

Universitätsklinikum Hamburg - Eppendorf
Institut für Humangenetik
Direktor: Prof. Dr. med. A. Gal

Untersuchungen zur Funktion und
subzellulären Lokalisation von PIST
(PDZ domain protein interacting
specifically with TC10) in Neuronen

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:
Enno Gößling
aus Meyrin/Genf

Hamburg 2011

Angenommen von der medizinischen Fakultät am: 18. Juni 2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. rer. nat. H.-J. Kreienkamp

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Jörg Heeren

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: Prof. Dr. Matthias Kneussel

Abbildungsverzeichnis	v
Abkürzungsverzeichnis	vii
1 Grundlagen und Zielsetzung	1
2 Material und Methoden	7
2.1 Material	7
2.1.1 Bakterienstämme, eukaryotische Zelllinien und Primärzellen	7
2.1.2 Oligonukleotide	7
2.1.3 Plasmide	9
2.1.4 Antikörper	10
2.1.5 Mikroskope	10
2.2 Molekularbiologische Methoden	11
2.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	11
2.2.2 DNA-Restriktion	12
2.2.3 DNA-Ligation	12
2.2.4 Plasmid-DNA-Transformation in <i>E. coli</i>	12
2.2.5 Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	12
2.2.6 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	13
2.2.7 Agarosegelelektrophorese	13
2.2.8 DNA-Sequenzierung	13
2.2.9 Verwendung des <i>TOPO TA Cloning</i> -Kits	14
2.3 Zellbiologische Methoden	14

2.3.1	Kultivierung von HEK-293 Zellen	14
2.3.2	Präparation und Kultivierung embryonaler hippocampaler Rattenneurone	15
2.3.3	Transfektion von HEK-293 Zellen und hippocampalen Rattenneuronen	16
2.3.4	Brefeldin A - Behandlung hippocampaler Rattenneurone	16
2.3.5	Chemische Induktion synaptischer Langzeitpotenzierung (cLTP) in hippocampalen Rattenneuronen	17
2.3.6	Immunzytochemie hippocampaler Rattenneurone	17
2.4	Proteinbiochemische Methoden	18
2.4.1	Zellyse	18
2.4.2	Koimmunpräzipitation mit <i>GFP-Trap</i>	18
2.4.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	19
2.4.4	<i>Western Blot</i> und Immundetektion von Proteinen	19
2.5	Mikroskopie	20
2.5.1	Epifluoreszenz - Mikroskopie	20
2.5.2	Lebendzell - Mikroskopie	21
2.5.3	Konfokale <i>Laserscanning</i> - Mikroskopie	21
3	Ergebnisse	22
3.1	Untersuchungen zur Lokalisation von PIST	22
3.1.1	<i>Western Blot</i> Analyse einer PSD-Präparation	22
3.1.2	Subzelluläre Lokalisation von PIST und anderen Zielproteinen	23
3.1.3	3D-Rekonstruktion der subzellulären PIST-Lokalisation	28
3.1.4	PIST-Lokalisation nach Brefeldin A - Behandlung	28
3.2	Funktionelle Studien	32
3.2.1	Vorarbeiten	32
3.2.2	Interaktionsnachweis von eGFP-PIST und mRFP-Stargazin .	33
3.2.3	Überexpression von eGFP-PIST und mRFP-Stargazin in Neuronen	34
3.2.4	Einfluss von cLTP auf die subzelluläre PIST-Lokalisation . . .	37
3.2.5	RNAi-Experimente (PIST- <i>knockdown</i>)	38
4	Diskussion	42
4.1	Diskussion der Lokalisationsuntersuchungen	42

4.2 Diskussion der funktionellen Studien	46
5 Zusammenfassung	50
Literaturverzeichnis	52
Publikation	57
Danksagung	58
Lebenslauf	59
Eidesstattliche Versicherung	60
Anhang	61

Abbildungsverzeichnis

1.1	Intrazelluläre vesikuläre Transportwege	2
1.2	Domänenstruktur von PIST	3
1.3	PIST-Lokalisation im ZNS	6
3.1	Immundetektion von PIST und Shank auf dem <i>Western Blot</i> einer PSD-Präparation	23
3.2	Immunzytochemie von PIST und Rab 5	24
3.3	Immunzytochemie von PIST und Cathepsin D	25
3.4	Immunzytochemie von PIST und TGN 38	26
3.5	Immunzytochemie von PIST und Giantin	27
3.6	Immunzytochemie von PIST und Neurologin 2	28
3.7	Immunzytochemie von PIST und Stargazin	29
3.8	Rohdaten des konfokalen Laserscanning-Mikroskops von ICC gegen PIST und Giantin	29
3.9	3D-Rekonstruktion der subzellulären PIST- und Giantinverteilung . .	30
3.10	Immunzytochemie von Giantin und PIST nach Brefeldin A - Behandlung	31
3.11	Koimmunpräzipitation von mRFP-Stargazin mit eGFP-PIST	35
3.12	Expression von eGFP-PIST und mRFP-Stargazin in hippokampalen Rattenneuronen	36
3.13	Einfluss von cLTP auf die subzelluläre PIST-Verteilung	38
3.14	Quantifizierung der PIST- <i>knockdown</i> -Effizienz	40
3.15	Immunzytochemie von PIST nach RNAi	41

4.1	Ultrastruktur des Golgi- Apparates	44
5.1	Lebendzell- Mikroskopie von Stargazin-N-mRFP	65
5.2	Lebendzell- Mikroskopie von mRFP	66

Abkürzungsverzeichnis

ACSF / mACSF	<i>(modified) Artificial Cerebrospinal Fluid</i>
AMP / cAMP / ADP / ATP	(cyclisches) Adenosin-5'-monophosphat/ Adenosin-5'-diphosphat / Adenosin-5'- triphosphat
AMPA	<i>α-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole- propionate</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Ara C	Arabinofuranosyl Cytidine
BBS	<i>Borate Buffered Saline</i>
BFA	Brefeldin A
CAL	CFTR- assoziierter Ligand; Synonym für PIST
CBL	Cerebellum
CC	<i>coiled coil</i> (Proteindomäne)
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator</i>
COP	<i>Coat Protein</i>
COS-7	immortalisierte Zelllinie der grünen Meerkat- ze
CTX	Cortex (Großhirnrinde)
Cy3	Cyanine 3
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA / cDNA	(copy) <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Elektrochemilumineszenz
ER	endoplasmatisches Reticulum
ERGIC	<i>ER - Golgi - Intermediate - Compartment</i>

FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FIG	<i>Fused In Glioblastoma</i> ; Synonym für PIST
GFP / eGFP	<i>(enhanced) Green Fluorescent Protein</i>
GOPC	<i>Golgi - associated PDZ and coiled - coil motif - containing protein</i>
GP	<i>Guinea Pig</i> ; Meerschweinchen
GTP	Guanosin-5' -triphosphat
HBSS	<i>Hanks Balanced Salt Solution</i>
HC	Hippocampus
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
HS	<i>Horse Serum</i>
ICC	<i>Immunocytochemistry</i>
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton (in der Biochemie gebräuchliche Masseinheit; 1Dalton = 1u)
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LTD	<i>Longtermdepression</i>
LTP / cLTP	<i>(chemically induced) Longtermpotential</i>
LZ	<i>Leucine Zipper</i> (Proteindomäne)
MDCK	<i>Madin - Darby - Canine - Kidney</i>
MTOC	<i>Microtubule Organizing Center</i>
NMDA	<i>N - Methyl - D - Aspartic Acid</i>
NRK	<i>Normal Rat Kidney</i>
NTP / dNTP / ddNTP	(desoxy/didesoxy) Nukleosidtriphosphat
OD	optische Dichte
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDZ	<i>PSD - 95 / Discs Large / Zonula Occludens - 1</i>
PIST	<i>Protein Interacting Specifically With TC10</i>
PLL	Poly - L - Lysin
PSD	Postsynaptische Dichte
RFP / mRFP	(monomeres) rot fluoreszierendes Protein
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation Assay Buffer</i>
RNA (m/sh/siRNA / RNAi)	<i>Ribonucleic Acid (messengerRNA / short hairpin RNA / short interfering RNA / RNA-Interference</i>
SDS - PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment Receptor</i>
TAE - Puffer	Tris-Acetat-EDTA - Puffer

Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBST	<i>Tris - Buffered Saline and Tween 20</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGN	Trans - Golgi - Netzwerk
TIRF	<i>Total Internal Reflection Fluorescence</i>
Tris	Abkürzung für Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U2OS-Zellen	kultivierte Zellen eines Osteosarkoms
WB	<i>Western Blot</i>
ZNS	zentrales Nervensystem
X - Gal	<i>5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid</i>

Grundlagen und Zielsetzung

Eukaryotische Zellen sind in unterschiedliche Kompartimente (Organellen) mit speziellen Aufgaben unterteilt. Einige Organellen, wie die Lysosomen, das endoplasmatische Retikulum (ER) und der Golgi-Apparat, sind membranumschlossen. Zwischen diesen membranumschlossenen Organellen, der Zellmembran und dem Extrazellulärraum findet in vielfältiger Weise Molekültransport statt, der von kleinen, membranumschlossenen Vesikeln bewerkstelligt wird (Abbildung 1.1) (Harter and Reinhard 2000; Bonifacino and Glick 2004).

Beispiele hierfür sind am ER synthetisierte sekretorische Proteine oder Membranrezeptoren, die vom ER über den Golgi-Apparat in den Extrazellulärraum oder an die Zellmembran transportiert werden (Hanus and Ehlers 2008). In entgegengesetzter Richtung können im Rahmen von Endozytose Vesikel von der Zellmembran in die Zelle einknospen und so Moleküle aus dem Extrazellulärraum aufnehmen oder Zellmembranproteine von der Zelloberfläche entfernen. Diese Endosomen können anschließend dem Golgi-Apparat oder Lysosomen zugeführt werden oder erneut mit der Zellmembran fusionieren (Pfeffer 2009). Medizinische Bedeutung hat das vesikuläre Transportsystem beispielsweise bei Mukoviszidose oder bei der I-Zell-Krankheit, einem Vertreter der lysosomalen Speicherkrankheiten. Bei der Mukoviszidose ist der Pathomechanismus noch nicht endgültig geklärt. Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass die häufigste Mutation in dem entscheidenden Chloridkanal

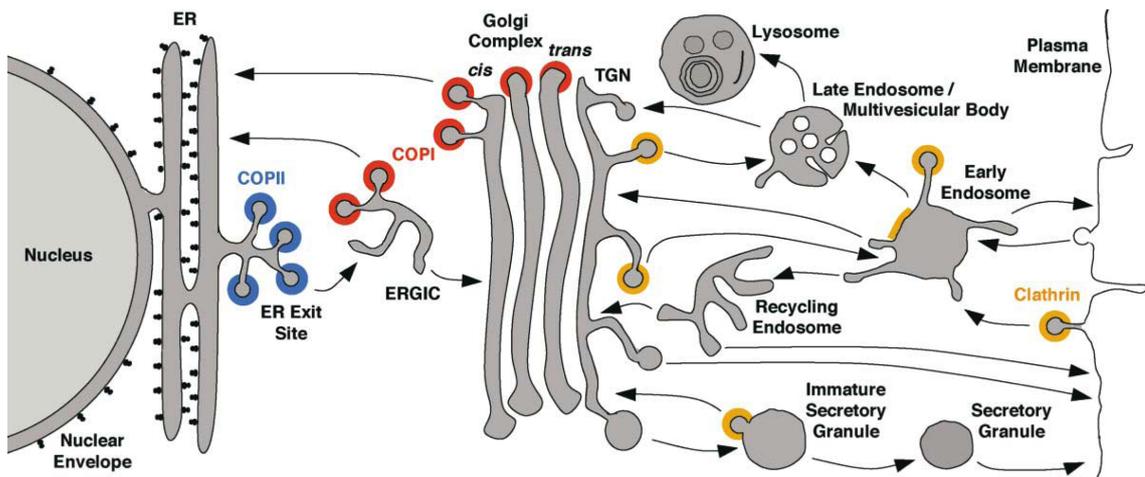


Abbildung 1.1: Übersicht über intrazelluläre vesikuläre Transportwege; Farblich unterteilt die bekannte oder vermutete Lokalisation der Vesikelhüllproteine COPI (*coat protein I*, rot), COPII (blau) und Clathrin (gelb); ER = endoplasmatisches Retikulum; ERGIC = *ER-Golgi-intermediate compartment*; TGN = Trans-Golgi-Netzwerk (Bonifacio and Glick 2004)

mit der Bezeichnung *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) die Struktur des Proteins so verändert, dass der vesikuläre Transport zur Zellmembran nicht stattfinden kann und eine Retention des Kanalproteins im ER die Folge ist (Denning et al. 1992). Bei der I-Zell-Krankheit führt eine Mutation im Gen der *N-Acetylglucosaminyl-1-Phosphotransferase* zu einem Funktionsverlust des Enzyms. Dies hat zur Folge, dass das Transportsignal, welches zur Zielführung lysosomaler Enzyme in die Lysosomen benötigt wird, nicht mehr korrekt synthetisiert werden kann. Daher werden die lysosomalen Enzyme statt in die Lysosomen fälschlicherweise in den Extrazellulärraum geleitet (Tiede et al. 2005).

Am Beispiel der I-Zell-Krankheit wird deutlich, dass im Rahmen der intrazellulären Transportprozesse der richtigen Zielführung (engl. *targeting*) der transportierten Proteine eine entscheidende Bedeutung zukommt. So gibt es in allen Kompartimenten des vesikulären Systems Proteine mit sortierender Funktion.

Im Golgi-Apparat ist das *PDZ domain protein interacting specifically with TC10* (**PIST**; auch beschrieben unter den Akronymen FIG (*fused in glioblastoma* (Charest et al. 2001)), GOPC (*Golgi-associated PDZ- and coiled-coil motif-containing protein* (Yao et al. 2001)) und CAL (*CFTR associated ligand* (Cheng et al. 2002))) ein Kandidat für diese Sortieraufgabe. PIST ist ein 462 Aminosäuren umfassendes Protein mit einem Molekulargewicht von 55 kDa, welches hauptsächlich am

Golgi-Apparat lokalisiert ist. Die Proteinstruktur von PIST weist zwei *coiled coil* (CC)-Domänen und eine *PSD-95/discs large/zonula occludens-1* (PDZ)-Domäne auf (Abbildung 1.2). In einer der CC-Domänen befindet sich eine *leucine zipper* Domäne. Alle aufgeführten Domänen dienen der Protein-Protein-Interaktion.

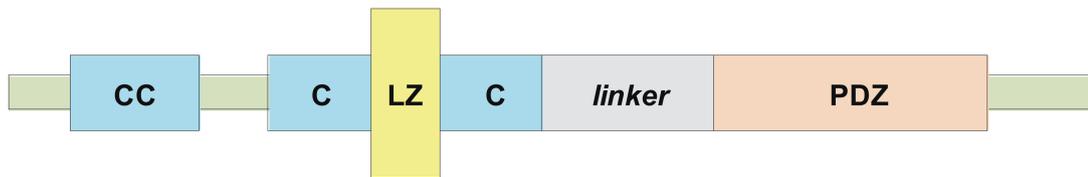


Abbildung 1.2: Domänenstruktur von PIST; CC = *coiled coil*, LZ = *leucine zipper*, PDZ = *PSD-95/discs large/zonula occludens-1*

Über die CC-Domänen interagiert PIST unter anderem mit TC10, Syntaxin 6 und Golgin-160 (Neudauer et al. 2001; Cheng et al. 2010; Hicks and Machamer 2005). Unter den Interaktionspartnern der PDZ-Domäne von PIST befinden sich neben dem bereits erwähnten CFTR einige weitere Membranproteine, nämlich Somatostatinrezeptoren (Wente et al. 2005), metabotrope und ionotrope Glutamatrezeptoren (Zhang et al. 2008; Yue et al. 2002), der β 1-adrenerge Rezeptor (He et al. 2006), Neuroline (Meyer et al. 2004) und das Zelladhäsionsmolekül Cadherin 23 (Xu et al. 2010).

Bezüglich der zellulären Funktion konnte gezeigt werden, dass PIST am Transport von CFTR zum Lysosom beteiligt ist. Eine Überexpression von PIST hat eine verminderte CFTR-Oberflächenpräsenz zur Folge. Auf diesen Transport hat auch TC10 Einfluss, eine kleine GTPase aus der Familie der Rho-GTPasen (Neudauer et al. 2001). Die Expression einer dominant-negativen TC10-Variante führt ebenfalls zu einer verminderten CFTR-Oberflächenpräsenz, wohingegen eine konstitutiv-aktive TC10-Variante selbige erhöht. Im Einklang mit diesen Beobachtungen konnte gezeigt werden, dass auch eine PIST-Defizienz die CFTR-Oberflächenpräsenz steigert (Cheng et al. 2005; Wolde et al. 2007). Im Mausmodell wurde beobachtet, dass PIST am Proteinverkehr vom Golgi-Apparat zum Akrosom im Rahmen der Spermio-genese beteiligt ist. PIST-defiziente Mäuse weisen ein nicht funktionstüchtiges, fragmentiertes Akrosom auf, was zu Infertilität führt (Yao et al. 2002). Aktuelle Untersuchungen an dem Zelladhäsionsmolekül Cadherin 23 zeigen, dass PIST Cadherin 23 an den Golgi-Apparat bindet, bis bestimmte andere Interaktionspartner

diese Bindung lösen und Cadherin 23 so ermöglichen, zur Zellmembran zu gelangen (Xu et al. 2010). Diese Beispiele zeigen, wie PIST Einfluss auf die Verteilung seiner membranständigen Interaktionspartner im vesikulären System (Golgi-Apparat, Zellorganellen wie Lysosomen oder Akrosomen und Zellmembran) nimmt.

Weitere Hinweise auf die Rolle von PIST im intrazellulären Vesikeltransport liefern die Interaktionen von PIST mit Golgin-160 und Syntaxin 6. Golgin-160 ist ein Membranprotein des Golgi-Apparates. Die Interaktion von PIST mit Golgin-160 deutet auf eine Beteiligung von PIST am Golgin-160-abhängigen Proteinverkehr hin (Hicks and Machamer 2005). Die Assoziation mit Syntaxin 6, einem Q-SNARE (*Q-soluble NSF attachment protein receptor*) Protein, ist ein weiterer Hinweis für die Funktion von PIST beim vesikulären Transport, da SNARE-Proteine essentielle Aufgaben bei der Fusion biologischer Membranen übernehmen (Charest et al. 2001). Neuesten Erkenntnissen zu Folge ist eine kombinierte Interaktion von PIST und Syntaxin 6 mit dem CFTR für den lysosomalen CFTR-Abbau von Bedeutung (Cheng et al. 2010).

2004 wurde eine Arbeit veröffentlicht, in der Stargazin, ein AMPA-Rezeptor assoziiertes Membranprotein (AMPA = α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid), als Interaktionspartner von PIST beschrieben wurde (Ives et al. 2004). Glutamaterezeptoren vom AMPA-Typ sind bei dem neuronalen Phänomen der synaptischen Plastizität von Bedeutung. An vielen Synapsen, wie z. B. im Hippokampus oder im Kleinhirn, wird die Dichte der AMPA-Rezeptoren in der postsynaptischen Membran abhängig von der Aktivität der Synapse reguliert. Dies führt zu langandauernder Verstärkung (LTP, *long term potentiation*) oder Abschwächung (LTD, *long term depression*) der synaptischen Übertragung. Diese langfristigen Veränderungen der synaptischen Effizienz werden mit Gedächtnisbildung in Zusammenhang gebracht. Von Cuadra et al. (2004) wurde die Interaktion von PIST mit Stargazin genauer untersucht. Während die übrigen oben aufgeführten Interaktionspartner von PIST aus der Gruppe der integralen Membranproteine (CFTR, Somatostatinrezeptoren, Neuroline etc.) mit ihrem zytosolischen C-terminalen PDZ-Bindungsmotiv mit der PDZ-Domäne von PIST interagieren, interagiert Stargazin PDZ-unabhängig mit PIST. Obwohl auch Stargazin ein C-terminales PDZ-Bindungsmotiv enthält, ist für die Wechselwirkung mit PIST eine andere zytosolische Proteinregion verantwortlich. Auf Seiten von PIST ist die sogenannte *linker*-Region (vgl. Abbildung 1.2) für die Interaktion mit Stargazin identifiziert worden. Bei einer Überexpression

von PIST wurde eine verstärkte synaptische Lokalisation von AMPA-Rezeptoren beobachtet, wohingegen die Expression einer dominant negativen PIST-Variante gegenteilige Wirkung zeigte.

In einer Arbeit von Ito et al. (2006) wurde gezeigt, dass PIST in Hirngewebe in unterschiedlichen Varianten exprimiert wird, deren Konzentration sich im Verlauf der Entwicklung ändert. So gibt es eine Variante (60 kDa), deren Expression mit dem Zeitpunkt der Geburt nahezu erlischt. Das Auftreten einer anderen Variante (35 kDa) hingegen wird erst elf Tage nach der Geburt nachweisbar. Die ursprünglich beschriebene PIST Variante (55 kDa) ist durchgehend vertreten, wobei angemerkt sei, dass in neuronalem Gewebe eine Isoform von PIST exprimiert wird, die um acht Aminosäuren länger ist als jene Isoform in den übrigen Geweben (nPIST, *neuronal* PIST) (Yue et al. 2002). Zur Untersuchung der PIST - Lokalisation im Gehirn und innerhalb der Neurone wurden bereits unterschiedliche Herangehensweisen verfolgt. *In situ* Hybridisierung (Detektion PIST-spezifischer mRNA in Gehirnschnitten) und Immunhistochemie (Proteinnachweis in Gehirnschnitten) zeigten übereinstimmend ein gehäuftes Auftreten von PIST im Kleinhirn, in der Großhirnrinde und im Hippokampus (Cuadra et al. 2004) (Abbildung 1.3). Subzellulär wird PIST stets am Golgi-Apparat lokalisiert beschrieben. Darüber hinaus postulieren Cuadra et al. (2004) und Ito et al. (2006) PIST mit immunzytochemischen Untersuchungen dendritisch und synaptisch nachgewiesen zu haben. In cerebellärem Gewebe beschreiben auch Yue et al. (2002) eine Anreicherung von PIST in der postsynaptischen Dichte (PSD).

