Die Rolle des PDZ-Domänenproteins PIST bei der subzellulären Sortierung von Neurotransmitterrezeptoren

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
Fachbereich Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Judith Koliwer

aus Berlin

Hamburg, 2014

Datum der Disputation: 31.10.2014

1. Gutachter: PD Dr. Hans-Jürgen Kreienkamp

2. Gutachter: Prof. Dr. Matthias Kneussel

Inhalt

Zusammenfassung 1

Summary 3

1. Einleitung 5

1.1. Die subzelluläre Sortierung von Membranproteinen 5

1.2. Durch PDZ-Domänen vermittelte Interaktionen 7

1.3. Das PDZ-Domänenprotein PIST 10

1.4. Die durch die PDZ-Domäne vermittelte Funktion von PIST 13

1.4.1. Der β1-adrenerge Rezeptor (β1AR) 14

1.4.2. Metabotrope Glutamatrezeptoren 16

1.4.3. Ionotrope Glutamatrezeptoren 17

1.4.4. Neuroligin 18

1.5. Ziel der Arbeit 19

2. Material und Methoden 21

2.1. Material 21

2.1.1. Chemikalien 21

2.1.2. Puffer 21

2.1.3. Medien und Zusätze 23

2.1.4. Oligonukleotide 24

2.1.5. Vektoren 25

2.1.5.1. Generierte Vektoren 25

2.1.5.2. Zur Verfügung gestellte Vektoren..... 25

2.1.6. Antikörper..... 26

2.1.6.1. Primärantikörper 26

2.1.6.2. Sekundärantikörper 27

2.1.7. Organismen 27

2.2. Molekularbiologische Methoden..... 27

2.2.1. Hybridisierung von Oligonukleotiden..... 27

2.2.2. Agarose-Gelelektrophorese 28

2.2.3. Restriktionsverdau doppelsträngiger DNA 28

2.2.4. Ligation..... 28

2.2.5. Präparation von kompetenten E.Coli 28

2.2.6. Transformation 29

2.2.7. Isolation von DNA-Plasmiden, kleiner Maßstab (Minipräparation)..... 29

2.2.8. Isolation von DNA-Plasmiden, großer Maßstab (Midipräparation)..... 29

2.2.9. DNA-Sequenzierung 30

2.3. Zellbiologische Methoden 30

2.3.1. Kultivierung von HEK293 und HEK293-T Zellen 30

2.3.2. Stabile Zelllinien..... 31

2.3.3. Kultivierung pränataler Hippocampus- und Cortex Neuronen..... 31

2.3.4. Transfektion von HEK293 und HEK293-T Zellen 32

2.3.4.1. Transfektion von HEK293 und HEK293-T Zellen mit Turbofect 32

2.3.4.2. Transfektion von HEK293 Zellen mit Lipofectamin 33

2.3.4.3. Reverse Transfektion von HEK293 und HEK293-T Zellen mit siRNA 33

2.3.4.4. Transfektion von HEK293-T Zellen mit Calciumphosphat zur Virusproduktion.. 33

2.4. Proteinbiochemische Methoden..... 34

2.4.1. Lyse von HEK293-T Zellen und Cortexneuronen 34

2.4.2. Protein-Koimmunpräzipitation (GFP-Trap)..... 34

2.4.3. Zelloberflächenbiotinylierung..... 35

2.4.3.1. Biotin-Streptavidin-ELISA 35

2.4.3.2. Biotin-Streptavidin-Präzipitation..... 36

2.4.4. Western Blot 36

2.4.5. Internalisierungs- und Recyclingexperimente..... 38

2.4.6. Immuncytochemie..... 39

2.4.7. Lebendzellmikroskopie 39

2.5. Etablierung und Analyse einer KO-Mauslinie..... 40

2.5.1. Bestimmung des Genotyps von Mäusen..... 40

2.5.2. Anreicherung der PSD aus dem Cortex von Mäusen 40

2.5.3. Messung des Glukosespiegels im Blut von Mäusen 41

3. Ergebnisse 42

3.1. Die Rolle von PIST im anterograden Transport von β1AR 42

3.2. Die Rolle von PIST bei der postendozytotischen Sortierung von β1AR..... 50

3.3. Etablierung von Überexpression und knockdown von PIST in Neuronen durch Lentiviren 60

3.3.1. Die Lokalisation von PIST in Neuronen 60

3.3.2. Lentivirale genetische Modifikation von Neuronen 62

3.4. Generierung und Analyse einer PIST-knockout Mauslinie 66

4. Diskussion..... 79

4.1. Die Rolle von PIST bei der subzellulären Sortierung des β1-adrenergen Rezeptors.. 79

