>Gefahrstoff</b>	<b>Klasse</b>	<b>R-Sätze</b>	<b>S-Sätze</b>
NaOH (Pellets)	C	35	26-37/39-45
NP40	Xi	37-41	26-39
Paraformaldehyd	Xn	20/22-37/38-40-41-43	26-36/37/39-45
Penicillin G	Xn	42/43	22-36/37-45
(Alexa-532-) Phalloidin	T	24-20-22	45-36/37-24/25
PIPES			22-24/25
Saponin	Xn	36/37	26-37/39
SDS	F,Xn	11-21/22-36/37/38	26-36/37
Streptomycin	Xn	22	
TEMED	F,C	11-20/22-34	16-26-36/37/39-45
Triethanolamin	Xi	36/37/38	26
Triton X-100	Xn,N	22-41-51/53	26-36/39-61
Xylencyanol	Xi	36/37/38	26
Xylolersatz (Roti <sup>®</sup> -Histol)	Xn,N	10-38-43-50/53-65	2-24-37-60-61-62
Zeocin	Xn	21/22	24-36-37-39



## F Publikationen und Kongressbeiträge

Nalaskowski M.M., Bertsch U., Fanick W., Stockebrand M.C., Schmale H., Mayr G.W. (2003) Rat Inositol 1,4,5-Trisphosphate 3-Kinase C is Enzymatically Specialized for Basal Cellular Inositol Trisphosphate Phosphorylation and Shuttles Actively between Nucleus and Cytoplasm. *J. Biol. Chem.* **278** (22), 19765-19776.

Nalaskowski M.M., Windhorst S., Stockebrand M.C., Mayr G.W. (2006) Subcellular localisation of human inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase C: species-specific use of alternative export sites for nucleo-cytoplasmic shuttling indicates divergent roles of the catalytic and N-terminal domains. *Biol. Chem.* **387**, 583-593.

Stockebrand M.C., Pongs O. (2006) Frequentin: A Highly Conserved Protein with a Conserved Function? *In: Phillippov P.P., Koch K.W., Hrsg., Neuronal Calcium Sensor Proteins*, Nova Science Publishers, New York.

Stockebrand M., Pongs O. (2006) Myristoylation dependent membrane localization of neuronal calcium sensor NCS-1, Fifth Forum of European Neuroscience, Wien, 8.-12. Juli 2006.

Stockebrand M.C., Zougman A., Mann M., Pongs O. (2008) Analysis of NCS-1 interactions using transgenic mice expressing NCS-1-EGFP fusion protein in forebrain, Tenth Meeting of the European Calcium Society, Leuven, 17.-20. September 2008.

Stockebrand M., Hermainski J., Pongs O. (2009) Interaction Partners of Neuronal Calcium Sensor-1 in the mouse, European Calcium Society Workshop, Smolenice, 3.-6. Juni 2009.

Hermainski J., Stockebrand M., Pongs O. (2009) Synaptic plasticity in NCS-1 knock-out and NCS-1-EGFP overexpressing mice, European Calcium Society Workshop, Smolenice, 3.-6. Juni 2009.

## Danksagung

Mein Dank gilt Hr. Prof. Dr. Olaf Pongs für die Überlassung des spannenden Themas und für die Betreuung der Arbeit, sowie für die Unterstützung während der langen Zeit dieser Promotion. Ich danke Hr. Prof. Dr. Uli Hahn für die Bereitschaft, diese externe Dissertation als Vertreter des Departments Chemie der Universität Hamburg zu betreuen. Mein Dank gilt Hr. Dr. Alexandre Zougman und Hr. Prof. Dr. Matthias Mann vom MPI in Martinsried für die Kooperation und die Durchführung der massenspektroskopischen Analysen. Fr. Dr. Eka Lepsveridze und Hr. Dr. Alexander Dityatev danke ich für die Kooperation und die Durchführung der elektrophysiologischen Messungen. Ich bedanke mich bei den Mitarbeitern des Instituts für die gute Zusammenarbeit. Bei den Mitarbeitern der Service-Einrichtungen des ZMNH und bei den Tierpflegern im Zentrum sowie im UKE bedanke ich mich ebenfalls für die gute Zusammenarbeit.

Besonderer Dank gilt auch meiner Familie, meiner Frau und meinen Eltern und meinen Schwestern für die Unterstützung und die Geduld.

Nicht zuletzt bin ich auch der Stadt, dem Land und dem Staat (also letztlich dem Steuerzahler) dankbar, für die Möglichkeit naturwissenschaftlich arbeiten zu können und (wenn auch nicht immer besonders gut bezahlt) faszinierende molekulare Zusammenhänge des Lebens erforschen zu können.