Zielsetzung

Die von mehreren Autoren beschriebene synaptische Lokalisation steht im Kontrast zu ersten Untersuchungen in der Arbeitsgruppe, bei denen keine synaptische Lokalisation beobachtet werden konnte. Daher war ein Ziel dieser Arbeit, eine umfassende Untersuchung der subzellulären Lokalisation von PIST in hippokampalen Neuronen durchzuführen. Begleitet PIST die zu sortierenden Proteine zu ihren Zielkompartimenten (Zellmembran/Synapse/Lysosom) oder übernimmt PIST ausschließlich eine Sortierfunktion, bei der es ortsständig am Golgi-Apparat bleibt und die Interaktionspartner in Richtung ihrer Zielkompartimente entlässt? Lässt sich die Lokalisation von PIST am Golgi-Apparat differenzierter beschreiben? Tritt eine synaptische Lokalisation von PIST möglicherweise nur unter bestimmten physiologischen Zustän-

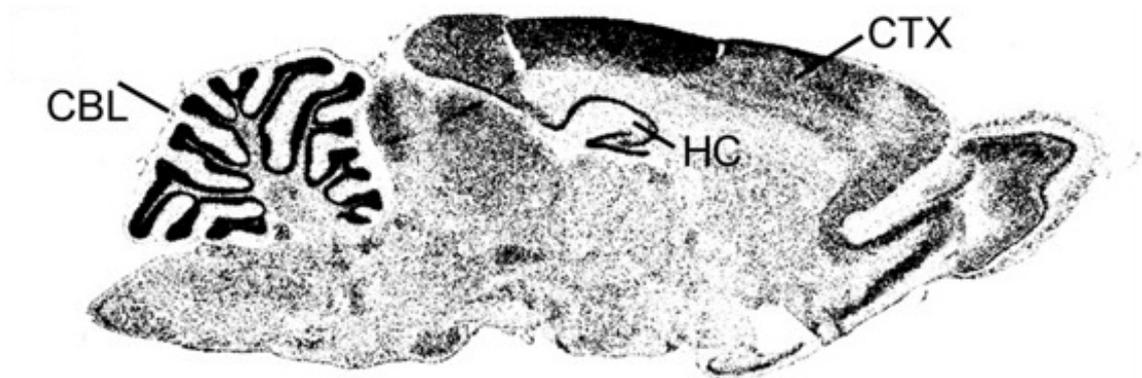


Abbildung 1.3: PIST-Lokalisation im zentralen Nervensystem (ZNS); *in situ* Hybridisierung eines sagittalen Gehirnschnitts einer 30 Tage alten Ratte; CBL = *Cerebellum* = Kleinhirn; HC = *Hippocampus*; CTX = *Cortex* = Großhirnrinde; (modifiziert nach Cuadra et al. (2004))

den auf? Gibt es eine Dynamik der PIST-Lokalisation? Die Wechselwirkung von PIST mit dem postsynaptischen Protein Stargazin wurde als Untersuchungsgegenstand funktioneller Studien gewählt. Hierzu galt es, GFP- und RFP- (grün bzw. rot fluoreszierendes Protein) Fusionsproteine von PIST und Stargazin zu klonieren, um diese in Neuronen zu exprimieren und lebend zu mikroskopieren. Der Zusammenhang von Stargazin mit synaptischer Plastizität führte zu der Frage, ob sich PIST bei chemisch induzierter Langzeitpotenzierung (cLTP) innerhalb der Zelle bewegt. Gibt es einen PIST-vermittelten Transport von Stargazin in die Postsynapse? Als letztes Ziel dieser Arbeit galt es, ein auf RNA-Interferenz basierendes PIST-Mangel-Modell zu etablieren (PIST-*knockdown*).

Material und Methoden

2.1 Material

Eine Auflistung der Bezugsquellen der verwendeten Materialien, sowie die Zusammensetzung von Puffern und Lösungen, ist dem Anhang zu entnehmen.

2.1.1 Bakterienstämme, eukaryotische Zelllinien und Primärzellen

Die Klonierung und Amplifizierung von Plasmid-DNA erfolgte mithilfe von *Escherichia coli* (E.coli) Bakterien vom Stamm TOP10F und TOP10F^c (Invitrogen). Als eukaryotische Zelllinie kamen HEK-293 (*Human Embryonic Kidney*) Zellen zum Einsatz. Die hippokampalen Rattenneurone wurden aus *Rattus norvegicus* (Stamm: Wistar, Tierhaltung UKE Hamburg) isoliert.

2.1.2 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma *Sigma* bezogen.

Bei der PCR-Amplifizierung (PCR = *polymerase chain reaction* von mRFP (monomeres RFP) zur Klonierung von mRFP in den Vektor pcDNA3-T7-N-tag kamen folgende Primer zum Einsatz:

CB-mRFP-for 5' AAAGCTAGCATGGCCTCCTCCGAGGAC 3'

CB-mRFP-BamHI-rev 5' AAAGGATCCGCGCTCGGCGCG 3'

(Fett gedruckt die Schnittstellen von NheI und BamHI)

Bei der PCR-Amplifizierung von mRFP zur Klonierung von mRFP in den Vektor pCMV-Tag2B-stargazin wurden folgende Primer verwendet:

EG_mRFP_BglII-for 5' AAAAGATCTCCATGGCCTCCTCCGAGGACG 3'

EG_mRFP_BglII-rev 5' AAAAGATCTCGCGCCCTCGGCGCG 3'

(Fett gedruckt die Schnittstellen von BglII)

Für die Amplifizierung von PIST aus *Rattus norvegicus* (PISTrno) zur Klonierung in den TOPO-Vektor kamen folgende Primer zur Anwendung:

EG_PIST_RN_for 5' AAAACTCGAGCCATGTCGGCGGGCGGCCCATG 3'

EG_PIST_RN_rev 5' AAAAGGATCCTTAGTAGGCCTTCTTCTGATGGAGGCT 3'

(Fett gedruckt die Schnittstellen von XhoI und BamHI)

Zur Sequenzierung von PISTrno im TOPO-Vektor wurden folgende Primer genutzt:

PISTrno351fwd 5' GAAGGAAGTCCACGACCAGCTCCTACAGCT 3'

PISTrno651fwd 5' CAGGGTCCAACAAATACAGTTACTGGGACGGGATATGAAG 3'

2.1.3 Plasmide

Tabelle 2.1: Verwendete Plasmide; die fett gedruckten Plasmide sind im Rahmen dieser Arbeit kloniert worden (siehe 3.2.1)

Plasmid	Produkt	Kommentar
peGFP-C1-PISTmmu	eGFP-PIST	PIST aus <i>Mus musculus</i> , eGFP N-terminal, kloniert von Wolf Wente (Institut für Humangenetik)
pmRFP-C2	mRFP	Ausgangsplasmid für die Subklonierung von pmRFP-C2-PISTrno
pmRFP-N1	mRFP	<i>Template</i> für die Amplifikation von mRFP für Klonierungen
pmRFP-C2-PISTrno	mRFP-PIST	PIST aus <i>Rattus norvegicus</i> , eGFP N-terminal
pcDNA3-stargazin-T7-N-tag	Stargazin-T7	Stargazin aus <i>Rattus norvegicus</i> , T7 N-terminal, Ausgangsplasmid für die Subklonierung von pcDNA3-stargazin-N-mRFP
pcDNA3-stargazin-N-mRFP	mRFP-Stargazin	Stargazin aus <i>Rattus norvegicus</i> , mRFP N-terminal
pCMV-tag2B		Ausgangsplasmid für die Subklonierung von pCMV-Tag2B-stargazin-mRFP269
pCMV-Tag2B-stargazin-mRFP269	mRFP-Stargazin	Stargazin aus <i>Rattus norvegicus</i> mit mRFP an Position 269
pCR II-TOPO		<i>TOPO-Vektor</i> zur Klonierung von PCR-Produkten (2.2.9)
		Sequenz der siRNA
pGeneCliphMGFP-shRNA1	siRNA1	TTGTGGATGTGGATCTTCTTTCT
pGeneCliphMGFP-shRNA2	siRNA2	ATGAGGGGCGTCAGAAGATGACC
pGeneCliphMGFP-shRNA3	siRNA3	ATGATTGAATCACTAGGAAATGT
pGeneCliphMGFP-shRNA4	siRNA4	AGGACAGTGCTAACTGGAATTTT
pGeneCliphMGFP-shRNA-NC	Kontroll-siRNA	GGAATCTCATTCGATGCATAC

2.1.4 Antikörper

Erstantikörper

Tabelle 2.2: Übersicht Erstantikörper; WB = Verdünnung für Immundetektion im *Western Blot*, ICC = Verdünnung für Immundetektion bei Immunzytochemie, gp = Meerschweinchen, rb = Kaninchen, m = Maus, sh = Schaf, 1 = von AG Storch (Institut für Kinderbiochemie) zur Verfügung gestellt, 2 = von AG Kurth (Institut für Humangenetik) zur Verfügung gestellt

Zielprotein (Kommentar)	generiert in	WB	ICC	Hersteller
PIST (Meerschweinchen 8)	gp	1:3000	1:2000	Labor Kreienkamp
Shank (PDZ)	rb	1:4000		Labor Kreienkamp
Rab 5 (1)	m		1:100	Synaptic Systems
Cathepsin D (1)	rb		1:100	AbD Serotec
TGN 38	rb		1:100	AbD Serotec
Giantin (2)	m		1:1000	Alexis Biomedicals
Neurologin 2	rb		1:500	Synaptic Systems
Stargazin (aa 305 - 323)	rb		1:200	Upstate
RFP (8048 3. Serum)	rb	1:2000		Labor Kreienkamp

Zweitantikörper

Tabelle 2.3: Übersicht Zweitantikörper; WB = Verdünnung für Immundetektion im *Western Blot*, ICC = Verdünnung für Immundetektion bei Immunzytochemie, gp = Meerschweinchen, rb = Kaninchen, m = Maus

Konjugat	gerichtet gegen	WB	ICC	Hersteller
Meerrettichperoxidase	gp	1:2500		GE Healthcare
Meerrettichperoxidase	rb	1:2500		GE Healthcare
Cyanin 3	gp		1:500	Dianova
Alexa-Fluor 488	m		1:500	Invitrogen
Alexa-Fluor 488	rb		1:500	Invitrogen

2.1.5 Mikroskope

Das bei Epifluoreszenz-Mikroskopie und Lebendzell-Mikroskopie verwendete Mikroskop der Firma *Olympus* war vom Typ *IX81*. Zur Fluoreszenzanregung wurde das

Beleuchtungssystem MT20 verwendet, das sich einer Xenon/Quecksilber-Lichtquelle bediente. Das zur Bilderfassung verwendete Objektiv war vom Typ *PLAPON 60x O TIRFM N.A. 1.45* von *Olympus*. Die digitale Schwarz/Weiß-CCD-Kamera der Firma *Hamamatsu* war vom Typ *ORCA-ER*.

Die konfokalen Aufnahmen wurden an einem *DMIRE2* Mikroskop mit dem *TCS SL* Konfokalsystem der Firma *Leica* gemacht. Bei der Bilderfassung wurde ein *Leica HCX PL APO 63x Oil CS N.A. 1.32 - 0.6* Objektiv benutzt.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Amplifizierung spezifischer DNA-Abschnitte wurde mittels PCR in einem Thermocycler (Biometra) mit dreistufigem Reaktionszyklus durchgeführt. Als *Template*-DNA wurde sowohl Plasmid-DNA als auch cDNA aus Hirngewebe der Ratte eingesetzt. Der Reaktionsansatz setzte sich entsprechend Tabelle 2.4 zusammen:

Tabelle 2.4: PCR Reaktionsansatz

Reagenz	Menge
<i>Template</i> - DNA	50 - 100 ng
Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs)	10 nmol
Primer	50 - 100 pmol
Taq - Polymerase	2,5 - 5 U
10 x PCR Puffer	5 μ l
H ₂ O dest.	auf 50 μ l

Nach der initialen Denaturierung des PCR-Ansatzes (2 min, 94°C) wurden 25 Zyklen aus Denaturierung (30 s, 94°C), Anlagerung der Primer (30 s, 55 - 65°C) und Polymerisation (1 - 5 min, 72°C) durchlaufen, gefolgt von einer abschließenden Elongation (10 min, 72°C). Die Anlagerungstemperatur richtete sich nach den Schmelzpunkten der verwendeten Oligonukleotide. Die Polymerisationsdauer wurde entsprechend der Länge des Amplifikats gewählt.

2.2.2 DNA-Restriktion

Eine DNA-Restriktion ist eine sequenzspezifische DNA-Spaltung, welche durch Einsatz sequenzspezifischer Restriktionsenzyme (DNAsen) erreicht wird. Im Rahmen der Klonierungen wurden sowohl Plasmide als auch PCR-Produkte geschnitten. Bei Plasmidrestriktionen wurden 1-2 μg DNA, bei PCR-Produkten die gesamte DNA-Menge der PCR mit 5-10 U Restriktionsenzym in einem Gesamtvolumen von 20-50 μl bei enzymabhängigen Pufferbedingungen geschnitten. Entsprechend der gewählten Enzyme wurden die Ansätze 10-60 min bei 37°C inkubiert.

2.2.3 DNA-Ligation

Die Ligation kompatibler DNA-Stücke wurde mit der T4-Ligase durchgeführt. Ein Gesamtreaktionsvolumen von 25 μl beinhaltete 5 Weiss-Units T4-Ligase, 2,5 μl ATP-haltigen 10-fach Ligasepuffer, linearisiertes Plasmid und *Insert*, wobei das *Insert* bezüglich der Molekülmenge in 5-fachem Überschuss gegenüber dem Plasmid vorlag. Es wurden 0,1-0,3 μg Plasmid eingesetzt. Die Ansätze wurden bei Raumtemperatur für mindestens 1 h inkubiert.

2.2.4 Plasmid-DNA-Transformation in *E. coli*

Chemisch kompetente *E. coli*-Zellen (nach Chung et al. (1989) hergestellt) wurden auf Eis aufgetaut. Für die Transformation wurden 20 μl 5x KCM-Lösung, 5 μl Ligationprodukt bzw. 1 μg Plasmid-DNA und 80 μl H₂O dest. mit 100 μl *E. coli*-Zellen vermennt und 20 min auf Eis inkubiert. Nach 5 min bei 37°C ('Hitzeschock') wurde 1 ml vorgewärmtes LB-Medium zugegeben. Nach einer weiteren einstündigen Inkubation bei 37°C wurden die *E. coli*-Zellen auf LB-Platten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin bzw. 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.5 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Vervielfältigung von Plasmid-DNA wurden das gewünschte Plasmid enthaltende *E. coli*-Zellen über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator in Selektionsmedium (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin bzw. 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin in LB-Medium) angezchtet. Das Volumen der Übernachtskultur wurde entsprechend der angestrebten Plas-

midausbeute dimensioniert (5 ml bei einer Mini-Präparation, 100 ml bei einer Midi-Präparation). Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte anschließend mittels alkalischer Lyse unter Verwendung der Kits *NucleoBond-XtraMini* bzw. *NucleoBond-XtraMidi* (*Macherey & Nagel*) entsprechend der Herstellerangaben.

2.2.6 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die DNA-Konzentration einer Probe wurde anhand der Bestimmung ihrer optischen Dichte (OD) bei 260 nm ermittelt. Die Messung erfolgte in Quarzküvetten mit einer Länge von 1 cm. Durch Bestimmung der OD bei 280 nm konnte die Reinheit der Präparation überprüft werden, welche sich aus dem Quotienten der beiden Werte ergibt. Eine ausreichend reine Präparation sollte einen Quotienten E_{260}/E_{280} von etwa 1,8 aufweisen. (E= engl. Extinktion(Absorption)). Die photometrische Bestimmung der Plasmid-Konzentration wurde mit einem *GeneQuant* Photometer der Firma *Pharmacia* durchgeführt.

2.2.7 Agarosegelelektrophorese

Zur größenabhängigen Auftrennung von DNA-Fragmenten zum Zwecke von Fragmentisolierung oder Kontrolldokumentation wurde die Agarosegelelektrophorese genutzt. Die Gele bestanden aus 1 - 2% (w/v) Agarose in TAE-Puffer und waren zwecks DNA-Markierung für die spätere UV-Licht-Detektion mit 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ethidiumbromid versetzt. Vor dem Auftragen der Proben wurden selbige mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt. Die Elektrophorese fand bei einer Spannung von 50 - 120 V in TAE Puffer statt. Bei anschließender DNA-Isolierung wurde die gewünschte Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten und durch Bindung an Glasmilch aus der Agarose isoliert (*Qiaex II* -Kit von *Qiagen*).

2.2.8 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen erfolgten nach der Didesoxy-Kettenabbruchmethode mit dem *ABI PRISM Big Dye Terminator* -Kit und dem Sequenziergerät *ABI PRISM 3130 DNA Sequencer* der Firma *Applied Biosystems*. Im *Big Dye* des Sequenzier-Kits waren die Polymerase *AmplitaqFS*, dNTPs und fluorophormarkierte ddNTPs enthalten. Ein Sequenzieransatz bestand aus 1 μl *Big Dye*, 0,5 - 1 μg Plasmid-DNA, 2 μl

5 x Sequenzierpuffer, 10 pmol Sequenzierprimer und H₂O dest. in einem Gesamtreaktionsvolumen von 10 μ l. Zur Amplifizierung wurden in einem Thermocycler nach 1 min Denaturierung (96°C) 25 Zyklen (5 s bei 96°C , 5 s bei 50°C , 3 min bei 60°C) durchlaufen. Danach wurde die DNA-Lösung zuerst mit 5 μ l Natriumacetat (3 M) und 130 μ l 100 % Ethanol für 30 min bei 4°C und 14000 U/min gefällt. Anschließend wurde das DNA-Pellet einmal mit 250 μ l 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (10 min, 14000 U/min), und zuletzt bei 37°C für die anschließende Kapillarelektrophorese luftgetrocknet.

2.2.9 Verwendung des *TOPO TA Cloning* -Kits

Unter Verwendung des *TOPO TA Cloning* -Kits der Firma *Invitrogen* konnte ein PCR-Produkt in den Vektor *pCR II-TOPO* integriert werden. Das Prinzip dieser Methode besteht darin, dass die bei der PCR von der Taq-Polymerase gebildeten 3'-Desoxyadenosin-Überhänge komplementär sind zu den 3'-Desoxytymidin-Überhängen des linearisierten Vektors *pCR II-TOPO*. Die kovalent an die Vektor-Enden gebundene Topoisomerase I katalysiert die Ligation von PCR-Produkt und Vektor. Für die sogenannte *TOPO Cloning Reaction* wurden 1 μ l PCR-Produkt, 0,7 μ l *pCR II-TOPO* -Vektor, 1 μ l Salzlösung und 3 μ l H₂O dest. für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. 2 μ l dieser Lösung wurden anschließend in *One Shot TOP10* Zellen (kompetente *E.coli*) protokollgemäß transformiert. Die Bakterien wurden zur Kultivierung auf LB-Platten mit Ampicillin, X-Gal und IPTG ausplattiert. Durch das im Vektor *pCR II-TOPO* enthaltene lacZ-Gen, welches durch den Einbau des PCR-Produktes unterbrochen wird, konnte die Selektion positiver Klone mittels *blue/white-screening* erfolgen.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung von HEK-293 Zellen

HEK-293 Zellen wurden in DMEM-Medium mit 10 % FCS bei 37°C in einer 5 %igen CO₂-Atmosphäre kultiviert. Zur Vermeidung bakterieller Kontaminationen wurden dem Medium Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 μ g/ml) zugegeben. Zum Umsetzen wurden die Zellen einmal kurz mit Versenepuffer gewaschen und anschließend für 3-5 min mit 0,1 % Trypsin inkubiert, um sie von der Platte zu lösen. Danach

wurden die Zellen in frischem Medium aufgenommen und auf neue Kulturschalen verteilt. Das Umsetzen der Zellen erfolgte zweimal pro Woche.

2.3.2 Präparation und Kultivierung embryonaler hippocampaler Rattenneurone

Die Versuche wurden nach den in Hamburg gültigen Tierschutzrichtlinien durchgeführt. Die Tötung der Ratten war bei der zuständigen Behörde unter der Nummer ORG 371 angezeigt.

Beschichtung der Deckgläschen mit Poly-L-Lysin (PLL)

Um am Ende der Präparation die Neurone aussäen zu können, mussten im Voraus Deckgläschen vorbereitet werden. Hierzu wurden die Deckgläschen zunächst durch Autoklavieren sterilisiert. Nachdem die Deckgläschen auf dem Boden der Kulturschale verteilt worden waren, wurde eine Lösung von PLL (1 mg/ml) in Boratpuffer für 1 h zugegeben. Nach Abziehen der PLL-Lösung wurde 4-5 Mal mit H₂O dest. gewaschen. Das H₂O dest. musste bis zur Zellaussaat auf den Deckgläschen bleiben.