4.2. Der Einfluss einer reduzierten PIST-Proteinmenge auf Interaktionspartner im zentralen Nervensystem..... 86

4.3. Ausblick..... 95

Literaturverzeichnis 98

Abbildungen 113

Tabellen.....117

Abkürzungen 118

Danksagung 120

Zusammenfassung

Das *protein interacting specifically with TC10* (PIST) ist ein überwiegend am trans-Golgi-Netzwerk (TGN) lokalisiertes PDZ-Domänenprotein, das eine wichtige Rolle bei der subzellulären Sortierung von Membranproteinen einnimmt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktion von PIST sowohl an einem konkreten Beispiel, dem β1-adrenergen Rezeptors (β1AR), als auch in einem komplexen System, anhand einer Reihe von Interaktionspartnern im zentralen Nervensystem, untersucht.

Für β1AR konnten frühere Arbeiten bestätigt werden, die zeigten, dass PIST den Rezeptor im anterograden Transportweg am TGN zurückhält und dass PSD-95, ein weiteres PDZ-Domänenprotein, β1AR aus dieser Interaktion löst und den anschließenden Transport zur Zelloberfläche ermöglicht. Dieses Modell wurde hier dahingehend erweitert, dass PIST, obwohl es mit PSD-95 um die PDZ-Bindestelle kompetiert, in einem zellulären System die Interaktion des Rezeptors mit PSD-95 fördert. Außerdem wurde nachgewiesen, dass sich dieses Modell auch in der Aktivität der Agonist-vermittelten Signaltransduktion des Rezeptors widerspiegelt. Weiterhin wurde die Rolle von PIST im postendozytotischen Transport von β1AR aufgeklärt. Hier zeigte sich, dass der durch Stimulierung des Rezeptors induzierte cAMP-Anstieg in der Zelle zu einer Umverteilung von PIST vom TGN zu späten Endosomen führt. Dort interagiert PIST mit dem endozytierten Rezeptor und hemmt dadurch sowohl dessen Recycling zur Zelloberfläche, als auch dessen lysosomalen Abbau.

Um einen Einblick in die Funktion von PIST in komplexen Systemen zu erhalten, wurde des Weiteren eine PIST-defiziente Mauslinie etabliert. Da homozygot PIST-defiziente Mäuse nur in wenigen Fällen lebensfähig waren, wurden hier im Wesentlichen heterozygote *knockout*-Tiere mit Wildtyp-Tieren verglichen. Bei PIST-heterozygoten Mäusen wurde ein signifikant reduzierter Blutglucosespiegel nachgewiesen. Dieses Ergebnis bestätigt das in der Literatur vorgeschlagene Modell, in dem PIST den Einbau des Glucosetransporters Glut4 in die Plasmamembran von Adipozyten inhibiert.

Im zentralen Nervensystem interagiert PIST mit wichtigen Komponenten der postsynaptischen Dichte (PSD), wie z.B. mit Neuroligin sowie mit den Neurotransmitterrezeptoren β1AR, mGluR5 und den NMDA-Rezeptoren. Durch Analyse von PIST-defizienten Mäusen, sowie von kultivierten Cortexneuronen, die einem lentiviralen PIST-*knockdown* unterzogen wurden, zeigte sich, dass PIST sowohl die Menge, als auch die

subzelluläre Lokalisation seiner Interaktionspartner beeinflusst. So ist das Zelladhäsionsprotein Neuroligin1 in der PSD von PIST-heterozygoten Mäusen verstärkt angereichert. Von den ionotropen Glutamatrezeptoren waren AMPA-Rezeptoren verstärkt, NMDA-Rezeptoren dagegen reduziert in der PSD von PIST-heterozygoten Mäusen zu finden. Die Proteinmenge von mGluR5 war hingegen weder in Gesamtfraktionen, noch in der PSD von PIST-heterozygoten Tieren verändert. Eine deutliche Reduktion der Aktivität von Signaltransduktionswegen in Hippocampus-Lysaten impliziert, dass der Einbau von Rezeptoren in Signalkomplexe in PIST-heterozygoten Tieren gestört ist.