Präparation

Nach einer Tragzeit von 18-20 d wurde eine schwangere Ratte durch CO₂-Begasung betäubt und durch Dekapitation mit einer Tischguillotine getötet. Anschließend wurde ihr der Gebärmutterschlauch möglichst steril entnommen (Desinfektion des Bauchfells mit 70% Ethanol, Überführung des Gebärmutterschlauches in eine Präparationsschale ohne dabei das Fell zu berühren). Nach der Entnahme der Embryonen aus dem Gebärmutterschlauch wurden deren Köpfe abgetrennt, die Schädeldecken eröffnet und die Gehirne entnommen. In Präparationsmedium wurde den Gehirnen anschließend der Riechkolben entfernt. Weiter wurden die Hirnhälften vom Kleinhirn und Stammhirn isoliert und die Hirnhaut abgezogen. Zuletzt wurden aus den sauberen Hirnhälften die Hippokampi mit der Pinzette separiert und herausgehoben.

Kultivierung

Die isolierten Hippokampi wurden mit 4,5 ml Präparationsmedium in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt, zwecks Lösen der Zell-Zell-Kontakte mit 0,5 ml 10x Trypsin vermischt und für 15 min bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Hippokampi sukzessive mit insgesamt 50 ml Ausplattiermedium gewaschen, um sie vom Präparationsmedium sowie vom Trypsin zu befreien. Um die

Zellen mechanisch zu vereinzeln, wurden die Hippokampi als nächstes mit sterilen, feuerpolierten Glaspipetten trituriert. Die erhaltenen 2 ml Zellsuspension wurden mit Ausplattiermedium auf 10 ml aufgefüllt und die Zellkonzentration mit Hilfe einer *Neubauer*-Zählkammer bestimmt. Für die Kultur der Zellen wurde die Konzentration mit Ausplattiermedium auf 110.000 bis 180.000 Zellen/ml eingestellt und jeweils 1 ml der Zellsuspension in eine Vertiefung einer 12-Loch-Kulturschale mit einem beschichteten Deckgläschen gegeben. Nach einer Inkubation von 3-4 h (37°C , 5% CO₂), in der sich die Zellen absenkten und an das Deckgläschen anheften konnten, wurde das Ausplattiermedium durch Kulturmedium ersetzt. Dieses war bei diesem Schritt (Tag 0) mit 25 µM Glutamat und 100 µg/ml Primocin versetzt. Am fünften Tag nach der Präparation wurde das halbe Volumen des Kulturmediums durch frisches Kulturmedium mit 3,2 µM AraC ersetzt, um das Wachstum nicht-neuronaler Zellen zu hemmen. Im weiteren Verlauf wurde nach Bedarf Kulturmedium zugefügt, die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

2.3.3 Transfektion von HEK-293 Zellen und hippocampalen Rattenneuronen

Zur Transfektion von Zellen mit Plasmid-DNA wurde die Kalziumphosphat-Methode genutzt. Je nach Ansatzvolumen wurden 0,5-10 µg DNA mit Wasser und einer CaCl₂-Lösung (Endkonzentration 250 mM) vermischt. Anschließend wurde 2x BBS langsam sukzessive zugegeben. Eine Inkubation von 10 min diente der Kristallisation von Calciumphosphat. Dieses Transfektionsreagenz, welches nun die DNA in den Kristallen gebunden enthielt, wurde daraufhin zu den Zellen gegeben und verteilt. Nach etwa 3 h wurde das Medium abgesaugt. Bei HEK-293 Zellen konnte direkt frisches Kulturmedium gegeben werden. Bei Neuronen musste 4-5 Mal mit vorgewärmtem HBSS gewaschen werden, bis keine Kristalle mehr zu sehen waren (Kontrolle unter dem Mikroskop). Anschließend wurde das frische Kulturmedium verabreicht. Tabelle 2.5 gibt exemplarisch die eingesetzten Mengen für die Transfektion von Zellen in einer Vertiefung einer 12-Loch-Kulturschale an.

2.3.4 Brefeldin A - Behandlung hippocampaler Rattenneurone

Hippokampalen Rattenneuronen wurde nach 14 d in Kultur frisches Kulturmedium mit 2 µg/ml Brefeldin A (BFA) verabreicht. Nach 2 h Inkubation wurden die Zellen

Tabelle 2.5: Mengenangaben für die Transfektion von Zellen in einer Vertiefung einer 12-Loch-Kulturschale

Reagenz	Menge
Plasmid-DNA	0,5 μ l
CaCl ₂ (2,5 M)	5 μ l
H ₂ O dest.	auf 50 μ l
2 x BBS	50 μ l

fixiert und immunzytochemisch behandelt. (Erläuterung der Wirkweise von Brefeldin A siehe 3.1.4)

2.3.5 Chemische Induktion synaptischer Langzeitpotenzierung (cLTP) in hippokampalen Rattenneuronen

Primäre hippokampale Rattenneurone wurden 13-15 d in Kultur gehalten. Zu Beginn der Behandlung wurde sowohl bei der Kontroll- als auch bei der Stimulationsgruppe das Nährmedium durch vorgewärmten, künstlichen Liquor (*Artificial Cerebrospinal Fluid*, ACSF) ersetzt. Nach Ablauf von 30 min wurde bei der Stimulationsgruppe das ACSF durch modifizierten, künstlichen Liquor (mACSF) ersetzt, welcher kein Magnesium enthielt und mit den Stimulantien Rolipram (0,1 μ M) und Forskolin (50 μ M) versetzt war. Rolipram, ein Phosphodiesterase-4-Inhibitor, und Forskolin, ein Aktivator der Adenylatzyklase, führen zu einem erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegel. Nach 10 min wurde sowohl bei der Kontroll- als auch bei der Stimulationsgruppe das ACSF bzw. das mACSF durch frisches ACSF ersetzt. Nach weiteren 10 min wurden die Neurone mit 4%iger Formaldehydlösung fixiert und anschließend immunzytochemisch behandelt.

2.3.6 Immunzytochemie hippokampaler Rattenneurone

Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von Proteinen wurden mittels Immunzytochemie durchgeführt. Die 7-21 d auf Deckgläschen gewachsenen Zellen wurden zunächst mit PBS (*phosphate buffered saline*) gewaschen, dann für 15 min mit 4% Formaldehyd in PBS fixiert und nach einem weiteren Waschschrift mit PBS

3 min mit 0,1 % Triton-X-100 in PBS permeabilisiert. Nach erneutem Waschen mit PBS und einstündigem Blocken mit 5 % Pferdeserum (engl. *horseserum*, HS) in PBS folgte die antikörperbasierte Proteinmarkierung. Die Zellen wurden hierbei zunächst bei 4°C über Nacht mit einer Antikörperlösung inkubiert, welche proteinspezifische Erstantikörper enthielt. Nach mehreren Waschschritten (3 x 10 min mit PBS) wurden die Zellen unter Lichtabschluss mit einer Zweitantikörperlösung inkubiert (1 h bei Raumtemperatur). Die Zweitantikörper waren fluoreszenzmarkiert und spezifisch gegen die Erstantikörper gerichtet. Bei simultaner Färbung zweier unterschiedlicher Proteine war die Verwendung von Erstantikörpern aus verschiedenen Spezies notwendig. Durch Verwendung des entsprechenden Zweitantikörpers konnte ein Protein rot und ein anderes Protein grün markiert werden. Auch die überschüssigen Zweitantikörper wurden durch Waschschrritte mit PBS (3 x 10 min) entfernt. Zur Kernfärbung wurde 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt. Abschließend wurden die Deckgläschen in Permafluor-Medium auf Objektträgern eingebettet.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Zellyse

Zur Proteinextraktion wurden Zellen mit kaltem PBS gewaschen, für 15 min mit RIPA-Puffer (mit Proteaseinhibitoren) auf Eis lysiert und die Zellysate durch Zentrifugation bei 20.000 g für 15 min bei 4°C von Zelltrümmern gereinigt.

2.4.2 Koimmunpräzipitation mit *GFP-Trap*

Die verwendete Koimmunpräzipitationvariante basiert auf einem gegen GFP gerichteten Einzeldomänen-Antikörper, welcher aus *Lama alpaca* isoliert wurde (Rothbauer et al. 2008). Dieser Antikörper ist an Agarose-Kügelchen gekoppelt (Durchmesser 80 μm) und bindet spezifisch an GFP (*GFP-Trap*). Sofern ein GFP-Fusionsprotein in dem eingesetzten Zellysate enthalten ist, bindet es während der Inkubation (1 h, 4°C) an *GFP-Trap*. Ist ein weiteres Protein an das GFP-Fusionsprotein gebunden, wird auch dieses Protein indirekt an *GFP-Trap* gebunden. Durch mehrere Zentrifugations- und Waschschrritte (viermaliges Zentrifugieren bei 500 g, jeweils ge-

folgt von Waschen mit 1 ml RIPA-Puffer) isoliert man anschließend die an *GFP-Trap* gebundene Fraktion vom Rest des Zelllysates. Zur Elution der Proteine von der Agarose wurden die Proben mit Lämmli-puffer aufgeköcht. Die isolierte Fraktion wurde dann per SDS-PAGE, *Western Blot* und Immundetektion auf Anwesenheit bestimmter Proteine untersucht.

2.4.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur analytischen Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichts wurde die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit diskontinuierlichem Puffersystem durchgeführt. Das Sammelgel setzte sich aus 1,4 ml H₂O dest., 0,33 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Mix (30 %), 0,25 ml Tris (1,0 M, pH 6,8), 0,02 ml SDS (10 %), 0,02 ml APS (10 %) und 0,002 ml TEMED zusammen. Das 10 %ige Trenngel bestand aus 4,0 ml H₂O dest., 3,3 ml Acrylamid-Bisacrylamid-Mix (30 %), 2,5 ml Tris (1,5 M, pH 8,8), 0,1 ml SDS (10 %), 0,1 ml APS (10 %) und 0,004 ml TEMED. Die mit 5 x Lämmli-puffer versetzten Proben wurden vor dem Auftragen bei 60 - 95°C für 5 min vollständig denaturiert. Die Elektrophorese in Laufpuffer erfolgte bei 100 - 200 V in *Mini-Protean III-PAGE* Kammern von *Biorad*. Das Gel wurde anschließend auf eine Nitrozellulosemembran geblottet.

2.4.4 *Western Blot* und Immundetektion von Proteinen

Der Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte bei konstanter Spannung von 100 V für 1 h in Transferpuffer in einer Nassblot-Apparatur der Firma *Biorad* bei 4°C. Nach dem Transfer wurden freie Bindungsstellen auf der Membran mit 5 % Magermilchpulver für 1 h blockiert. Die Inkubation mit dem proteinspezifischen Erstantikörper erfolgte in 0,5 % Milchpulver in TBST (engl. *tris buffered saline + tween*) über Nacht bei 4°C. Ungebundene Antikörper wurden durch Waschen der Membran mit TBST (3 x 10 min) entfernt. Die Detektion des Erstantikörpers erfolgte mit einem HRP (engl. *horseradish peroxidase*, Meerrettichperoxidase) -gekoppelten Zweitantikörper. Zur Visualisierung der Proteinbanden wurde Chemilumineszenz-Substrat (*Pierce ECL Western Blotting Substrate*) protokollgemäß eingesetzt. Anschließend wurden Röntgenfilme belichtet und nach ausreichender Exposition entwickelt. Für quantitative Bestimmungen wurde die Lumineszenz der *Western Blots* mit dem digitalen *ChemiDoc XRS* Dokumen-

tationssystem (*Biorad*) detektiert und relative Intensitäten mit der *Quantity One* Software (*Biorad*) ausgewertet.

2.5 Mikroskopie

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere Mikroskopietechniken angewandt. Fixierte, immunzytochemisch behandelte Zellen wurden sowohl mit Epifluoreszenz-Mikroskopie als auch mit konfokaler *Laserscanning*-Mikroskopie analysiert. Außerdem wurden lebende Zellen mikroskopiert (Lebendzell-Mikroskopie). Grundprinzip der Fluoreszenzmikroskopie ist, dass die zur Proteinmarkierung verwendeten Fluorochrome unterschiedliche Anregungs- und Emissionswellenlängen haben. So kann in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge gezielt die Lokalisation einer Fluorochrom-Gruppe und somit eines Proteins visualisiert werden. Bei immunzytochemisch behandelten Zellen kamen die Fluorochrome *Alexa 488* und *Cy3* zum Einsatz. Bei der Lebendzell-Mikroskopie wurden Varianten des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) und des rot fluoreszierenden Proteins (RFP) verwendet, nämlich eGFP (*enhanced GFP*) und mRFP (*monomeric RFP*). Die Maxima der einzelnen Anregungs- und Emissionswellenlängenspektren sind Tabelle 2.6 zu entnehmen.

Tabelle 2.6: Maxima der Anregungs- und Emissionswellenlängenspektren der verwendeten Fluorochrome und Fluoreszenzproteine

Fluorochrom	Anregungswellenlänge	Emissionswellenlänge
eGFP	488 nm	508 nm
Alexa 488	495 nm	519 nm
Cy 3	550 nm	570 nm
mRFP	584 nm	607 nm

2.5.1 Epifluoreszenz - Mikroskopie

Für die Epifluoreszenz-Mikroskopie kam ein *Olympus* Mikroskop vom Typ *IX81* zum Einsatz (2.1.5). Die Bilderfassungssoftware *Cell'R* von *Olympus* ermöglichte eine sogenannte *3D-deconvolution* Bildbearbeitung, welche Streulicht herausrechnen und so die Bildschärfe erhöhen konnte.

2.5.2 Lebendzell - Mikroskopie

Die Lebendzell-Mikroskopie wurde ebenfalls am *IX81* von *Olympus* durchgeführt, wofür das Mikroskop mit einer Inkubationskammer ausgestattet war. Die Inkubationskammer gewährleistete eine Temperatur von 37°C und einen CO₂-Gehalt der Luft von 5%. Die mit Zellen bewachsenen Deckgläschen wurden für die Mikroskopie mit der Oberseite nach unten in eine mit Kulturmedium gefüllte Mikroskopierschale der Firma *Ibidi* gelegt.

2.5.3 Konfokale *Laserscanning* - Mikroskopie

Konfokale *Laserscanning*-Mikroskopie ist eine Variante der Fluoreszenzmikroskopie, die sich durch eine sehr hohe optische Auflösung auszeichnet. Erreicht wird diese hohe Auflösung, indem das Präparat nicht ausgeleuchtet, sondern mit einem feinen Laserstrahl abgerastert und durch Bildverarbeitung auf einem Bildschirm analysiert wird. Bei dieser Methode ist vor allem die Auflösung in der Z-Achse verbessert, da kein Streulicht aus anderen Ebenen stört. Somit ermöglicht die konfokale *Laserscanning*-Mikroskopie eine Analyse der Proteinverteilung im Raum (3D).

Die konfokale *Laserscanning*-Mikroskopie wurde an einem Mikroskop der Firma *Leica* durchgeführt (2.1.5). Die Auswertung der Bilder erfolgte mit der Software *Imaris* (*Bitplane*).

Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur Lokalisation von PIST

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Versuche durchgeführt, um die subzelluläre Lokalisation von PIST genauer zu untersuchen.

3.1.1 *Western Blot* Analyse einer PSD-Präparation

Aufgrund der Tatsache, dass Interaktionen von PIST mit postsynaptischen Proteinen beschrieben wurden, stellte sich die Frage, ob auch PIST in der Postsynapse vorhanden ist. Hierzu wurden Proben einer PSD-Präparation, die in der Arbeitsgruppe bereits vorhanden waren, per *Western Blot* analysiert. Die PSD-Präparation erfolgte nach einem etablierten biochemischen Protokoll (Carlin et al. 1980) aus den Gehirnen von vier männlichen, sechs Wochen alten Mäusen, wobei die Kleinhirne zuvor entfernt worden waren. Im Verlauf der Aufreinigung wurden Proben aus Rohhomogenisat, Überstand nach Zentrifugation, Pellet nach der zweiten Zentrifugation, Synaptosomenfraktion und PSD-Fraktion genommen. Von jeder Probe wurden 10 μg Protein aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proben wurde in einem 10%igen Polyacrylamidgel durchgeführt. Die Immundetektion von PIST (Abbildung 3.1 A, Pfeil) zeigt, dass die PIST-Konzentration mit den Präparationsschritten abnimmt und in der PSD-Fraktion sehr gering ist. Da der Anti-PIST-Antikörper gegen

einen Bereich von PIST generiert wurde, der eine PDZ-Domäne umfasst, kann der Antikörper auch an PDZ-Domänen anderer Proteine binden, wenn diese in hohen Konzentrationen vorliegen. Da PDZ-Domänen bei vielen synaptischen Proteinen vorliegen, erkennt der Antikörper in der PSD-Fraktion auch andere angereicherte Proteine mit PDZ-Domäne. Als Positivkontrolle zeigt die Immundetektion von Shank, einem Protein der postsynaptischen Dichte, den Erfolg der PSD-Präparation (B). Shank kommt in mehreren Formen mit einem apparenten Molekulargewicht zwischen 130 kDa und 270 kDa vor, die alle vom Antikörper erkannt wurden.

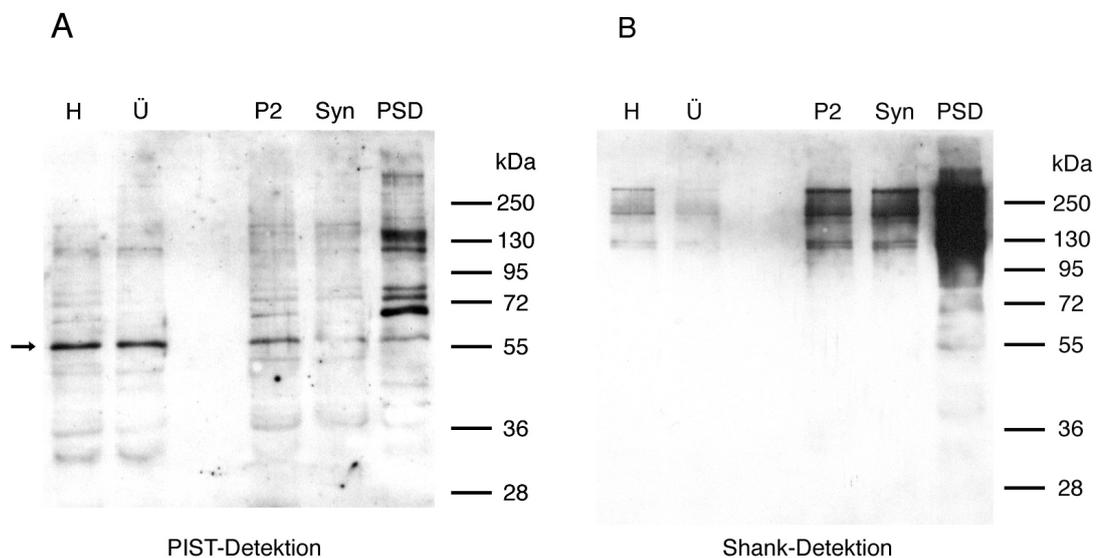


Abbildung 3.1: Immundetektion von PIST (A, Pfeil) und Shank (B) auf dem *Western Blot* einer PSD-Präparation; H = Homogenisat, Ü = Überstand, P2 = Pellet nach der zweiten Zentrifugation, Syn = Synaptosomen, PSD = Postsynaptische Dichte

Ob dies eine geringe Konzentration von PIST in der PSD belegt oder ob die Spezifität der Präparation nicht ausreichend ist (Verunreinigung durch nicht-PSD-Proteine), bedarf weiterer Aufklärung mit anderer Methodik.

3.1.2 Subzelluläre Lokalisation von PIST und anderen Zielproteinen

Zur genaueren Untersuchung der subzellulären Lokalisation von PIST wurden simultane immunzytochemische Färbungen von PIST, etablierten Zellkompartimentmarkern und bekannten Interaktionspartnern von PIST durchgeführt. Für die Versuche

wurden primär kultivierte hippocampale Rattenneurone verwendet. Zur Gewährleistung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurden alle Versuche beziehungsweise Färbungen mindestens dreimal durchgeführt. Für die Präsentation in dieser Arbeit wurden die jeweils aussagekräftigsten Bilder ausgewählt. Als Markerproteine des intrazellulären vesikulären Systems wurden Rab 5 und Cathepsin D genutzt. Zur Markierung der unterschiedlichen Bereiche des Golgi-Apparates wurden Antikörper gegen TGN 38 (Trans-Golgi-network protein of 38 kDa) und Giantin eingesetzt. Als Interaktionspartner von PIST wurden die beiden postsynaptischen Proteine Stargazin und Neuroligin 2 fluoreszenzmarkiert.

Endosomenmarkierung mittels Rab 5 - Detektion

Rab 5 ist eine kleine GTPase, die an der zytoplasmatischen Seite früher Endosomen lokalisiert ist. Die Färbung von PIST und Rab 5 zeigt, dass PIST nicht in oder an frühen Endosomen lokalisiert ist (Abbildung 3.2).

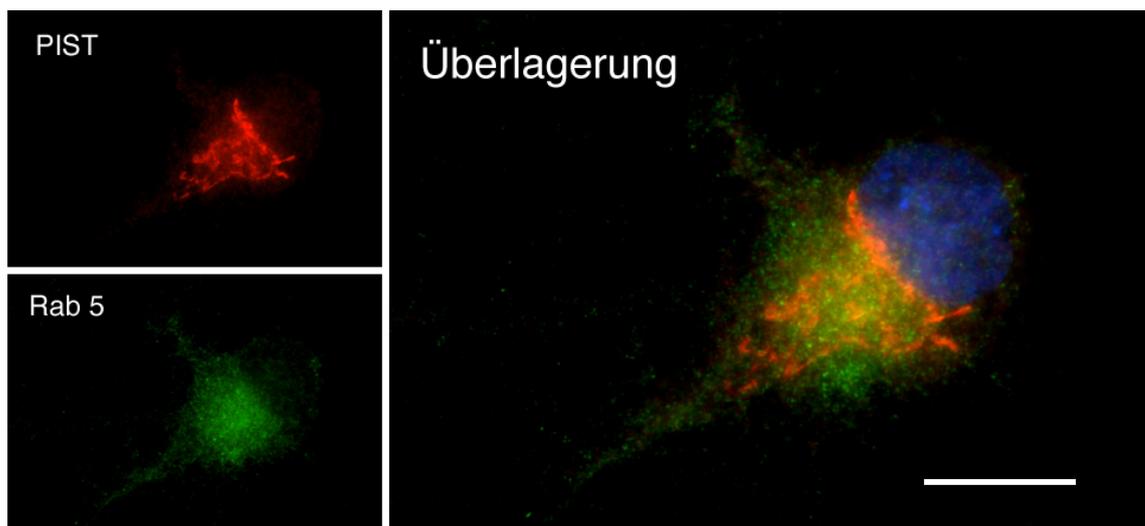


Abbildung 3.2: Immunzytochemie von PIST (rot) und Rab 5 (grün) in primärem hippocampalen Rattenneuron; 14 d in Kultur; Kerndarstellung mit DAPI (blau); Maßstabsbalken 10 μm

Lysosomenmarkierung mittels Cathepsin D - Detektion

Cathepsin D, eine lysosomale Protease, diente der Markierung von Lysosomen. Es zeigt sich keine Überlappung der Färbungen, PIST ist demnach nicht in oder an Lysosomen lokalisiert (Abbildung 3.3).

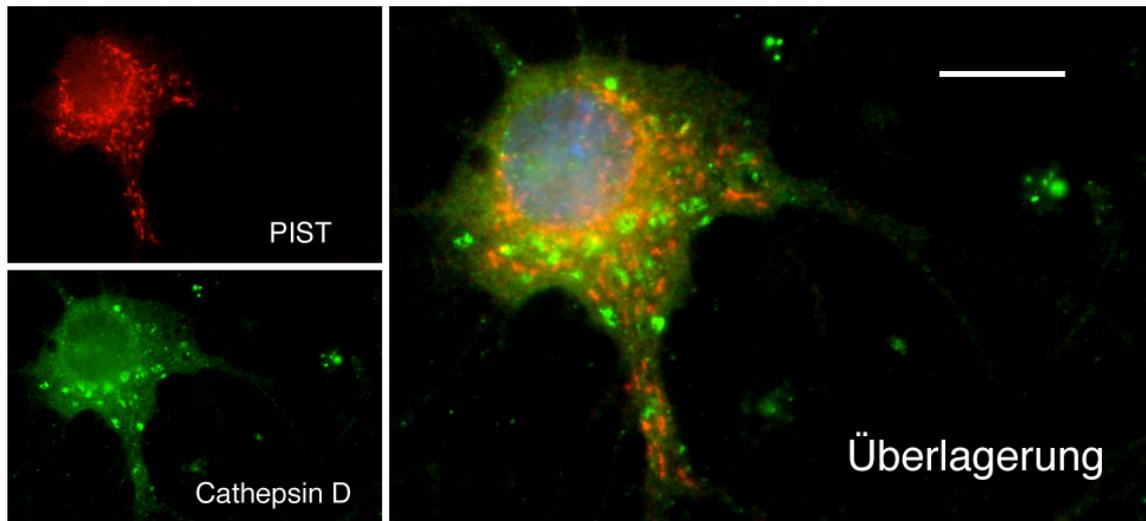


Abbildung 3.3: Immunzytochemie von PIST (rot) und Cathepsin D (grün) in primärem hippocampalen Rattenneuron; 14 d in Kultur; Kerndarstellung mit DAPI (blau); Maßstabsbalken 10 μm

Markierung des Trans-Golgi Netzwerkes mittels TGN 38 - Detektion

TGN 38 ist ein integrales Membranprotein, welches hauptsächlich in den Membranen des Trans-Golgi-Netzwerks zu finden ist (Reaves et al. 1992). PIST und TGN 38 kolokalisieren nahezu vollständig. Allerdings weist die TGN 38-Färbung einige angefärbte Punkte, vermutlich Vesikel, auf, die vom PIST-Antikörper nicht erkannt wurden (Pfeile). Diese Vesikel sind somit entweder frei von PIST oder die PIST-Konzentration liegt unterhalb der Nachweisgrenze (Abbildung 3.4).

Markierung des Golgi-Apparates mittels Giantin - Detektion

Giantin, auch unter dem Namen Makrogolgin bekannt, ist ein Bestandteil der Membranen des cis- und medialen-Golgi-Apparates, wo es der Anbindung von COPI Vesikeln an die Golgi-Membran dient (Soennichsen et al. 1998; Barr and Short 2003). Abbildung 3.5 lässt erkennen, dass PIST dicht bei Giantin lokalisiert ist. Bei Betrachtung der Ausschnittsvergrößerung erkennt man jedoch, dass die Proteine nicht exakt kolokalisieren. Es wird deutlich, dass sich PIST und Giantin in unterschiedlichen Bereichen des Golgi-Apparates befinden (Pfeile).

Markierung von Neuroligin 2

Neuroligin 2 ist ein Membranprotein, welches zur Gruppe der Zelladhäsionsmoleküle gehört. Es findet sich hauptsächlich in der postsynaptischen Membran inhibito-

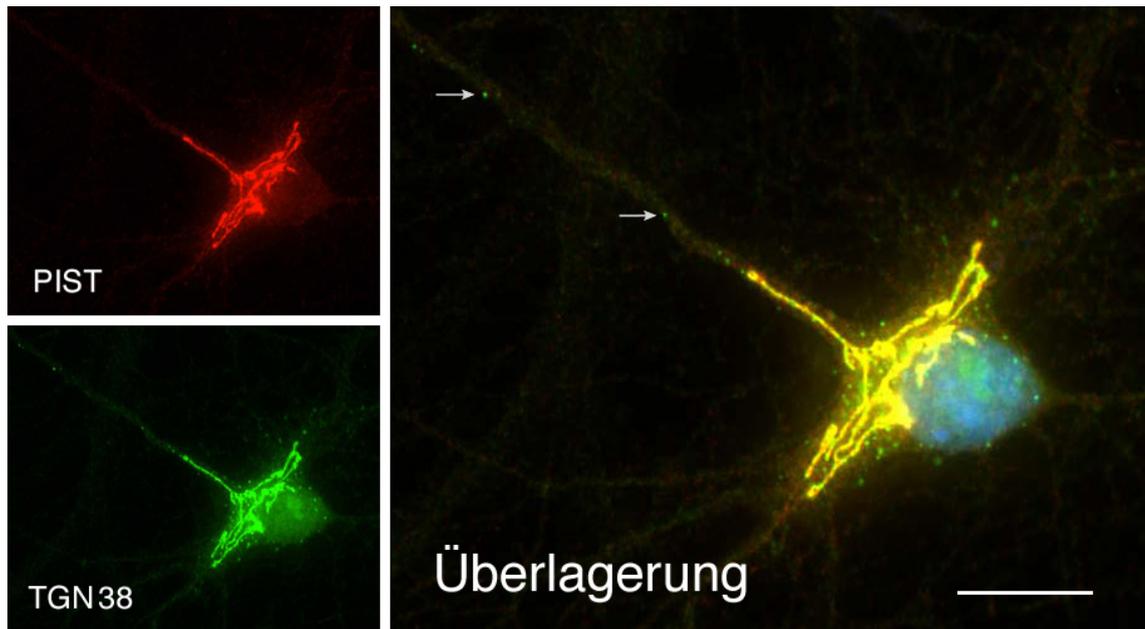


Abbildung 3.4: Immunzytochemie von PIST (rot) und TGN38 (grün) in primären hippocampalen Rattenneuronen; 14 d in Kultur; Kerndarstellung mit DAPI (blau); Maßstab Balken 10 μm

rischer Synapsen des zentralen Nervensystems und bewerkstelligt gemeinsam mit dem präsynaptischen Protein Neurexin die mechanische Verknüpfung von Prä- und Postsynapse (Lise and El-Husseini 2006). Die Interaktion von Neuroligin 2 mit PIST wurde von Meyer et al. (2004) beschrieben. Die PDZ-Domäne von PIST bindet mit niedriger Affinität an den C-Terminus von Neuroligin 2 (Li et al. 2006). Trotz dieser nachgewiesenen Interaktion weist PIST keine Kolo­kalisierung mit Neuroligin 2 auf (Abbildung 3.6).

Markierung von Stargazin

Die Immunzytochemie von Stargazin zeigt deutlich die Lokalisation in postsynaptischen *Spines*. Dies sind die postsynaptischen Anteile exzitatorischer Synapsen. PIST lässt sich dort hingegen nicht nachweisen (Abbildung 3.7).

Der Vergleich der Abbildungen 3.6 und 3.7 macht die unterschiedliche Morphologie und Lokalisation inhibitorischer und exzitatorischer Synapsen deutlich. Die in Abbildung 3.6 ange­färbten postsynaptischen Anteile inhibitorischen Synapsen sind am Schaft der Dendriten und am Zellkörper (Soma) lokalisiert. Ihre Form ist meist länglich und sie sind verhältnismäßig großflächig. Die postsynaptischen Anteile exzi-

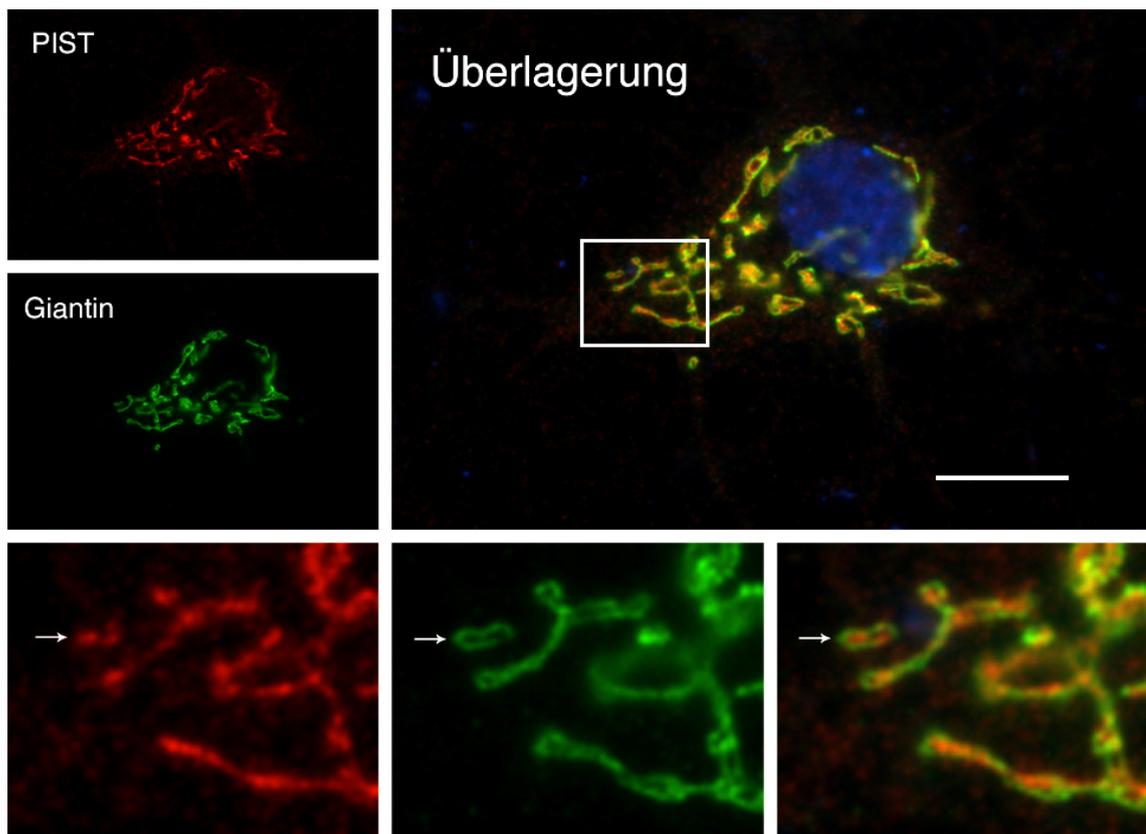


Abbildung 3.5: Immunzytochemie von PIST (rot) und Giantin (grün) in primärem hippocampalen Rattenneuron; 14 d in Kultur; Kerndarstellung mit DAPI (blau); untere Zeile: Ausschnittsvergrößerungen; Maßstabsbalken 10 μm

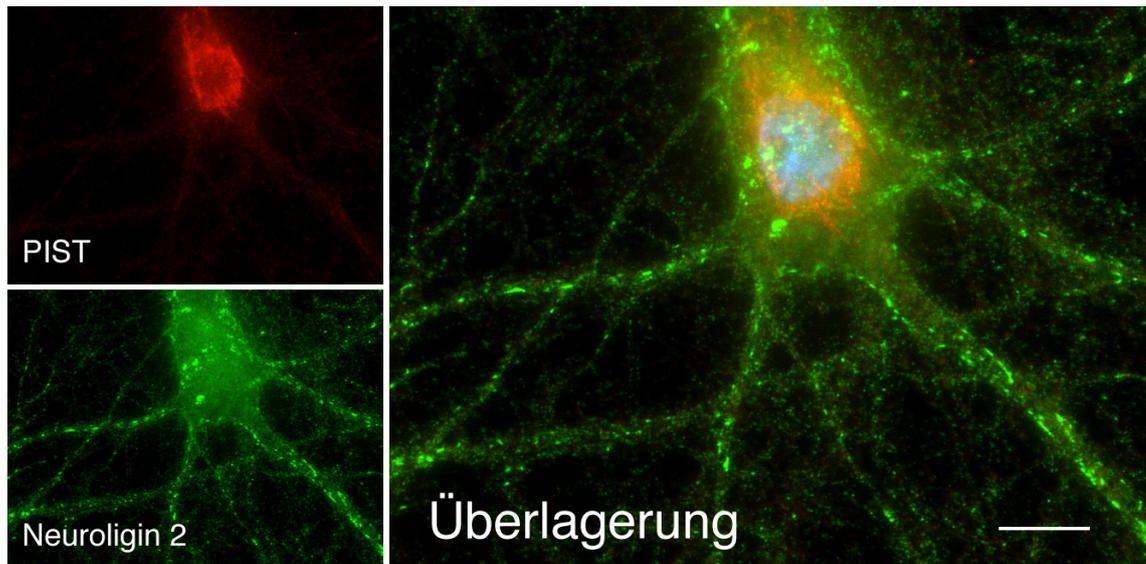


Abbildung 3.6: Immunzytochemie von PIST (rot) und Neuroligin 2 (grün) in primärem hippocampalen Rattenneuron; 21 d in Kultur; Kerndarstellung mit DAPI (blau); Maßstabsbalken $10\ \mu\text{m}$

tatorischer Synapsen in Abbildung 3.7 sind hingegen nicht am Schaft der Dendriten oder am Zellsoma lokalisiert, sondern an dornartigen Fortsätzen (postsynaptischen *Spines*) der Dendriten.

3.1.3 3D-Rekonstruktion der subzellulären PIST-Lokalisation

Die Immunzytochemie von PIST und Giantin wurde genutzt, um mit Hilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops einen Bild-Datensatz über mehrere Ebenen zu erheben, der somit die Information der Proteinverteilung in drei Dimensionen enthält. Es wurden 20 Ebenen mit einem Abstand von jeweils $0,33\ \mu\text{m}$ aufgenommen. Abbildung 3.8 zeigt Ebene 11 von 20 in beiden Farbkanälen. Mit Hilfe des Computerprogramms *Imaris* wurde aus diesen Daten die räumliche Proteinlokalisierung rekonstruiert (Abbildung 3.9).

3.1.4 PIST-Lokalisation nach Brefeldin A - Behandlung

Hippokampale Rattenneurone wurden für 2 h mit $2\ \mu\text{g}/\text{ml}$ Brefeldin A (BFA) inkubiert. Anschließend wurde eine immunzytochemische Färbung von Giantin und PIST durchgeführt (Abbildung 3.10). BFA ist eine aus dem Pilz *Penicillium brefeldianum* isolierte Substanz, die mit Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren interagiert.

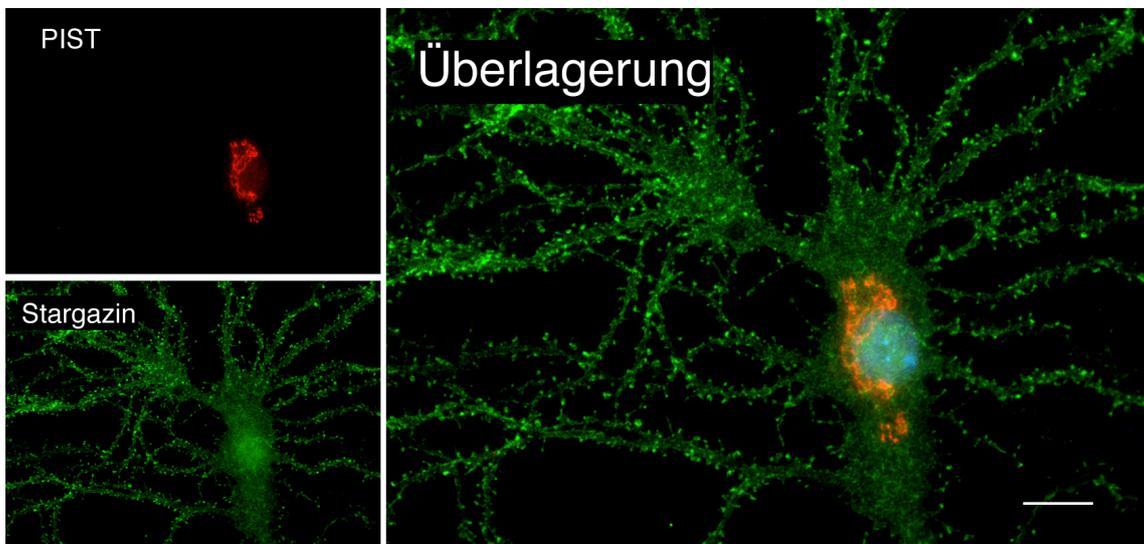


Abbildung 3.7: Immunzytochemie von PIST (rot) und Stargazin (grün) in primärem hippocampalen Rattenneuron; 21 d in Kultur; Kerndarstellung mit DAPI (blau); Maßstabsbalken 10 μm

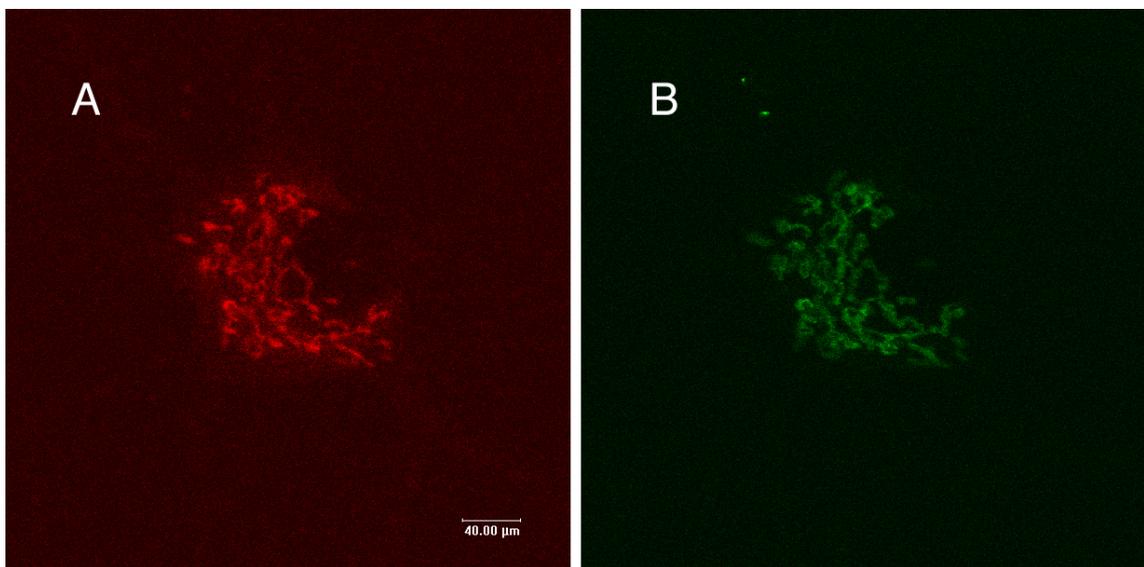


Abbildung 3.8: Rohdaten des konfokalen Laserscanning-Mikroskops; Immunzytochemie von PIST (A, rot) und Giantin (B, grün) in primärem hippocampalen Rattenneuron; 14 d in Kultur; Ebene 11/20