Summary

The protein interacting specifically with TC10 (PIST) is a PDZ-domain containing protein which is localized mainly at the trans-Golgi network (TGN). It plays an important role in the subcellular sorting of membrane proteins. In this thesis, the function of PIST in the regulation of one specific interaction partner, the β1-adrenergic receptor (β1AR), as well as in the regulation of a variety of interaction partners in the central nervous system has been elucidated.

For β1AR previous work was confirmed showing that β1AR is retained by PIST at the TGN in the anterograde pathway and rescued by PSD-95, another PDZ-domain containing protein, out of this interaction, facilitating its transport to the cell surface. This model has been extended by the fact that PIST, even if competing with PSD-95 for the interaction with the receptor, promotes the interaction of these proteins in a cellular system. Furthermore, it has been observed that the activity of the agonist-induced signaling pathway of the receptor reflects the molecular situation. Besides the anterograde pathway, the role of PIST in the postendocytic pathway of β1AR has been investigated. The stimulation of the receptor induces an increase of the cellular cAMP level, leading to a redistribution of PIST from the TGN to late endosomes. Here, PIST interacts with the internalized receptor and inhibits its recycling to the cell surface, as well as its lysosomal degradation.

Furthermore a PIST-deficient mouse line has been established. Since very few homozygous PIST-deficient mice were viable, mainly heterozygous *knockout* mice were compared to wildtype animals. A reduced blood glucose level was observed in PIST-heterozygous mice. This fact supports a model where PIST inhibits the transport of the glucose transporter Glut4 to the plasma membrane of adipocytes.

In the central nervous system PIST interacts with important components of the postsynaptic density (PSD) such as Neuroligin and the neurotransmitter receptors β1AR, mGluR5 and NMDA-receptors. A lentiviral *knockdown* of PIST in cultured cortical neurons and analysis of PIST-heterozygous mice showed that the reduction of PIST levels influences the amount and the subcellular localization of its interaction partners. Thus, enrichment of the cell adhesion molecule Neuroligin1 was increased in the PSD of PIST-heterozygous mice. Also the postsynaptic levels of ionotropic glutamate receptors were altered. Whereas the amount of AMPA receptors was enhanced, the amount of NMDA receptors was reduced in the PSD of

PIST-heterozygous mice. However the amount of mGluR5 was not altered in the total protein level or in the PSD. The activity of different signal transduction pathways was drastically reduced in hippocampus lysates of PIST-heterozygous mice. This result suggests that the anchoring of neurotransmitter receptors in signaling complexes is disturbed due to the reduction of PIST.

1. Einleitung

1.1. Die subzelluläre Sortierung von Membranproteinen

Membranrezeptoren sind essentiell für die Erkennung und Weiterleitung von Signalen in vielzelligen Organismen. An der Zelloberfläche binden sie spezifische Liganden und setzen dieses Signal in ein intrazelluläres Signal um. Sowohl Membranrezeptoren, als auch andere Membranproteine besitzen eine bis mehrere Transmembranregionen, die sich meist durch helikale Strukturen auszeichnen, und sind in membrangebundener Form in verschiedenen subzellulären Kompartimenten lokalisiert. Der Transport zwischen diesen Kompartimenten findet durch Vesikel statt und ist durch Proteininteraktionen sehr streng reguliert (Abb. 1.1).

Die Synthese von Membranproteinen erfolgt an dem mit Ribosomen besetzten rauen endoplasmatischen Retikulum (ER). Neu synthetisierte Proteine werden anhand von Signalsequenzen am N-Terminus durch spezifische Proteine erkannt und ko- oder posttranslational zum ER geleitet. Hier finden auch Faltung und posttranslationale Modifikationen, wie die Glycosylierung der Proteine, statt (Hebert und Molinari 2007).

Vom ER werden Membranproteine mithilfe von COPII-besetzten Vesikeln über das ERGIC (ER-Golgi-Intermediärkompartiment) zum Golgi-Apparat transportiert (Dong et al. 2008; Appenzeller-Herzog und Hauri 2006). Hier finden weitere posttranslationale Modifikationen statt, wie die Reifung der Glykosylierung oder die Palmitoylierung (Palade 1975).