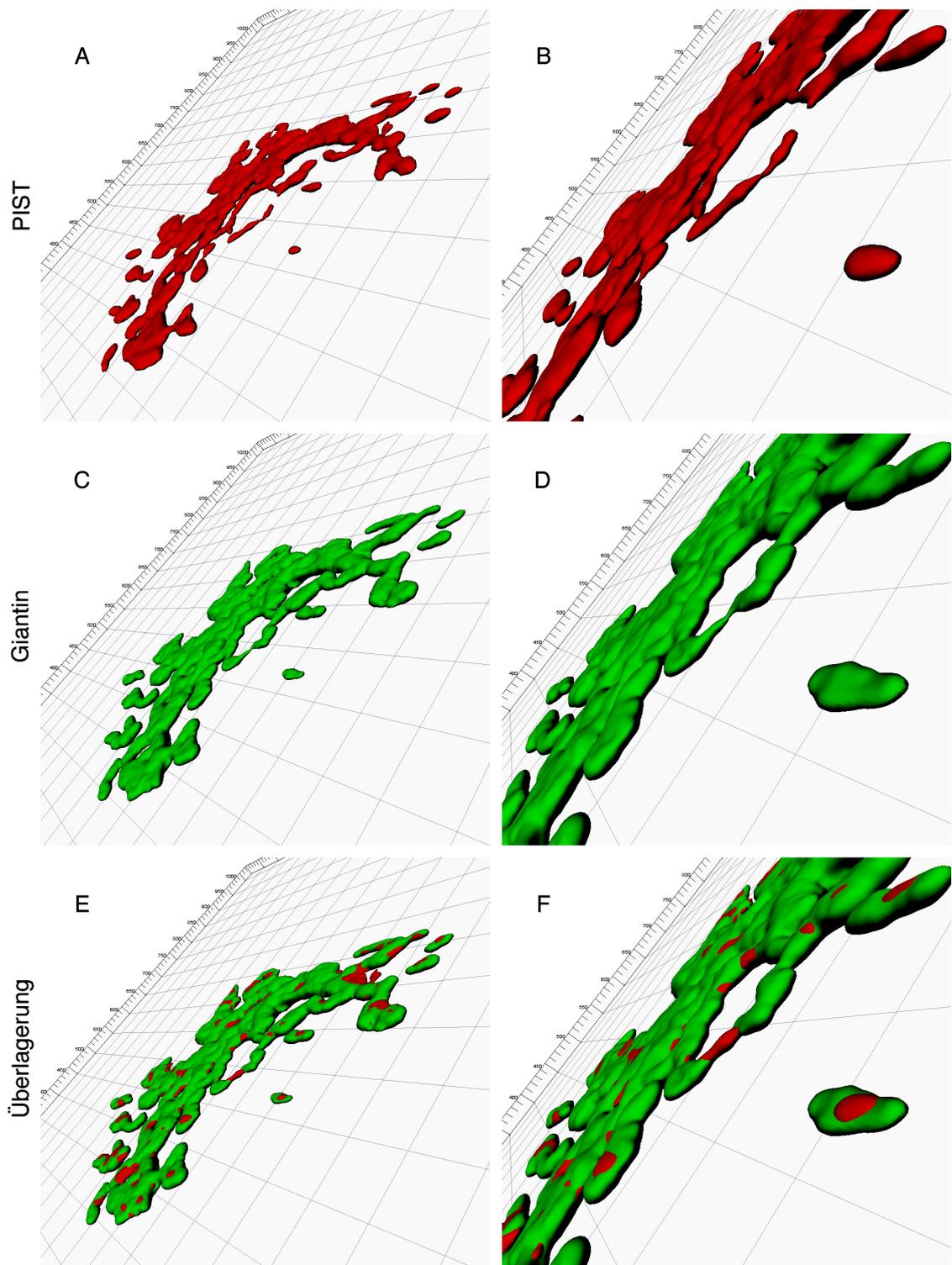


Abbildung 3.9: 3D-Rekonstruktion der subzellulären PIST- und Giantinverteilung; A und B: subzelluläre PIST-Verteilung (B Vergrößerung aus A); C und D: subzelluläre Giantin-Verteilung (D Vergrößerung aus C); E und F: Überlagerung der oberen Bilder; F Vergrößerung aus E)

Damit hemmt BFA die Aktivierung von ADP-Ribosylierungsfaktoren und greift so in grundlegende Funktionsabläufe des Golgi-Apparates ein. Nach BFA-Verabreichung zerfällt der Golgi-Apparat innerhalb weniger Minuten. Immunzytochemischen Arbeiten zufolge schlägt die cis-Golgi-Apparat-spezifische Färbung zur Gänze in eine Kolokalisation mit Markern des endoplasmatischen Retikulums um (Dinter and Berger 1998). Das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) hingegen verhält sich anders: Hier findet eine Umverteilung der TGN-spezifischen Färbung zu den Mikrotubuli organisierenden Zentren (MTOC) statt (Banting and Ponnambalam (1997), siehe dort Abbildung 2 c-f). Diese unterschiedliche Reaktion auf die BFA-Einwirkung kann man sich zu Nutze machen, um herauszufinden, ob ein Protein im Golgi-Apparat oder im Trans-Golgi-Netzwerk lokalisiert ist.

In Abbildung 3.10 ist erkennbar, dass sich nach BFA-Behandlung (D, E und F) die subzelluläre Verteilung von PIST und Giantin im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (A, B und C) anders darstellt. Die Giantin-Färbung zeigt eine der Literatur entsprechende Rückverlagerung der Membranen des Golgi-Apparates in das endoplasmatische Retikulum (D). PIST befindet sich nach der BFA-Behandlung diffus im Zytoplasma (E).

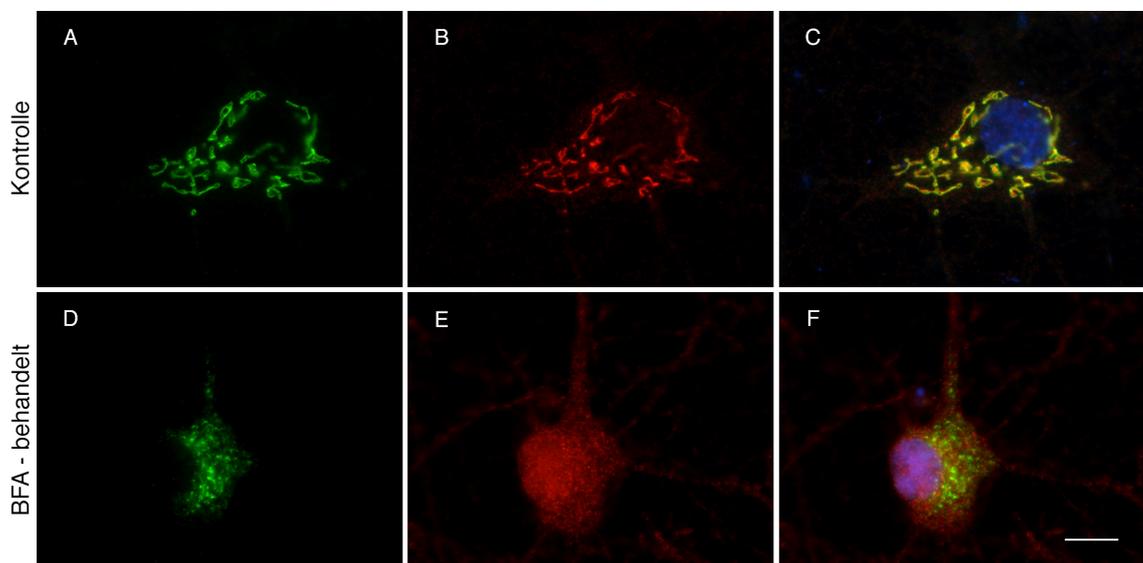


Abbildung 3.10: Immunzytochemie von Giantin (grün) und PIST (rot) in primären hippocampalen Rattenneuronen mit und ohne Brefeldin A - Behandlung; 14 d in Kultur; A, B und C: Kontrolle; D, E und F: BFA-behandelt; Maßstabsbalken 10 μm

3.2 Funktionelle Studien

3.2.1 Vorarbeiten

Neben den vorgestellten Lokalisationsuntersuchungen wurden auch funktionelle Studien durchgeführt, um Erkenntnisse über die Funktion von PIST zu gewinnen. Von den dabei eingesetzten Plasmiden wurden folgende im Rahmen dieser Arbeit kloniert:

Klonierung von pcDNA3-stargazin-N-mRFP

Bei der Klonierung von pcDNA3-stargazin-N-mRFP war pcDNA3-stargazin-T7-N-tag das Ausgangsplasmid. Durch Restriktion mit BamHI und NheI wurde das Ausgangsplasmid eröffnet. Das für mRFP kodierende *Insert* wurde über eine PCR synthetisiert, wobei das Plasmid pmRFP-N1 als *Template* genutzt wurde. Als Primer wurden Oligonukleotide eingesetzt, die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BamHI und NheI beinhalten (CB-mRFP-for und CB-mRFP-BamHI-rev (siehe 2.1.2)). Nach Restriktion des PCR-Produktes mit BamHI und NheI konnte die mRFP-Sequenz gerichtet mit dem Plasmid ligiert werden. In dem fertigen Plasmid liegt die mRFP-kodierende Sequenz 5' zu der Stargazin-kodierenden Sequenz.

Klonierung von pCMV-Tag2B-stargazin-mRFP269

Bei der Klonierung von pCMV-Tag2B-stargazin-mRFP269 war pCMV-tag2B das Ausgangsplasmid. Zu Beginn wurde die für Stargazin kodierende Sequenz aus dem Plasmid pcDNA3-stargazin-N-mRFP über die Schnittstellen der Restriktionsenzyme BamHI und EcoRI in das Plasmid pCMV-tag2B subkloniert. Anschließend wurde eine PCR zur Amplifizierung der mRFP-kodierenden Sequenz durchgeführt, wobei erneut das Plasmid pmRFP-N1 als *Template* genutzt wurde. Die als Primer eingesetzten Oligonukleotide waren mit BglII-Schnittstellen bestückt (EG_mRFP_BglII-for und EG_mRFP_BglII-rev (siehe 2.1.2)). Plasmid und PCR-Produkt wurden einer Restriktion mit BglII unterzogen. Da bei der anschließenden Ligation das mRFP-kodierende *Insert* sowohl in gewünschter, als auch in verkehrter Orientierung eingebaut werden konnte, musste schließlich durch Sequenzierung ein Klon mit korrekter mRFP-Sequenz-Orientierung ausgewählt werden.

Klonierung von pmRFP-C2-PISTrno

Um das PIST-Protein der Ratte (PISTrno), welches geringe Unterschiede zu menschlichem PIST aufweist, in HEK-293 Zellen zu exprimieren (siehe 3.2.5), musste ein Plasmid generiert werden, das die Information für PISTrno enthält. Zur Amplifizierung der PISTrno-kodierenden Sequenz wurde eine PCR durchgeführt, bei der cDNA aus Rattenhirn-Lysat als *Template* genutzt wurde. Mit PIST-spezifischen Primern (EG_PIST_RN_for und EG_PIST_RN_rev (siehe 2.1.2)) konnte so eine doppelsträngige DNA-Abschrift der PISTrno-Sequenz amplifiziert werden. Dieses PCR-Amplifikat wurde mit Hilfe des *TOPO TA Cloning* -Kits in den Vektor pCR II-TOPO (*TOPO-Vektor*) integriert und sequenziert (Sequenzierprimer: EG_PIST_RN_for, PISTrno351fwd und PISTrno651fwd (siehe 2.1.2)). Nach Auswahl eines fehlerfreien Amplifikates (Übereinstimmung der kodierten Aminosäuresequenz mit dem NCBI-Datenbankeintrag) wurde die PISTrno-Sequenz über die Schnittstellen der Restriktionsenzyme BamHI und EcoRI in den Vektor pmRFPC2 subkloniert (pmRFPC2-PISTrno). Bei dem auf diesem Plasmid kodierten Fusionsprotein liegt mRFP N-terminal von PISTrno.

3.2.2 Interaktionsnachweis von eGFP-PIST und mRFP-Stargazin

Als Vorversuch für spätere Experimente wurde die Interaktion von eGFP-PIST mit mRFP-Stargazin analysiert. Die Interaktion der beiden nativen Proteine PIST und Stargazin wurde bereits beschrieben (Cuadra et al. 2004). Da jedoch bei späteren Experimenten Fluorochrom-markierte Proteinvarianten (eGFP-PIST und mRFP-Stargazin) zum Einsatz kommen sollten, musste überprüft werden, ob auch diese miteinander wechselwirken. Die an der Interaktion beteiligte Domäne von Stargazin wurde auf die Aminosäuren 262 - 282 eingegrenzt. Auf Seiten von PIST sind die Aminosäuren 211 - 312 an der Interaktion mit Stargazin beteiligt (Cuadra et al. 2004). Von mRFP-Stargazin wurden zwei unterschiedliche Proteinvarianten erstellt: In der einen Variante wurde die mRFP-kodierende DNA 5' zu der Stargazin-kodierenden DNA positioniert, wodurch ein Stargazin-Fusionsprotein entsteht, welches am N-terminalen Ende mRFP enthält (Stargazin-N-mRFP, kodiert auf dem Plasmid pcDNA3-stargazin-N-mRFP). Bei der anderen Variante wurde die mRFP-kodierende DNA so positioniert, dass im Fusionsprotein mRFP zwischen den Ami-

nosäuren Ser269 und Met270 von Stargazin eingebaut wird (Stargazin-mRFP269, kodiert auf dem Plasmid pCMV-Tag2B-stargazin-mRFP269). Diese Position ist bereits von mehreren Autoren für die Insertion von GFP genutzt worden (Chen et al. 2000). Die Interaktion von eGFP-PIST mit dieser Stargazinvariante wurde untersucht, weil mRFP bei dieser Variante in dem Bereich von Stargazin liegt, welcher laut Cuadra et al. (2004) ursächlich für die Interaktion mit PIST ist.

Bei dem eGFP-PIST Fusionsprotein ist eGFP N-terminal von PIST positioniert (peGFP-C1-PISTmmu). Die beschriebenen Fusionsproteine wurden in HEK-293 Zellen exprimiert. Für das nachfolgende Koimmunpräzipitationsexperiment wurden die Detergenzextrakte der Zellen eingesetzt. Es wurden parallel mehrere Ansätze untersucht, wobei die Ansätze unterschiedliche Konstellationen der Fusionsproteine enthielten. Bei der Koimmunpräzipitation wurde eGFP-PIST mit Hilfe von *GFP-Trap* präzipitiert. Zum Vergleich wurde stets eine vor der Inkubation mit *GFP-Trap* entnommene Probe (Input) einer Probe des Präzipitates gegenübergestellt.

Die Analyse der Proben mittels SDS-PAGE, *Western Blot* und Immundetektion sowie das Transfektionsschema sind Abbildung 3.11 zu entnehmen. In A erkennt man die erfolgreiche Expression und Präzipitation von eGFP-PIST in den Ansätzen 2, 5 und 6 (dicke Pfeilspitze). Außerdem erkennt man, dass in allen sechs Inputproben endogenes PIST detektiert wurde (schmaler Pfeil). In B ist an den Inputproben 3 - 6 erkennbar, dass auch die mRFP-Stargazin-Konstrukte erfolgreich transfiziert wurden, wobei die unscharf begrenzten höhermolekularen Signale vermutlich auf Multimer- und Komplexbildung zurückzuführen sind. Präzipitiert wurden sie jedoch nur in den Ansätzen 5 und 6 (Banden durch Sterne markiert), in denen auch eGFP-PIST vorhanden war. Hiermit wurde sowohl die Interaktion von Stargazin-N-mRFP (P5) als auch die von Stargazin-mRFP269 (P6) mit eGFP-PIST belegt.

3.2.3 Überexpression von eGFP-PIST und mRFP-Stargazin in Neuronen

Nach erfolgreicher Testexpression von Stargazin-N-mRFP und eGFP-PIST in HEK-293 Zellen wurden die Fusionsproteine in hippokampalen Neuronen exprimiert. Die Plasmid-DNA wurde per Calciumphosphat-Transfektion in die Zellen eingebracht. Nach Fixierung der Neurone wurde die Lokalisation der Fusionsproteine fluoreszenzmikroskopisch untersucht und stellte sich folgendermaßen dar:

eGFP-PIST lokalisierte zuverlässig am Golgi-Apparat (Abbildung 3.12 A). Stargazin-

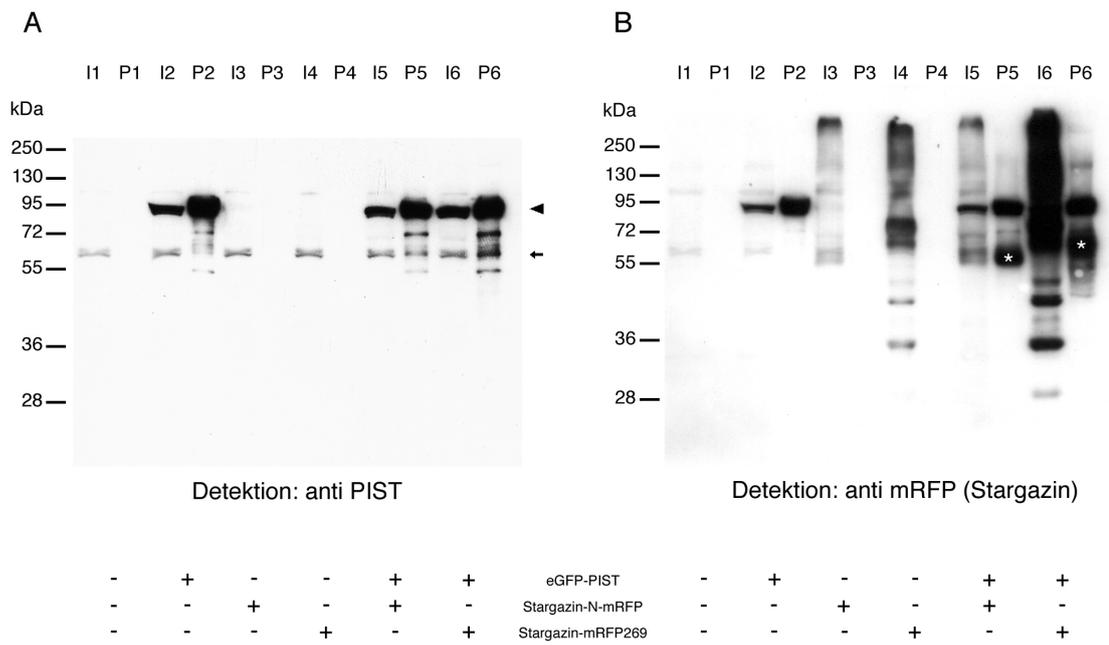


Abbildung 3.11: Koimmunpräzipitation von mRFP-Stargazin mit eGFP-PIST; Die Immun-detektion von (eGFP)-PIST und mRFP-(Stargazin) mit Antikörpern gegen PIST (A) und RFP (B) fand nacheinander statt. Daher sind die in A gefärbten Banden auch in B sichtbar. Die mRFP-Stargazin-Banden in P5 und P6 sind durch Sterne markiert. I = Input; P = Präzipitat; unten: Transfektionsschema

N-mRFP hingegen trat in nicht einheitlicher subzellulärer Verteilung in Erscheinung. Es lokalisierte am Golgi-Apparat, am endoplasmatischen Retikulum (ER) und in Synapsen (synaptische Lokalisation in Abbildung 3.12 B dargestellt). Eine mögliche Erklärung dafür, dass es neben der erwarteten synaptischen Lokalisation auch eine Lokalisation am Golgi-Apparat oder am ER gab, könnte eine unterschiedliche Zelltyp-Zugehörigkeit oder eine unterschiedliche Reifephase der beobachteten Neurone sein.

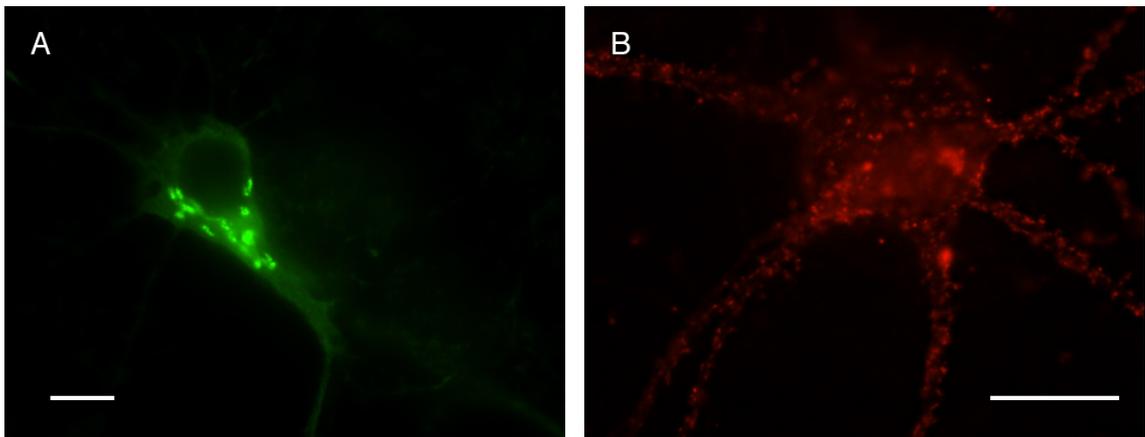


Abbildung 3.12: Expression von eGFP-PIST (A) und mRFP-Stargazin (B) in hippocampalen Rattenneuronen; 7 d Nach Transfektion, insgesamt 14 d in Kultur; Maßstabsbalken $10 \mu\text{m}$

Versuche mit Lebendzell-Mikroskopie

Mit der Absicht, das Verhalten von PIST und Stargazin in lebenden Zellen zu untersuchen, wurden die oben beschriebenen Fusionsproteine in hippocampalen Rattenneuronen exprimiert, welche dann lebend mikroskopiert wurden (Lebendzell-Mikroskopie).

Pro Fusionsprotein wurden mindestens drei Versuche mit Beobachtungszeiträumen von bis zu 30 min durchgeführt. Bei eGFP-PIST konnte keine Dynamik beobachtet werden, es fand sich stets ortsständig am Golgi-Apparat. Bei Stargazin-N-mRFP hingegen konnte Bewegung beobachtet werden. Es zeigten sich bewegliche Vesikel mit starker roter Fluoreszenz (Abbildung 5.1, Anhang). Die Geschwindigkeit eines exemplarischen Vesikels (in Abbildung 5.1 durch Pfeil markiert) betrug $2,2 \mu\text{m/s}$, was 192 mm/d entspricht. Dies steht im Einklang mit Angaben über die Geschwindigkeiten des axoplasmatischen Transports, welche von 1 bis 1000 mm/d reichen

(Weiss and Hiscoe 1948; McEwen and Grafstein 1968).

Als Kontrollversuch wurde ein Plasmid transfiziert, welches nur für mRFP codiert (pmRFP-N1). Auch hier zeigten sich bewegliche rot fluoreszierende Vesikel, die in Zahl und Mobilität den zuvor beobachteten Stargazin-N-mRFP tragenden Vesikeln glichen. Da das Versuchsmodell (Stargazin-N-mRFP) nicht von der Kontrolle (mRFP) zu unterscheiden war, wurde dieser Versuchsansatz nicht weiter verfolgt. Die Geschwindigkeit des in Abbildung 5.2 (Anhang) dargestellten Vesikels betrug $1,6 \mu\text{m/s}$.