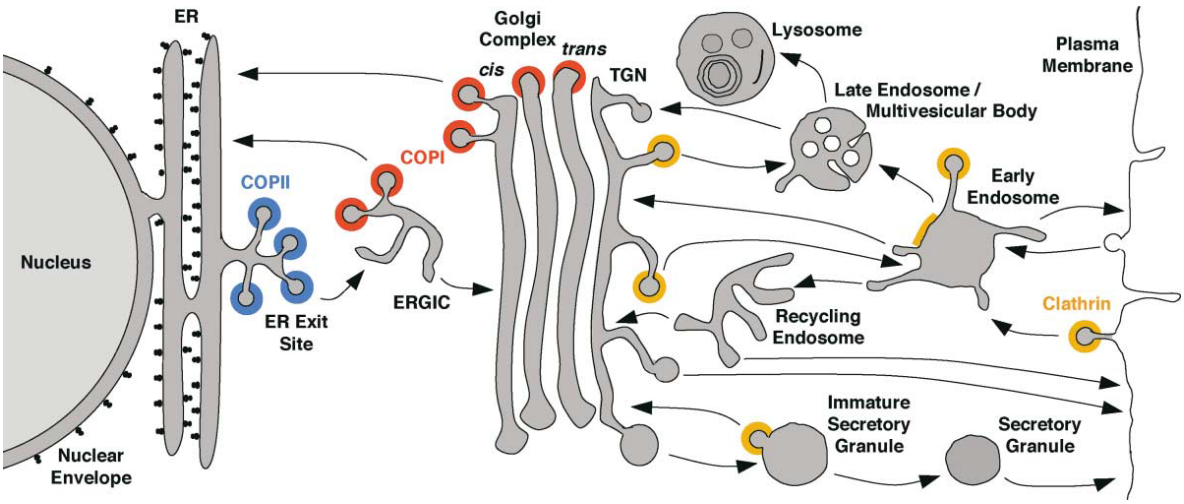

Abbildung 1.1 Transportwege von Membranproteinen zwischen subzellulären Kompartimenten und beteiligte Transportproteine. (aus: Bonifacino und Glick 2004)

Der Golgi-Apparat ist ein großes perinukleäres Kompartiment, das aus einer Reihe von membranumgebenen Subkompartimenten besteht. Im anterograden Transport durchlaufen neu synthetisierte Membranproteine das Golgi von der dem ER zugewandten cis- zu der dem ER abgewandten trans-Seite. Das trans-Golgi-Netzwerk (TGN) ist ein zentraler Sortierungspunkt in der Zelle, von wo aus Membranproteine durch vesikulären Transport zur Zelloberfläche, zu Endosomen oder Lysosomen dirigiert werden. Außerdem findet von hier retrograder Transport zum ER durch COPI-haltige Vesikel statt (Achour et al. 2008).

Neben den Transportmechanismen zur Zellmembran wird die Verfügbarkeit von Membranrezeptoren auch durch Internalisierung sowie die danach folgende postendozytotische Sortierung beeinflusst. Die Endozytose wird bei vielen Membranrezeptoren durch Bindung des Liganden ausgelöst. Dazu werden Rezeptoren, die sich an der Zelloberfläche befinden, nach ihrer Stimulierung durch den spezifischen Agonisten unter Beteiligung des Proteins Clathrin in frühe Endosomen endozytiert. An dieser Stelle findet die Entscheidung über das weitere Schicksal der Membranproteine statt. Sie können direkt (schnelles Recycling) oder über Recycling Endosomen (langsames Recycling) an die Zelloberfläche zurück transportiert werden. Sie können jedoch auch weiter zu späten Endosomen und Lysosomen transportiert und dort abgebaut werden. Dieser Prozess wird unter anderem durch die Ubiquitinierung von Lysinresten des Membranproteins reguliert (Marchese und Benovic 2001, Shenoy et al. 2001). Eine weitere wichtige Rolle im retrograden Transport übernimmt das Retromer. Dieser membranassoziierte Proteinkomplex ist essentiell für den Transport von Membranproteinen von Endosomen zum TGN (Seaman et al. 1997; Seaman et al. 1998; Bonifacino und Rojas 2006). Neben einem Transportprotein-erkennenden Trimer aus Vps26, Vps29 und Vps35 enthält der Proteinkomplex auch Sorting Nexin1 und 2 (Snx1, Snx2; Griffin et al. 2005; Collins et al. 2008). In Neuronen sind die Proteine des Retromers auch in den Dendriten und Axons detektierbar (Bhalla et al. 2012).

Neben den plasmamembranständigen Rezeptoren tragen auch in Endosomen lokalisierte Rezeptoren zu der zellulären Signaltransduktion bei (Kotowski et al. 2011; Murphy et al. 2009). Diese Komponente der Signalwege wurde unter anderem durch *Nanobodies*, die spezifisch die aktivierte Konformation des G-Proteins von β2AR erkennen, untersucht (Irannejad et al. 2013).

Die subzelluläre Sortierung von Membranrezeptoren wird durch kurze Sequenzen in cytosolisch lokalisierten Regionen der Proteine reguliert. Die spezifische Interaktion dieser Motive mit Adaptorproteinen führt zum regulierten Transport des Rezeptors zum Zielort (Kirchhausen 1999). Hierzu gehören Tyrosin-basierte und Dileucin-Motive, die Internalisierung von Rezeptoren, sowie deren Transport zum Lysosom vermitteln (Davis et al. 1986; Williams und Fukuda 1990; Letourneur und Klausner 1992). Weiterhin sind PDZ-Ligandmotive beschrieben, die aus vier Aminosäuren am C-Terminus von Proteinen bestehen. Für die Bindung entscheidend sind hiervon die C-terminale Aminosäure (Position 0), sowie die zweite davor (Position -2; Songyang et al. 1997). Anhand der biochemischen Eigenschaften der Ligandmotive werden PDZ-Domänen klassifiziert. PDZ-Domänen der Klasse 1 binden an Liganden, die sich durch eine hydrophobe Aminosäure an der Position 0 und eine Aminosäure mit einer freien aliphatischen Hydroxygruppe (Serin oder Threonin) an der Position -2 auszeichnen. Die Positionen -1 und -3 sind nicht direkt an der Interaktion beteiligt, können jedoch bei der Feinregulierung der Bindung eine Rolle spielen (Karthikeyan et al. 2001; Tochio et al. 1999). Die Affinität der Bindung von PDZ-Domäne und -Ligand ist mit Dissoziationskonstanten von wenigen Nanomolar bis Mikromolar moderat (Harris und Lim 2001). Die meisten Membranproteine mit PDZ-Ligandmotiven interagieren mit einer Reihe verschiedener PDZ-Domänenproteine, die teilweise redundant, sequenziell oder gegensätzlich wirken. Außerdem findet neben der durch die PDZ-Domäne vermittelten Sortierung auch ein davon unabhängiger Transport statt (Bjerggaard et al. 2004; Doczi et al. 2011).

1.2. Durch PDZ-Domänen vermittelte Interaktionen

PDZ-Domänen sind 80-100 Aminosäuren lange Proteindomänen, die spezifische Interaktionen mit PDZ-Ligandmotiven vermitteln. Der Name PDZ geht auf die ersten drei Proteine, in denen diese Domäne identifiziert wurde, zurück. Es handelt sich hierbei um PSD-95, *Disc large* und ZO-1 (Tsunoda et al. 1998; Kennedy 1995). In Proteinen können eine, aber auch mehrere PDZ-Domänen vorkommen. In Säugetieren sind 27331 PDZ-Domänen in 13542 verschiedenen Proteinen bekannt (SMART- *a Simple Modular Architecture Research Tool*).