3.2.4 Einfluss von cLTP auf die subzelluläre PIST-Lokalisation

Die Übertragungsfähigkeit einer Synapse ist veränderbar. Diese sogenannte synaptische Plastizität basiert auf Änderungen der Rezeptorausstattung der postsynaptischen Membran. Die langfristige Konzentrationszunahme von Glutamatrezeptoren vom AMPA-Typ hat eine verstärkte synaptische Übertragung zur Folge und wird als Langzeitpotenzierung (LTP) bezeichnet. Entsprechend hat die langfristige Konzentrationsabnahme von AMPA-Rezeptoren eine reduzierte synaptische Übertragung zur Folge und wird Langzeitdepression (LTD) genannt.

Von Stargazin ist bekannt, dass es für die Verankerung der AMPA-Rezeptoren in der Postsynapse notwendig ist (Chen et al. 2000). Da PIST mit Stargazin interagiert, stellte sich die Frage, ob auch PIST an synaptischer Plastizität beteiligt ist. Daher wurde ein Experiment durchgeführt, bei dem durch chemische Stimulation von in Kultur befindlichen Neuronen LTP induziert wurde (cLTP). Für die Stimulation wurden nach dem von Oh et al. (2006) beschriebenen Protokoll der Adenylatzyklase Aktivator *Forskolin* und der Phosphodiesterase-4 Inhibitor *Rolipram* in Abwesenheit von Magnesium verwendet. Anschließend wurde eine immunzytochemische Färbung von PIST durchgeführt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht, ob sich die subzelluläre Verteilung im Vergleich zur Kontrollgruppe verändert hat. Pro Gruppe wurden gut 30 Zellen beurteilt. Das Erscheinungsbild der PIST-Verteilung wurde entweder als *normal* oder als *diffus* bewertet, die Auswertung erfolgte kodiert. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt, sodass insgesamt etwa 100 Zellen pro Gruppe beurteilt wurden. Zur Illustration der Gruppenzuordnung zeigt Abbildung 3.13 exemplarisch zwei Zellen, bei denen der Unterschied des Erscheinungsbildes der PIST-Lokalisation deutlich zu erkennen ist. Das Ergebnis der statistische

Auswertung in Abbildung 3.13 zeigt, dass die subzelluläre Lokalisation von PIST nach oben beschriebener Stimulation diffuser ist als in der Kontrollgruppe.

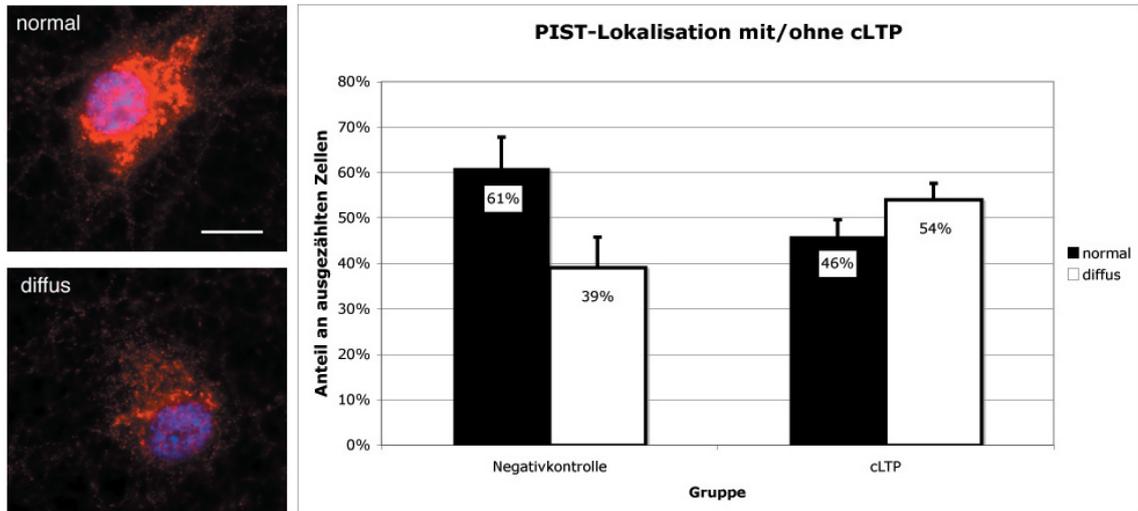


Abbildung 3.13: (Links) Immunzytochemie von PIST (rot) nach cLTP in primären hippocampalen Rattenneuronen; Beispiele von subzellulärer PIST-Lokalisation; Kerndarstellung mit DAPI (blau); Maßstabsbalken 10 μm . (Rechts) Statistische Auswertung der PIST-Lokalisation nach cLTP. Die cLTP-Gruppe wurde für 10 min Magnesium-freiem ACSF (*Artificial Cerebro-Spinal Fluid*) mit 50 μM Forskolin und 0,1 μM Rolipram ausgesetzt. Die Kontrollgruppe wurde derweil nichtmodifiziertem ACSF ausgesetzt; n=3, Mittelwerte mit Standardabweichung

3.2.5 RNAi-Experimente (PIST-*knockdown*)

In dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) konnte 1998 gezeigt werden, dass das Einbringen von Doppelstrang-RNA über *messenger* RNA (mRNA)-Blockade zur post-transkriptionellen Unterdrückung der Proteinbiosynthese eines Proteins führt (Fire et al. 1998). Der Grad der Komplementarität bzw. Übereinstimmung zwischen applizierter RNA und mRNA bestimmt das Ausmaß der Unterdrückung. Dieses Phänomen kann man sich experimentell zu Nutzen machen, indem man gezielt Doppelstrang-RNA in Zellen einbringt, welche komplementär bzw. identisch zur mRNA des zu untersuchenden Proteins ist. Die Doppelstrang-RNA kann entweder in fertiger Form appliziert werden (*short interfering* RNA, siRNA), oder, wie bei den folgenden Versuchen, in Form von Plasmid-DNA, welche den Bauplan für die siRNA beinhaltet. Von diesem Bauplan wird eine einzelsträngige RNA synthetisiert, deren Enden mit sich selbst hybridisieren und dadurch eine Haarnadelstruktur

bilden (*short hairpin* RNA, shRNA). Anschließend wird die shRNA enzymatisch zur siRNA gespalten.

Proteinbiochemische Untersuchung der *Knockdown*effizienz unterschiedlicher siRNA-Sequenzen in HEK-293 Zellen

Von der Firma *SABiosciences* wurden fünf Plasmid-DNA-Varianten bezogen, von denen vier für unterschiedliche gegen PISTrno gerichtete siRNA-Sequenzen codierten, die fünfte hatte eine nicht gegen PISTrno gerichtete siRNA-Sequenz und diente somit als Negativkontrolle (siehe 2.1.3). Der Vektor pmRFPC2-PISTrno wurde mit den unterschiedlichen siRNA-codierenden-Plasmiden in HEK-293 Zellen kotransfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert, das Detergenzextrakt wurde mittels SDS-PAGE, *Western Blot* und Immundetektion analysiert und der mRFP-PISTrno-Gehalt quantitativ erfasst. Abbildung 3.14 zeigt die über vier Einzelexperimente gemittelte Auswertung des Versuchs und exemplarisch die Rohdaten von einem der vier *Western Blots*. siRNA1 erwies sich als am effizientesten, sie senkte den mRFP-PISTrno-Gehalt auf 33 % des Wertes der Kontrollgruppe.

PIST-*knockdown* in hippokampalen Rattenneuronen

Zur Untersuchung, ob der PIST-*knockdown* auch in hippokampalen Neuronen erfolgreich ist, wurden Neurone mit dem siRNA1-codierenden-Plasmid transfiziert, nach fünf Tagen fixiert und immunzytochemisch gegen PIST gefärbt. Es konnte gezeigt werden, dass der PIST-Gehalt in der *knockdown*-Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe deutlich vermindert wurde (Abbildung 3.15). Desweiteren ist dies ein hervorragender Beleg für die hohe Spezifität des verwendeten PIST-Antikörpers. Erste Versuche, bei denen mit siRNA behandelte Neurone immunzytochemisch auf Giantin und die PIST-Interaktionspartner Stargazin und Neuroligin 2 untersucht wurden, zeigten keinen Unterschied zwischen *Knockdown*- und Kontrollgruppe. Stargazin und Neuroligin 2 lokalisierten nach wie vor synaptisch (Daten nicht dargestellt). Es gibt bei diesem Versuch allerdings einige Variablen, die für eventuell nachfolgende Versuche verändert werden könnten, wie zum Beispiel Zeitpunkt und Menge der siRNA Verabreichung oder die Dauer der anschließenden Neuronenkultivierung.

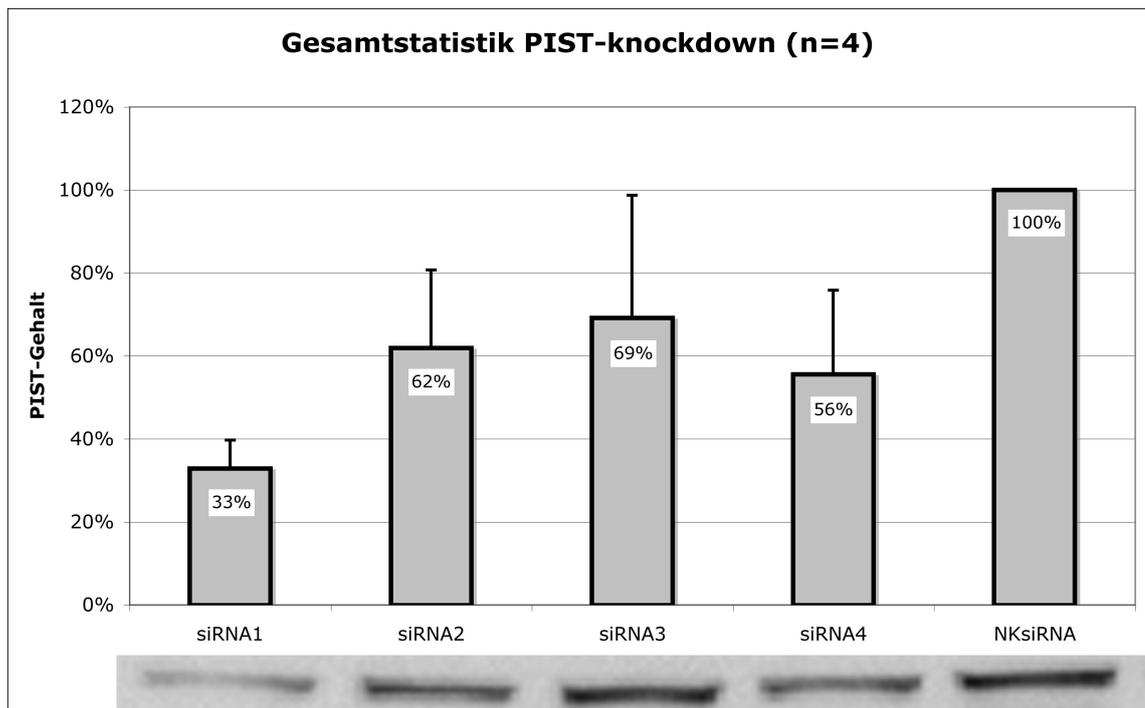


Abbildung 3.14: Quantifizierung der PIST-*knockdown*-Effizienz; dargestellt ist der PIST-Gehalt der jeweiligen Versuchsgruppe im Vergleich zum PIST-Gehalt der Kontrollgruppe. siRNA1 weist den effizientesten PIST-*knockdown* auf, der PIST-Gehalt ist im Vergleich zur Kontrollgruppe auf 33% gesunken; unten exemplarisch die Rohdaten von einem der vier *Western Blots*; n=4, Mittelwerte mit Standardabweichung

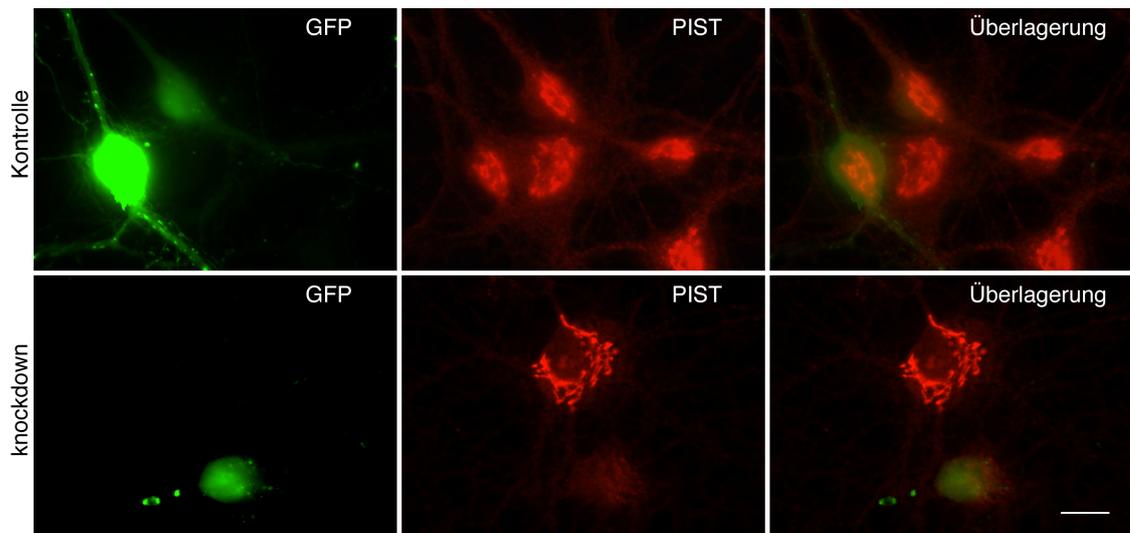


Abbildung 3.15: Immunzytochemie von PIST (rot) nach RNAi; Obere Bilderserie: Kontrollgruppe mit Transfektion von Kontrollplasmid; Untere Bilderserie: *Knockdown*gruppe mit Transfektion von effektivem *knockdown*-Plasmid; Das ebenfalls auf dem Plasmid codierte GFP fungiert als Indikator dafür, welche Zelle das Plasmid aufgenommen hat. In der oberen Bilderserie hat die linke Zelle das Kontrollplasmid aufgenommen (grün), der PIST-Gehalt ist im Vergleich zu den restlichen Zellen unverändert. In der unteren Bilderserie hat die untere Zelle das Plasmid aufgenommen (grün), ihr PIST-Gehalt ist stark vermindert. Maßstabsbalken 10 μm

Diskussion

4.1 Diskussion der Lokalisationsuntersuchungen

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der genaueren Untersuchung der subzellulären Lokalisation von PIST in Neuronen. Da bekannt ist, dass PIST an Proteinsortierung und intrazellulären Transportprozessen beteiligt ist, wurden bei immunzytochemischen Versuchen neben PIST Proteine angefärbt, die als Marker von Organellen des intrazellulären vesikulären Systems dienen.

Hierbei zeigte sich keine Kolo-kalisation mit dem Endosomenmarker Rab 5 (Abbildung 3.2) und mit dem Lysosomenmarker Cathepsin D (Abbildung 3.3). Die Tatsache, dass PIST nicht an Lysosomen vorhanden ist, ist vor dem Hintergrund interessant, dass PIST vermutlich den lysosomalen Abbau von Chloridkanälen (CFTR und ClC-3B) reguliert (Cheng et al. 2004; Gentzsch et al. 2003). Denkbar wäre demnach, dass PIST die Chloridkanäle in Richtung Lysosomen sortiert, sie aber nicht begleitet.

Mit TGN 38, einem Marker des Trans-Golgi-Netzwerkes, weist PIST eine nahezu vollständige Kolo-kalisation auf (Abbildung 3.4). Diese Beobachtung deckt sich mit mehreren Veröffentlichungen. Zum einen haben Cuadra et al. (2004) eine Kolo-kalisation von PIST und TGN 38 in hippokampalen Neuronen und deren Dendriten beschrieben (siehe dort Abbildung 6 a-c), zum anderen wurden von Cheng et al. (2002)

PIST und TGN 38 in Drüsenzellen der Trachea kolokalisiert nachgewiesen (siehe dort Abbildung 4 d-f). Allerdings erlaubt die Auflösung der mikroskopischen Bilder in beiden Arbeiten keine Unterscheidung von cis- und trans-Golgi. Bei genauer Betrachtung von Abbildung 3.4 fallen grün angefärbte und somit TGN 38-haltige Punkte, vermutlich Vesikel, auf. Diese wurden vom PIST-Antikörper nicht erkannt, was bedeutet, dass sie entweder kein PIST enthalten, oder dass die PIST-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Banting and Ponnambalam (1997) postulieren, dass TGN 38 einem stetigen Pendeln zwischen Trans-Golgi-Netzwerk und Zellmembran unterliegt, was die angefärbten Vesikel erklärt. PIST nimmt an dieser Dynamik offensichtlich nicht teil.

Die Immunzytochemie von PIST und Giantin, einem integralen Membranprotein des cis- und medialen Golgi-Apparates, zeigt, dass die Proteine nah bei einander lokalisiert sind (Abbildung 3.5). In der Ausschnittsvergrößerung ist aber zu erkennen, dass keine Kolokalisation vorliegt, sondern eine enge Nachbarschaft. Bezüglich der Lokalisation im Golgi-Apparat lässt sich demnach zusammenfassen, dass PIST am Trans-Golgi-Netzwerk lokalisiert ist und räumliche Nähe, aber keine Kolokalisation zum cis- und medialen Golgi-Marker Giantin aufweist.

Die Tatsache, dass das Trans-Golgi-Netzwerk vom cis- und medialen Golgi-Apparat umgeben ist (Abbildung 3.5), widerspricht der gängigen Lehrbuchdarstellung, wie sie Abbildung 1.1 zu entnehmen ist. Allerdings räumen aktuelle Publikationen diesen Widerspruch aus, da die mit hochauflösender Elektronenmikroskopie dargestellte Ultrastruktur des Golgi-Apparates die Sachlage entsprechend den oben aufgeführten Lokalisationsuntersuchungen von PIST wiedergibt (Abbildung 4.1).

Die Immunzytochemie von PIST und Giantin wurde des Weiteren mit einem konfokalen Mikroskop analysiert und anschließend räumlich rekonstruiert (Abbildung 3.9). Die 3D-Rekonstruktion der Proteinlokalisierung erbrachte zwar anschauliche Darstellungen, konnte aber nicht wesentlich zur Aufklärung der Sachlage beitragen, da bei der computerbasierten räumlichen Rekonstruktion die Schwellenwertfestlegung nicht systematisch möglich war. Die für die Rekonstruktion berücksichtigte Signalintensität war frei wählbar. Daher ist der Vergleich der beiden Farbkanäle und somit der Proteinlokalisationen nicht belastbar.

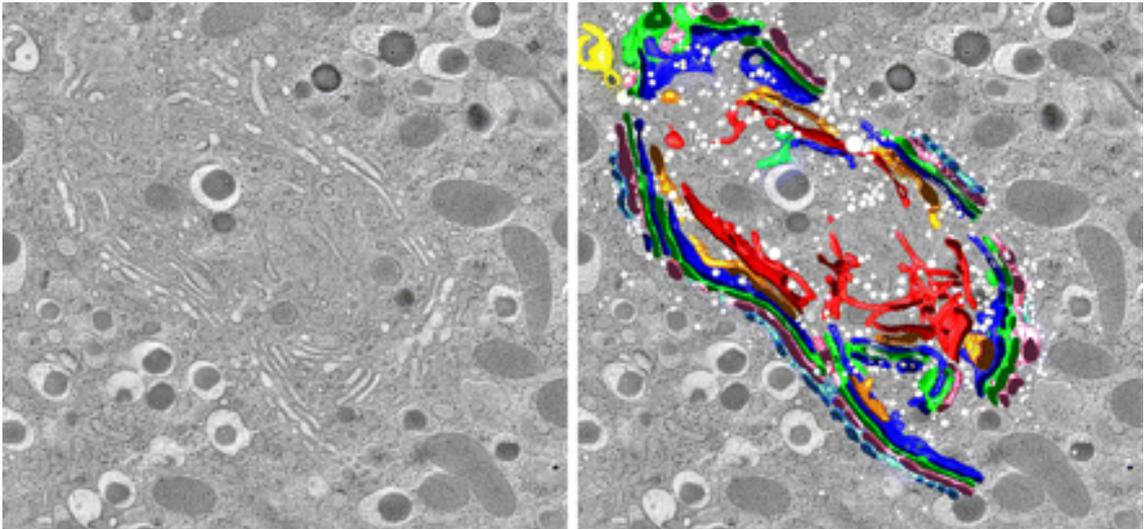


Abbildung 4.1: Ultrastruktur des Golgi-Apparates nach Emr et al. (2009); Golgi-Zisternen von *cis* nach *trans*: hell-blau, pink, grün, dunkel-blau, gold; Trans-Golgi-Netzwerk (TGN): rot; Golgi-assoziierte Vesikel: weiß

Weitere Hinweise auf die subzelluläre Lokalisation von PIST liefert die Brefeldin A-Behandlung von Neuronen mit anschließender Immunzytochemie (Abbildung 3.10). Nach Brefeldin A-Behandlung findet sich Giantin der Literatur entsprechend (Martin et al. 2008) im endoplasmatischen Retikulum wieder (D). PIST hingegen verteilt sich nach Brefeldin A-Behandlung diffus im Zytoplasma (E), wie es auch schon von Charest et al. (2001) in U2-OS-Zellen gezeigt wurde (siehe dort Abbildung 4). In der Literatur über das Trans-Golgi-Netzwerk wird beschrieben, dass sich bei einer Brefeldin A-Behandlung von NRK (*normal rat kidney*) Zellen eine Umverteilung von TGN 38 zu den Mikrotubuli organisierenden Zentren (MTOC) der Zellen beobachten lässt (Banting and Ponnambalam (1997), siehe dort Abbildung 2 c-f).

Die Giantinfärbung visualisiert bei diesem Versuch den Verbleib der Membranen des Golgi-Apparates und TGN 38 ist als Stellvertreter für den Verbleib der Membranen des Trans-Golgi-Netzwerks zu verstehen. PIST bewahrt nach Brefeldin A-Behandlung weder seine Nachbarschaft zu Giantin, noch verhält es sich wie TGN 38. Demnach ist die Schlussfolgerung, dass PIST nur bei intaktem Trans-Golgi-Netzwerk an selbigem lokalisiert ist. Da PIST mit zytosolischen Domänen seiner Interaktionspartner aus der Gruppe der integralen Membranproteine interagiert, muss PIST den Membranen des Trans-Golgi-Netzwerks auf zytosolischer Seite angelagert sein. Die Wechselwirkung, welche PIST im physiologischen Zustand an den Membranen des

Trans-Golgi-Netzwerks hält (möglicherweise die Interaktion mit Golgin-160 und Syntaxin 6), wird offensichtlich durch Brefeldin A - Behandlung aufgehoben.

Bei Cuadra et al. (2004) wird die These aufgestellt, dass PIST seine Interaktionspartner vom Golgi-Apparat über Transportvesikel bis zur Zielmembran begleitet. Um diese These zu überprüfen, wurden weitere immunzytochemische Versuche durchgeführt, bei denen neben PIST die PIST-Interaktionspartner Neurologin 2 und Stargazin fluoreszenzmarkiert wurden. Aus den Abbildungen 3.6 und 3.7 ist ersichtlich, dass keine Kolo-kalisation beobachtet wurde. Dieser Befund würde erneut dafür sprechen, dass PIST an der Sortierung seiner Interaktionspartner beteiligt ist, sie aber nicht zur Zielmembran begleitet. Dennoch kann nicht mit Sicherheit behauptet werden, dass PIST seine Interaktionspartner nicht zur Membran begleitet, da die Sensitivität der Immunfluoreszenz begrenzt ist. Es ist nicht auszuschließen, dass der Großteil der zellulären PIST Proteinmenge am TGN lokalisiert ist, während ein kleiner, unter der Nachweisgrenze der Immunfluoreszenz liegender Teil Interaktionspartner zu Zielmembranen begleitet.

Neben den immunzytochemischen Versuchen wurde zur Lokalisationsuntersuchung von PIST eine PSD-Präparation per *Western Blot* analysiert (Abbildung 3.1). Die eingesetzten Gehirne waren vor der Präparation vom Kleinhirn befreit worden. In der Spur der PSD-Fraktion ist eine Bande auf Höhe von PIST schwach sichtbar, die allerdings gegenüber der Bande im Homogenisat nicht angereichert, sondern deutlich weniger intensiv ist. PIST ist demnach, wenn überhaupt, nur in geringer Menge in der postsynaptischen Dichte vorhanden. Dies steht im Einklang mit einer Veröffentlichung, in der massenspektrometrisch das gesamte Proteom der PSD von Ratten und Mäusen untersucht wurde (Jordan et al. 2004); PIST wurde nicht gefunden. Die PIST-Bande in der PSD-Fraktion könnte so begründet sein, dass die Spezifität der PSD-Präparation nicht ausreichend ist, um nicht-PSD-Proteine aus der PSD-Fraktion zu entfernen. Die übrigen Banden in der PSD-Fraktion sind vermutlich stark angereicherte PSD-Proteine. Der Anti-PIST-Antikörper ist gegen einen Bereich von PIST gerichtet, der auch die PDZ-Domäne umfasst. Da viele PSD-Proteine eine PDZ-Domäne beinhalten, wurden diese vermutlich wegen ihrer starken Anreicherung ebenfalls vom Antikörper erkannt. Die Aussage, dass PIST in der PSD nicht angereichert ist, muss wahrscheinlich auf das Großhirn beschränkt werden. Bei einer PSD-Präparation, in der nur Kleinhirne untersucht worden sind, wurde PIST in der

PSD-Fraktion angereichert nachgewiesen (Yue et al. (2002), siehe dort Abbildung 1 d).

Alle bisher diskutierten Versuche und Publikationen zeigen PIST am Trans-Golgi-Netzwerk und in Neuronen des Kleinhirns zudem in der postsynaptischen Dichte. Es soll darüber hinaus nicht unerwähnt bleiben, dass es zwei Veröffentlichungen gibt, die PIST deutlich an der Zellmembran nachweisen. Sowohl in vollständig polarisierten MDCK-Zellen (Yao et al. (2002), siehe dort Abbildung 4 b), als auch bei Koexpression mit einer konstitutiv-aktiven Variante der GTPase TC10 in COS 7-Zellen (Cheng et al. (2005), siehe dort Abbildung 6 g-i), konnte PIST an der Zellmembran beobachtet werden. Dies belegt, dass PIST nicht ortständig am Trans-Golgi-Netzwerk lokalisiert ist und lässt vermuten, dass bei entsprechender Herangehensweise weitere zelluläre Mechanismen gefunden werden können, bei denen sich PIST vermutlich über das vesikuläre System innerhalb der Zelle bewegt.

4.2 Diskussion der funktionellen Studien

Die für diese Arbeit durchgeführten funktionellen Studien behandelten zum Großteil die Interaktion von PIST mit Stargazin. Für die in Kapitel 3.2.2 beschriebenen Koimmunpräzipitationen wurden zwei unterschiedliche Stargazin-Varianten erstellt, wobei eine Variante das Fluoreszenzprotein mRFP am N-terminalen Ende enthielt, die andere hingegen innerhalb des Proteins. Die Position von mRFP war hierbei so gewählt, dass es sich innerhalb jenes Proteinbereiches befand, welcher für die Wechselwirkung mit PIST verantwortlich ist (Aminosäuren 262 - 282, vgl. Cuadra et al. (2004)). Beide Stargazin-Varianten wurden erfolgreich mit eGFP-PIST präzipitiert (Abbildung 3.11). Damit wurde sichergestellt, dass die in späteren Versuchen verwendeten Proteinvarianten eGFP-PIST und mRFP-Stargazin miteinander wechselwirken. Zum anderen wurde gezeigt, dass das im Interaktionbereich von Stargazin positionierte mRFP die Wechselwirkung mit PIST erstaunlicherweise nicht negativ beeinflusst. Diese Sachlage lässt vermuten, dass PIST und Stargazin möglicherweise zusätzlich über andere Proteinregionen, zum Beispiel die PDZ-Domäne von PIST, miteinander wechselwirken.

Die Proteinvarianten eGFP-PIST und mRFP-Stargazin wurden in primären hip-

pokampalen Rattenneuronen exprimiert und lebend mikroskopiert (3.2.3). Dabei wurde eGFP-PIST ortstständig am TGN beobachtet. Diese Beobachtung stützt erneut die These, dass PIST seiner Funktion lokal im TGN nachkommt, und nicht am vesikulären Transport zur Plasmamembran oder zu membranumschlossenen Organellen wie Lysosomen teilnimmt. Bei der Expression von mRFP-Stargazin konnte hingegen Bewegung entlang der Dendriten beobachtet werden (Abbildung 5.1, Anhang). Auch das als Kontrolle exprimierte bloße Fluoreszenzprotein mRFP bewegte sich entlang der Dendriten (Abbildung 5.2, Anhang). Es stellt sich daher die Frage, ob das mRFP ursächlich für die beobachtete Mobilität ist. Wenn das der Fall ist, stellt dies die Verwendung von mRFP-Fusionsproteinen für Lebendzellmikroskopie grundsätzlich in Frage. Bei herkömmlicher Fluoreszenzmikroskopie an fixierten Zellen wurde jedoch auch eine erfolgreiche synaptische Lokalisation von überexprimiertem mRFP-Stargazin beobachtet (Abbildung 3.12). Folglich ist das verwendete mRFP-Stargazin-Konstrukt zu synaptischer Lokalisation in der Lage, was jedoch nicht in der Lebendzellmikroskopie beobachtet werden konnte.

In Kapitel 3.2.4 wurde beschrieben, wie sich eine Stimulation von Neuronen mit Rolipram und Forskolin in Abwesenheit von Magnesium (cLTP) auf die subzelluläre PIST-Lokalisation auswirkt. Hintergrund für diesen Versuch war die Überlegung, ob PIST an synaptischer Plastizität beteiligt ist. Synaptische Plastizität umfasst den Ein- und Ausbau von AMPA-Rezeptoren in die postsynaptische Membran von Neuronen, wodurch die Effizienz der synaptischen Transmission moduliert wird. Bei diesem Rezeptorverkehr ist Stargazin an AMPA-Rezeptoren gebunden und verankert diese in der postsynaptischen Membran. Da PIST mit Stargazin interagiert, stellte sich die Frage, wie sich PIST bei synaptischer Plastizität verhält. Durch Stimulation mit Rolipram und Forskolin in Abwesenheit von Magnesium kann LTP (Long Term Potentiation), also der Einbau von AMPA-Rezeptoren in die postsynaptische Membran, induziert werden (Oh et al. 2006). Der Versuch ergab, dass PIST nach der Stimulation tendenziell eine diffusere subzelluläre Lokalisation aufweist (Abbildung 3.13).

Dieser Versuch ist jedoch kritisch zu betrachten. Zum einen ist nicht klar, ob der beobachtete Effekt tatsächlich auf LTP zurückzuführen ist. Rolipram, ein Phosphodiesterase-4-Inhibitor, und Forskolin, ein Aktivator der Adenylatzyklase, führen zu einem erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegel. Dieser kann vielfältige unüberschau-

bare Folgen haben. Die PIST-Umverteilung könnte also auch auf Wirkmechanismen zurückzuführen sein, die nicht in Zusammenhang mit LTP stehen. Zum anderen wurde zwar verblindet ausgewertet und die Zahl der beurteilten Zellen war mit etwa 100 pro Gruppe groß genug für eine statistische Auswertung, aber die Kategorisierung hatte keine scharfen Kriterien. Eine Verbesserung des Versuchs wäre eine LTP-Induktion mit NMDA, einem hochspezifischen Liganden der Glutamat-rezeptoren vom NMDA-Typ. Die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren ist ein essentieller Bestandteil der physiologischen Langzeitpotenzierung. So könnten nicht-LTP-Effekte ausgeschlossen werden. Außerdem wäre eine computerbasierte PIST-Verteilungsmusteranalyse denkbar, wobei eine noch größere Zellzahl beurteilt werden könnte. Es ist jedoch zu bedenken, dass PIST aktuellen Erkenntnissen zu Folge seiner sortierenden Funktion vor allem am TGN nachkommt. Synaptische Plastizität spielt sich hingegen vornehmlich in der Postsynapse ab. Es ist gut möglich, dass PIST und Stargazin nur während der Zielsteuerung von Stargazin auf dem Weg zur Postsynapse miteinander in Kontakt treten, PIST jedoch mit den Vorgängen der synaptischen Plastizität nichts zu tun hat.

Die RNA-Interferenz-Versuche (PIST-*knockdown*), die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, sind als Vorversuche zu betrachten. In HEK-293 Zellen wurde erfolgreich untersucht, welches der zur Verfügung stehenden siRNA-Konstrukte am effizientesten die Überexpression des kotransfizierten mRFP-PIST hemmt. siRNA1 reduzierte die mRFP-PIST-Synthese auf ein Drittel des Kontrollwertes (Abbildung 3.14). Die Verminderung der mRFP-PIST-Überexpression ist ein guter prädiktiver Indikator für die Verminderung der Proteinbiosynthese des endogenen PIST. Dass tatsächlich auch die Synthese des endogenen PIST durch die siRNA reduziert wurde, zeigte der nachfolgende Versuch. Die Anwendung der siRNA in primär kultivierten hippokampalen Neuronen führte zu einer deutlichen Reduktion des endogenen PIST, was mittels Immunzytochemie analysiert wurde (Abbildung 3.15). Zu den beiden Herangehensweisen ist zu bemerken, dass der quantitative Ansatz in HEK-293 Zellen auf proteinbiochemischer Methodik basiert und dabei eine Aussage über das eingesetzte Zellkollektiv trifft. Über die Effizienz des PIST-*knockdowns* in der einzelnen Zelle kann hierbei keine Aussage getroffen werden. Bei der in Neuronen durchgeführten fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung hingegen kann der *knock-down*-Effekt auf eine einzelne Zelle beurteilt werden, allerdings nur qualitativ und

nicht einwandfrei quantitativ. Die weiteren Auswirkungen eines verminderten zellulären PIST-Gehaltes wurden in ersten Versuchen immunzytochemisch untersucht, wobei gegen Stargazin, Neuroligin 2 und Giantin gefärbt wurde. Hierbei konnten keine Unterscheide zwischen *Knockdown*- und Kontrollgruppe beobachtet werden.

Nachgewiesenermaßen gegen PIST wirksame siRNA ist ein vielversprechendes Werkzeug zur weiteren Untersuchung der Funktion von PIST und kann als Basis für weiterführende Versuche genutzt werden. So wurden in der Arbeitsgruppe bereits elektrophysiologische Versuche begonnen, bei denen mit siRNA transfizierte Neurone mittels *Patchclamp* auf Änderungen der Membraneigenschaften untersucht werden. Weiterhin denkbar sind systematischere immunzytochemische Untersuchungen mit Änderung von Verabreichungszeitpunkt und -menge der siRNA und einer breiteren Auswahl an fluoreszenzmarkierten Zielproteinen wie zum Beispiel Glutamatrezeptoren und Cadherine.

Abschließend lässt sich sagen, dass die durchgeführten Versuche darauf hinweisen, dass PIST einer sortierenden Funktion im Trans-Golgi-Netzwerk nachkommt. PIST nimmt dabei nicht am vesikulären Transport teil, sondern bleibt ortsständig am TGN. Interessanterweise haben alle mit PIST interagierenden Membranproteine mindestens einen weiteren zellmembranlokalisierten PDZ-Domänen-Interaktionspartner, welcher für die Membranverankerung des jeweiligen Membranproteins notwendig ist. Demnach ist die wahrscheinlichste Funktion von PIST, seine vielfältigen Interaktionspartner an das Trans-Golgi-Netzwerk zu binden, bis ein anderes PDZ-Domänen Protein diese Bindung löst und das zuvor von PIST gebundene Membranprotein zu seinem Bestimmungsort begleitet. Im Fall von CFTR wurde dies für das *targeting* zum Lysosomen beschrieben (Cheng et al. 2010), für Cadherin 23 wurde Vergleichbares für den Transport zur Plasmamembran nachgewiesen (Xu et al. 2010). Die in dieser Arbeit präsentierten Experimente mit PIST und den Interaktionspartnern Stargazin und Neuroligin 2 unterstützen diese These.

Zusammenfassung

Der vesikuläre Transport zwischen membranumschlossenen Organellen und der Zellmembran eukaryotischer Zellen unterliegt einer strengen Regulation. In allen beteiligten Kompartimenten gibt es Proteine, die die korrekte Sortierung von transportierten Proteinen gewährleisten. Das Protein **PIST** wird als potentieller Kandidat eines Sortierproteins im Golgi-Apparat gehandelt. Nachgewiesene Interaktionen mit mehreren integralen Membranproteinen und mit Proteinen, deren Funktion im vesikulären Transportsystem belegt ist, sind hierfür starke Indizien. Neben seiner vielfach beschriebenen Lokalisation am Golgi-Apparat wurde PIST darüberhinaus unter bestimmten Bedingungen auch schon an der Zellmembran beobachtet.

Eines der Ziele dieser Arbeit war eine genaue Beschreibung der subzellulären Lokalisation von PIST in Neuronen. Unter Verwendung eines hochauflösenden Fluoreszenzmikroskops konnte das Verteilungsmuster von PIST in hippokampalen Neuronen detailliert beschrieben werden. PIST wurde am Trans-Golgi-Netzwerk lokalisiert und zeigte keine Kolo-kalisation mit Giantin, einem Markerprotein des cis- und medialen Golgi-Apparates.

Auf Grund der in der Literatur beschriebenen Interaktionen von PIST mit mehreren synaptischen Proteinen (Glutamatrezeptoren, Neuroligine, Stargazin), wurde das Augenmerk des Weiteren auf eine mögliche synaptische Lokalisation gerichtet, welche fluoreszenzmikroskopisch nicht nachgewiesen werden konnte. Bei der prote-

inbiochemischen Untersuchung von cerebralen PSD-Präparationen konnte ebenfalls keine Anreicherung von PIST beobachtet werden. Mit Bezug auf die Literatur über PIST scheint sich die Präsenz von PIST in der PSD auf das Kleinhirn zu beschränken.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten funktionellen Untersuchungen richteten sich auf die Interaktion von PIST mit Stargazin, einem AMPA-Rezeptor-assoziierten Protein. Mit GFP und RFP gekoppelte PIST- und Stargazin-Varianten wurden in hippocampalen Neuronen exprimiert. Mit einer *live imaging*-Apparatur wurden die Zellen lebend am Fluoreszenzmikroskop beobachtet. GFP-PIST konnte ausschließlich am Trans-Golgi-Netzwerk nachgewiesen werden. RFP-Stargazin stellte sich in unterschiedlicher Lokalisation dar (ER, Golgi-Apparat, Synapsen). Eine zuverlässige Kolo-kalisation von GFP-PIST und RFP-Stargazin konnte nicht gezeigt werden.

Weiterhin wurde der Einfluss von chemisch induzierter Langzeitpotenzierung (cLTP) auf die PIST-Lokalisation analysiert. Fluoreszenzmikroskopisch konnte nach cLTP eine leichte Lokalisationsänderung beobachtet werden.

Abschließend wurde ein RNA-Interferenz-basiertes PIST-Mangelmodell etabliert, wobei die zelluläre PIST-Expression auf ein Drittel des Kontrollwertes gesenkt werden konnte.

Die aktuelle Publikationslage deckt sich mit den vorgestellten Ergebnissen. Nach derzeitigem Wissensstand ist PIST ein im Trans-Golgi-Netzwerk lokalisiertes Protein mit der Funktion, seine vielfältigen Interaktionspartner zum richtigen Zeitpunkt auf den richtigen Weg in das vesikuläre Transportsystem zu entlassen.

Literaturverzeichnis

- G. Banting and S. Ponnambalam. TGN38 and its orthologues: roles in post-TGN vesicle formation and maintenance of TGN morphology. *Biochim. Biophys. Acta*, 1355:209–217, Mar 1997.
- F. A. Barr and B. Short. Golgins in the structure and dynamics of the Golgi apparatus. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 15:405–413, Aug 2003.
- J. S. Bonifacino and B. S. Glick. The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell*, 116:153–166, Jan 2004.
- R. K. Carlin, D. J. Grab, R. S. Cohen, and P. Siekevitz. Isolation and characterization of postsynaptic densities from various brain regions: enrichment of different types of postsynaptic densities. *J. Cell Biol.*, 86:831–845, Sep 1980.
- A. Charest, K. Lane, K. McMahon, and D. E. Housman. Association of a novel PDZ domain-containing peripheral Golgi protein with the Q-SNARE (Q-soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF) attachment protein receptor) protein syntaxin 6. *J. Biol. Chem.*, 276:29456–29465, Aug 2001.
- L. Chen, D. M. Chetkovich, R. S. Petralia, N. T. Sweeney, Y. Kawasaki, R. J. Wenthold, D. S. Brecht, and R. A. Nicoll. Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. *Nature*, 408:936–943, 2000.
- J. Cheng, B. D. Moyer, M. Milewski, J. Loffing, M. Ikeda, J. E. Mickle, G. R. Cutting, M. Li, B. A. Stanton, and W. B. Guggino. A Golgi-associated PDZ domain protein

- modulates cystic fibrosis transmembrane regulator plasma membrane expression. *J. Biol. Chem.*, 277:3520–3529, Feb 2002.
- J. Cheng, H. Wang, and W. B. Guggino. Modulation of mature cystic fibrosis transmembrane regulator protein by the PDZ domain protein CAL. *J. Biol. Chem.*, 279:1892–1898, Jan 2004.
- J. Cheng, H. Wang, and W. B. Guggino. Regulation of cystic fibrosis transmembrane regulator trafficking and protein expression by a Rho family small GTPase TC10. *J. Biol. Chem.*, 280:3731–3739, Feb 2005.
- J. Cheng, V. Cebotaru, L. Cebotaru, and W. B. Guggino. Syntaxin 6 and CAL mediate the degradation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Mol. Biol. Cell*, 21:1178–1187, Apr 2010.
- C. T. Chung, S. L. Niemela, and R. H. Miller. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86:2172–2175, Apr 1989.
- A. E. Cuadra, S. H. Kuo, Y. Kawasaki, D. S. Bredt, and D. M. Chetkovich. AMPA receptor synaptic targeting regulated by stargazin interactions with the Golgi-resident PDZ protein nPIST. *J. Neurosci.*, 24:7491–7502, Aug 2004.
- G. M. Denning, M. P. Anderson, J. F. Amara, J. Marshall, A. E. Smith, and M. J. Welsh. Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature*, 358:761–764, Aug 1992.
- A. Dinter and E. G. Berger. Golgi-disturbing agents. *Histochem. Cell Biol.*, 109:571–590, 1998.
- S. Emr, B. S. Glick, A. D. Linstedt, J. Lippincott-Schwartz, A. Luini, V. Malhotra, B. J. Marsh, A. Nakano, S. R. Pfeffer, C. Rabouille, J. E. Rothman, G. Warren, and F. T. Wieland. Journeys through the Golgi—taking stock in a new era. *J. Cell Biol.*, 187:449–453, Nov 2009.
- A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, and C. C. Mello. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391:806–811, Feb 1998.