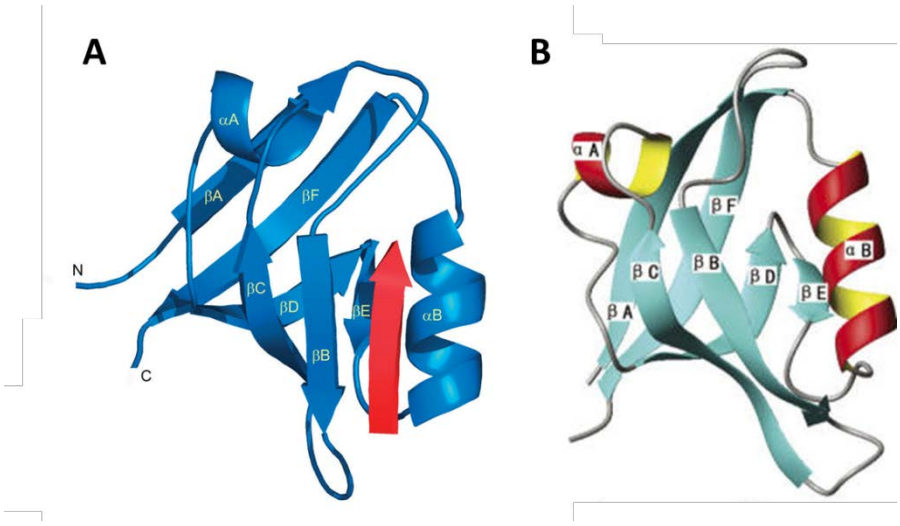

Abbildung 1.2 Die Faltung der PDZ-Domänen von PSD-95 (A) und PIST (B). (modifiziert aus: Jeleń et al. 2003; Li et al. 2006)

Die Sekundärstruktur von PDZ-Domänen enthält sechs β-Faltblatt- und zwei α-Helix-Motive, die eine *Sandwich*-Struktur ausbilden (Abb. 1.2). N- und C-Terminus liegen hierbei räumlich nahe beieinander; dies vereinfacht die Verankerung der Domäne in Multidomänen-Proteinkomplexe (Harris und Lim 2001).

Am Beispiel von PSD-95 wurde durch Röntgenkristallstrukturanalyse gezeigt, dass sich die Struktur der PDZ-Domäne bei Bindung des Liganden nicht verändert (Doyle et al. 1996).

Die bekannten Funktionen von durch PDZ-Domänen vermittelten Interaktionen lassen sich im Wesentlichen in zwei Kategorien unterteilen. Zum einen finden an subzellulären Membranen Interaktionen mit PDZ-Domänenproteinen statt, die den Transport des Membranproteins zwischen subzellulären Kompartimenten regulieren. Zum anderen vermitteln sie die Verankerung von Interaktionspartnern in komplexen Proteinnetzwerken an der Zellmembran, wie beispielsweise der postsynaptischen Dichte (PSD).

Die PSD ist ein elektronen-dichtes Proteinnetzwerk an exzitatorischen postsynaptischen Membranen in dem Neurotransmitterrezeptoren am Zytoskelett verankert werden (Abb. 1.3; Harris und Stevens 1989). Durch PDZ-Domänen vermittelte Interaktionen sind wichtige Komponenten dieses Proteinnetzwerks. So sind die Proteine der Shank (*SH3 and Ankyrin Repeat*) und PSD-95-Familien in der PSD angereichert und übernehmen hier Gerüstfunktionen (Boeckers et al. 1999; Cho et al. 1992; Naisbitt et al. 1999).