- M. Gentzsch, L. Cui, A. Mengos, X. B. Chang, J. H. Chen, and J. R. Riordan. The PDZ-binding chloride channel ClC-3B localizes to the Golgi and associates with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-interacting PDZ proteins. *J. Biol. Chem.*, 278:6440–6449, Feb 2003.
- C. Hanus and M. D. Ehlers. Secretory outposts for the local processing of membrane cargo in neuronal dendrites. *Traffic*, 9:1437–1445, Sep 2008.
- C. Harter and C. Reinhard. The secretory pathway from history to the state of the art. *Subcell. Biochem.*, 34:1–38, 2000.
- J. He, M. Bellini, H. Inuzuka, J. Xu, Y. Xiong, X. Yang, A. M. Castleberry, and R. A. Hall. Proteomic analysis of beta1-adrenergic receptor interactions with PDZ scaffold proteins. *J. Biol. Chem.*, 281:2820–2827, Feb 2006.
- S. W. Hicks and C. E. Machamer. Isoform-specific interaction of golgin-160 with the Golgi-associated protein PIST. *J. Biol. Chem.*, 280:28944–28951, Aug 2005.
- H. Ito, I. Iwamoto, K. Mizutani, R. Morishita, T. Deguchi, Y. Nozawa, T. Asano, and K. Nagata. Possible interaction of a Rho effector, Rhotekin, with a PDZ-protein, PIST, at synapses of hippocampal neurons. *Neurosci. Res.*, 56:165–171, Oct 2006.
- J. H. Ives, S. Fung, P. Tiwari, H. L. Payne, and C. L. Thompson. Microtubule-associated protein light chain 2 is a stargazin-AMPA receptor complex-interacting protein in vivo. *J. Biol. Chem.*, 279:31002–31009, Jul 2004.
- B. A. Jordan, B. D. Fernholz, M. Boussac, C. Xu, G. Grigorean, E. B. Ziff, and T. A. Neubert. Identification and verification of novel rodent postsynaptic density proteins. *Mol. Cell Proteomics*, 3:857–871, Sep 2004.
- X. Li, J. Zhang, Z. Cao, J. Wu, and Y. Shi. Solution structure of GOPC PDZ domain and its interaction with the C-terminal motif of neuroligin. *Protein Sci.*, 15:2149–2158, Sep 2006.
- M. F. Lise and A. El-Husseini. The neuroligin and neurexin families: from structure to function at the synapse. *Cell. Mol. Life Sci.*, 63:1833–1849, Aug 2006.

- L. Martin, R. Fluhrer, K. Reiss, E. Kremmer, P. Saftig, and C. Haass. Regulated intramembrane proteolysis of Bri2 (Itm2b) by ADAM10 and SPPL2a/SPPL2b. *J. Biol. Chem.*, 283:1644–1652, Jan 2008.
- B. S. McEwen and B. Grafstein. Fast and slow components in axonal transport of protein. *J. Cell Biol.*, 38:494–508, Sep 1968.
- G. Meyer, F. Varoquaux, A. Neeb, M. Oschlies, and N. Brose. The complexity of PDZ domain-mediated interactions at glutamatergic synapses: a case study on neuroligin. *Neuropharmacology*, 47:724–733, Oct 2004.
- C. L. Neudauer, G. Joberty, and I. G. Macara. PIST: a novel PDZ/coiled-coil domain binding partner for the rho-family GTPase TC10. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 280:541–547, Jan 2001.
- M. C. Oh, V. A. Derkach, E. S. Guire, and T. R. Soderling. Extrasynaptic membrane trafficking regulated by GluR1 serine 845 phosphorylation primes AMPA receptors for long-term potentiation. *J. Biol. Chem.*, 281:752–758, Jan 2006.
- S. R. Pfeffer. Multiple routes of protein transport from endosomes to the trans Golgi network. *FEBS Lett.*, 583:3811–3816, Dec 2009.
- B. Reaves, A. Wilde, and G. Banting. Identification, molecular characterization and immunolocalization of an isoform of the trans-Golgi-network (TGN)-specific integral membrane protein TGN38. *Biochem. J.*, 283 (Pt 2):313–316, Apr 1992.
- U. Rothbauer, K. Zolghadr, S. Muyldermans, A. Schepers, M. C. Cardoso, and H. Leonhardt. A versatile nanotrap for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins. *Mol. Cell Proteomics*, 7:282–289, Feb 2008.
- B. Soennichsen, M. Lowe, T. Levine, E. Jaemsae, B. Dirac-Svejstrup, and G. Warren. A role for giantin in docking COPI vesicles to Golgi membranes. *J. Cell Biol.*, 140:1013–1021, Mar 1998.
- S. Tiede, S. Storch, T. Luebke, B. Henrissat, R. Bargal, A. Raas-Rothschild, and T. Braulke. Mucopolidosis II is caused by mutations in GNPTA encoding the alpha/beta GlcNAc-1-phosphotransferase. *Nat. Med.*, 11:1109–1112, Oct 2005.
- P. Weiss and H. B. Hiscoe. Experiments on the mechanism of nerve growth. *J. Exp. Zool.*, 107:315–395, Apr 1948.

- W. Wente, T. Stroh, A. Beaudet, D. Richter, and H. J. Kreienkamp. Interactions with PDZ domain proteins PIST/GOPC and PDZK1 regulate intracellular sorting of the somatostatin receptor subtype 5. *J. Biol. Chem.*, 280:32419–32425, Sep 2005.
- M. Wolde, A. Fellows, J. Cheng, A. Kivenson, B. Coutermarsh, L. Talebian, K. Karlsson, A. Piserchio, D. F. Mierke, B. A. Stanton, W. B. Guggino, and D. R. Madden. Targeting CAL as a negative regulator of DeltaF508-CFTR cell-surface expression: an RNA interference and structure-based mutagenetic approach. *J. Biol. Chem.*, 282:8099–8109, Mar 2007.
- Z. Xu, K. Oshima, and S. Heller. PIST regulates the intracellular trafficking and plasma membrane expression of Cadherin 23. *BMC Cell Biol.*, 11:80, 2010.
- R. Yao, T. Maeda, S. Takada, and T. Noda. Identification of a PDZ domain containing Golgi protein, GOPC, as an interaction partner of frizzled. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 286:771–778, Aug 2001.
- R. Yao, C. Ito, Y. Natsume, Y. Sugitani, H. Yamanaka, S. Kuretake, K. Yanagida, A. Sato, K. Toshimori, and T. Noda. Lack of acrosome formation in mice lacking a Golgi protein, GOPC. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99:11211–11216, Aug 2002.
- Z. Yue, A. Horton, M. Bravin, P. L. DeJager, F. Selimi, and N. Heintz. A novel protein complex linking the delta 2 glutamate receptor and autophagy: implications for neurodegeneration in lurcher mice. *Neuron*, 35:921–933, Aug 2002.
- J. Zhang, S. Cheng, Y. Xiong, Y. Ma, D. Luo, A. Jeromin, H. Zhang, and J. He. A novel association of mGluR1a with the PDZ scaffold protein CAL modulates receptor activity. *FEBS Lett.*, 582:4117–4124, Dec 2008.

Teile dieser Arbeit werden in geteilter Erstautorenschaft in der Fachzeitschrift *Journal of Comparative Neurology* veröffentlicht (*in press*):

Regional and Subcellular Distribution of the Receptor-Targeting Protein PIST/GOPC in the Rat Central Nervous System.

Annie Chen, **Enno Goessling**, Leora Witkowski, Amar Bhindi, Carola Bauch, Genevieve Roussy, Philippe Sarret, Hans-Juergen Kreienkamp, Thomas Stroh.

J Comp Neurol., 2011

Ein Poster mit Teilen dieser Arbeit wurde auf der Fachtagung *29th Blankenese Conference - Protein Processing Meets Synaptic Transmission* präsentiert:

Sorting of plasma membrane receptors by the Golgi-associated protein PIST.

Enno Gößling, Carola Bauch, Corinna Sawallisch, Sabrina Sieber and Hans-Jürgen Kreienkamp.

Tabelle 5.1: Bezugsquellen des Materials für molekularbiologische Arbeiten

Desoxynukleotide	Invitrogen
Taq-Polymerase	Qiagen
10 x PCR-Puffer	Qiagen
Restriktionsendonukleasen	Fermentas
T4 DNA Ligase	Invitrogen
10 x Ligasepuffer	Invitrogen
Bacto-Trypton	AppliChem
Hefeextrakt	Alfa Aesar
Select Agar	Invitrogen
Ampicillin	Sigma
Kanamycinsulfat	Fluka
NucleoBond-XtraMini Kit	Machery & Nagel
NucleoBond-XtraMidi Kit	Machery & Nagel
Agarose	Invitrogen
Ethidiumbromid	Merck
6 x DNA-Ladepuffer	Fermentas
DNA-Größenstandards	Fermentas
Qiaex II Gel Extraction Kit	Qiagen
Ethanol	Geyer
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen

Tabelle 5.2: Bezugsquellen des Materials für zellbiologische Arbeiten

Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM)	Lonza
HBSS	PAA
MEM	PAA
FCS	Invitrogen
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen
Trypsin	Invitrogen
Horseserum	Invitrogen
GIBCO Neurobasal Medium	Invitrogen
B27	Invitrogen
L-Glutamin	Invitrogen
Glutamat	Invitrogen
Primocin	Lonza
Cytarabin (AraC)	Sigma
PermaFluor Aqueous Mounting Medium	Thermo Scientific
Objektträger	Assistent
Deckgläschen	Assistent
Poly-L-Lysin	Sigma
12-Loch-Zellkulturschale	Nunc
100 x 20 mm Zellkulturschale	Sarstedt
Mikroskopie-Zellkulturschale <i>μ-Dish 35mm high</i>	Ibidi
Brefeldin A	AppliChem
Rolipram	Sigma
Forskolin	Merck
Formaldehyd	Sigma
Triton-X-100	Sigma
4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI)	Sigma

Tabelle 5.3: Bezugsquellen des Materials für proteinbiochemische Arbeiten

Proteaseinhibitoren	ICN Biomedicals
GFP-Trap A	Chromotek
Acrylamid-Mix	Biorad
Trizma Base (Tris)	Sigma
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma
Magermilchpulver	Spinnrad
Pierce ECL <i>Western Blotting Substrate</i>	Thermo Scientific
Röntgenfilme	Agfa

Alphabetische Aufzählung der Bezugsfirmen mit Firmensitz:

Agfa (Düsseldorf), Alfa Aesar (Karlsruhe), AppliChem (Darmstadt), Assistent (Sondheim), Biorad (München), Chromotek (Planegg-Martinsried), Fermentas (St. Leon), Fluka (Steinheim), Geyer (Hamburg), Ibidi (Martinsried), ICN Biomedicals (Eschwege), Invitrogen (Karlsruhe), Lonza (Walkersville, USA), Machery & Nagel (Düren), Merck (Darmstadt), Nunc (Roskilde, Dänemark), PAA (Pasching, Österreich), Roth (Karlsruhe), Qiagen (Hilden), Sarstedt (Nümbrecht), Sigma (Taufkirchen), Spinnrad (Bad Segeberg), Thermo Scientific (Waltham, USA)

Tabelle 5.4: Zusammensetzung von Puffern und Lösungen

5x KCM	0,5 M KCl, 0,15 M CaCl ₂ , 0,25 M MgCl ₂
LB-Medium	10 g/l Bacto-Trypton, 10 g/l NaCl, 10 g/l He-feextrakt (pH 7,5)
LB- Plattenagar	LB-Medium, 15 g/l Select Agar
TAE-Puffer	100 mM Tris, 5 mM EDTA (pH 8,0)
Versenepuffer	137 mM NaCl, 8,8 mM Na ₂ HPO ₄ , 2,7 mM KCl, 0,7 mM KH ₂ PO ₄ , 1 mM EDTA
Präparationsmedium	HBSS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
Ausplattiermedium	MEM, 0,6 % Glukose, 10 % HS
Kulturmedium für Neurone	Neurobasalmedium, B27 20 µl/ml, L-Glutamin (0,5 mM), Primocin 100 µg/ml, Glutamat (25 µM)
Boratpuffer	0,05 M Borsäure, 0,02 M Na ₂ B ₄ O ₇ (pH 8,5)
2x BBS	50 mM BES, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ (pH 6,94 - 6,98, steril filtriert)
ACSF	125 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1 mM MgCl ₂ , 2 mM CaCl ₂ , 33 mM D-Glukose, 25 mM HEPES (pH 7,3)
mACSF	125 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 2 mM CaCl ₂ , 33 mM D-Glukose, 25 mM HEPES (pH 7,3)
PBS	137 mM NaCl, 8,8 mM Na ₂ HPO ₄ , 2,7 mM KCl, 0,7 mM KH ₂ PO ₄
RIPA-Puffer	150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 % NP-40, 0,5 % Natriumdeoxycholat, 0,1 % SDS, 50 mM Tris/HCl (pH 8,0), Proteaseinhibitoren (10 µg/ml Leupeptin, 100 µM PMSF, 1 µg/ml Pepstatin A)
5 x Lämmli-puffer	300 mM Tris, 50 % (v/v) Glycerin, 500 mM DTT, 7,5% (w/v) SDS, 0,5% (w/v) Bromphenolblau (pH 6,8)
Laufpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycerin, 0,1 % (w/v) SDS (pH 8,3)
Transferpuffer	20 % Methanol, 9 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,02 % SDS
TBST	150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 0,2 % Tween 20 (pH 7,9)

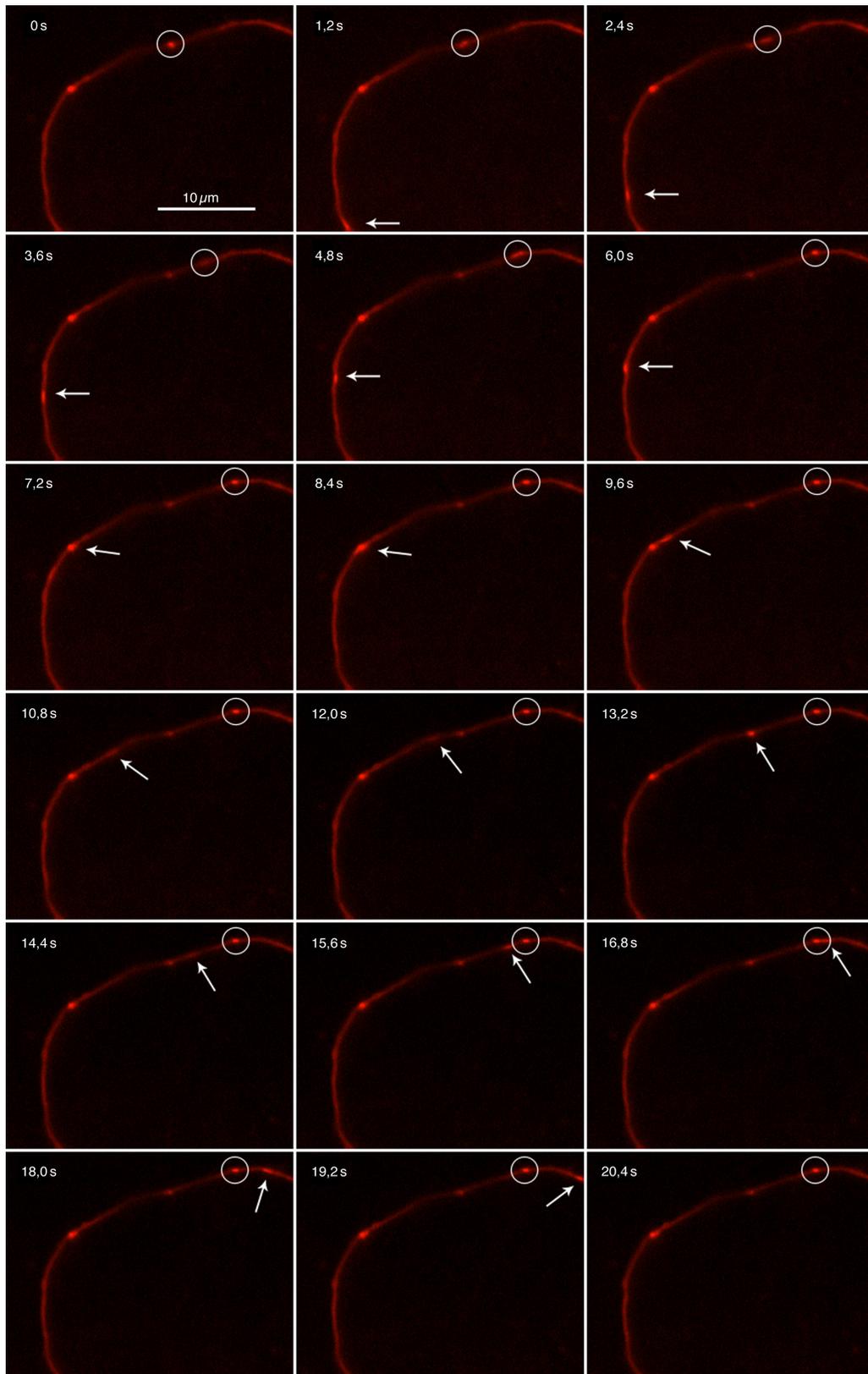


Abbildung 5.1: Lebendzell-Mikroskopie von Stargazin-N mRFP; Axon eines primären hippocampalen Rattenneurons fünf Tage nach Transfektion; Die Bildersequenz zeigt zwei bewegliche Vesikel. Das mit dem Kreis markierte Vesikel ist ab Sekunde 6 ortsständig. Das mit dem Pfeil markierte Vesikel weist eine kontinuierliche Geschwindigkeit auf. Sie beträgt etwa $2,2 \mu\text{m/s}$.

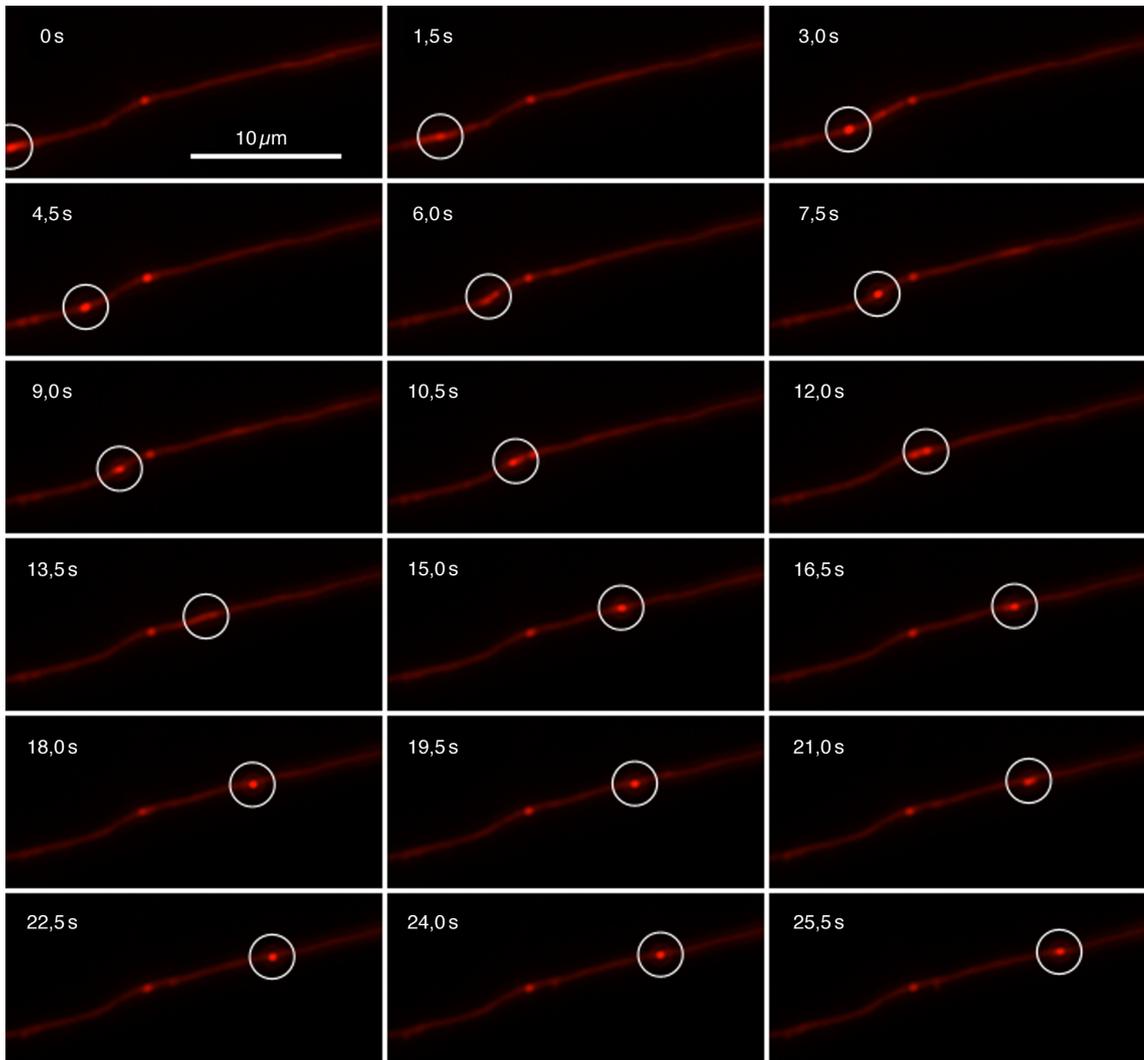


Abbildung 5.2: Lebendzell-Mikroskopie von mRFP; Axon eines primären hippocampalen Rattenneurons fünf Tage nach Transfektion; Das bewegliche Vesikel ist durch einen Kreis hervorgehoben, seine Geschwindigkeit beträgt etwa $1,6 \mu\text{m/s}$.