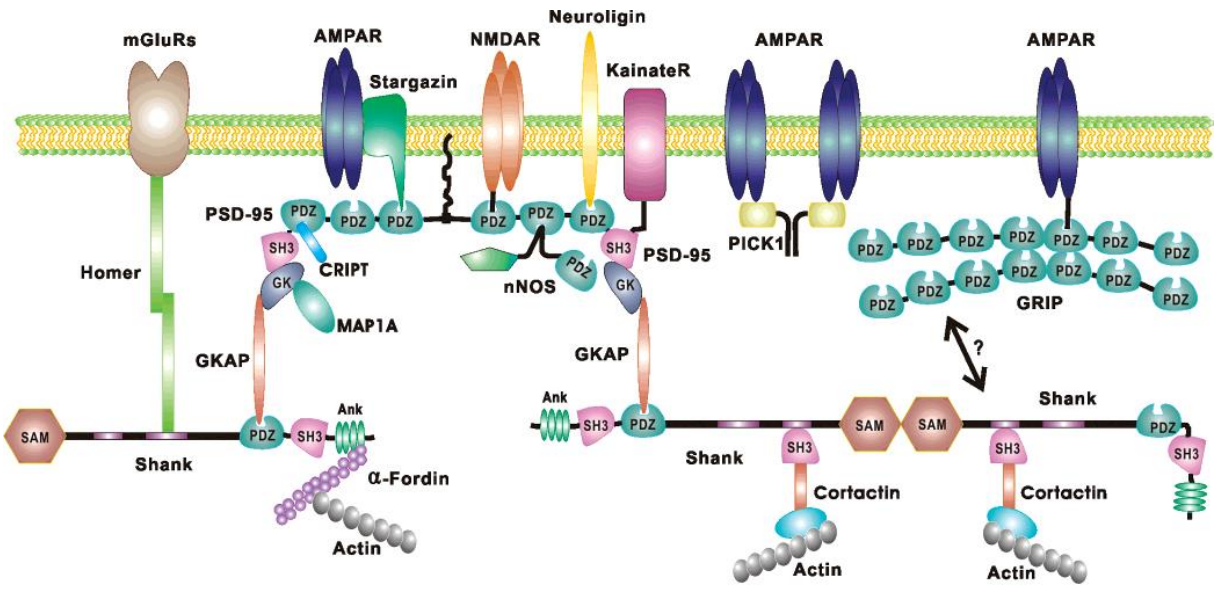

Abbildung 1.3 Die Postsynaptische Dichte. (PSD; aus: Zhang und Wang 2003)

PSD-95 interagiert über die ersten beiden PDZ-Domänen direkt mit NMDA-Rezeptoren und Neuroligin (Kornau et al. 1995; Irie et al. 1997), sowie mit Stargazin, das für die Verankerung von AMPA-Rezeptoren in der PSD verantwortlich ist (Chen et al. 2000).

Hierzu bildet sich ein Proteinkomplex, in dem Stargazin über den PDZ-Liganden an PSD-95 und über den Hauptkörper an AMPA-Rezeptoren bindet (Chen et al. 2000). So wird sowohl die Anzahl, als auch die Aktivität von AMPA-Rezeptoren reguliert (Schnell et al. 2002). Die dritte PDZ-Domäne von PSD-95 vermittelt die Interaktion mit dem GTPase-aktivierenden Protein SynGAP (Chen et al. 1998). Durch die Analyse von *knockout*-Mäusen wurde gezeigt, dass sowohl PSD-95, als auch SynGAP essentiell für die synaptische Plastizität sind (Komiyama et al. 2002; Migaud et al. 1998; Nagura et al. 2012). Auch für die Verankerung von Interaktionspartnern in Signalkomplexen ist PSD-95 essentiell (Kim et al. 1995; Imamura et al. 2002).

Auch Transportwege zwischen subzellulären Kompartimenten werden durch PDZ-Domänen-Proteine reguliert. So interagiert Sorting Nexin27 (SNX27) über seine PDZ-Domäne mit SSTR5, β1AR und β2AR und fördert deren Recycling zur Zelloberfläche (Bauch et al. 2014; Lauffer et al. 2010; Nakagawa und Asahi 2013; Steinberg et al. 2013). SNX27 gehört zu einer Proteinfamilie, die sich durch eine PX-Domäne auszeichnet. Als einziges Protein dieser Familie besitzt SNX27 neben der PX-Domäne auch eine PDZ-Domäne (Valdes et al. 2011). Die PX-Domäne vermittelt die Bindung von SNX27 an Phosphatidylinositol-3-phosphaten von frühen und Recycling-Endosomen. Es wurde auch gezeigt, dass SNX27 die für das Recycling

wichtige Bindung von β2AR an das Retromer vermittelt (Temkin et al. 2011). Weiterhin vermittelt Snx27 den LTP-induzierten Transport von AMPA-Rezeptoren an die postsynaptische Membran (Wang et al. 2013; Loo et al. 2014). Snx27-*knockout*-Mäuse zeichnen sich durch Entwicklungs- und Wachstumsstörung aus (Cai et al. 2011). Weiterhin ist das PDZ-Domänenprotein PIST am TGN lokalisiert und übernimmt hier regulatorische Funktionen bei der Sortierung von Interaktionspartnern.

1.3. Das PDZ-Domänenprotein PIST

Das *protein interacting specifically with TC10* (PIST) wurde zuerst durch Neudauer et al. (2001) beschrieben. TC10 ist eine GTPase der Rho-Familie und eng verwandt mit Cdc42. PIST war das erste bekannte Protein, das spezifisch mit TC10, aber nicht mit Cdc42 interagiert. TC10 ist ein ubiquitär exprimiertes Protein und aktiviert den NFκB-Signalweg (Neudauer et al. 1998). Weiterhin vermittelt TC10 den Insulin-vermittelten Transport des Glucose-Transporters Glut4 an die Zelloberfläche von Adipozyten (Saltiel und Pessin 2002).

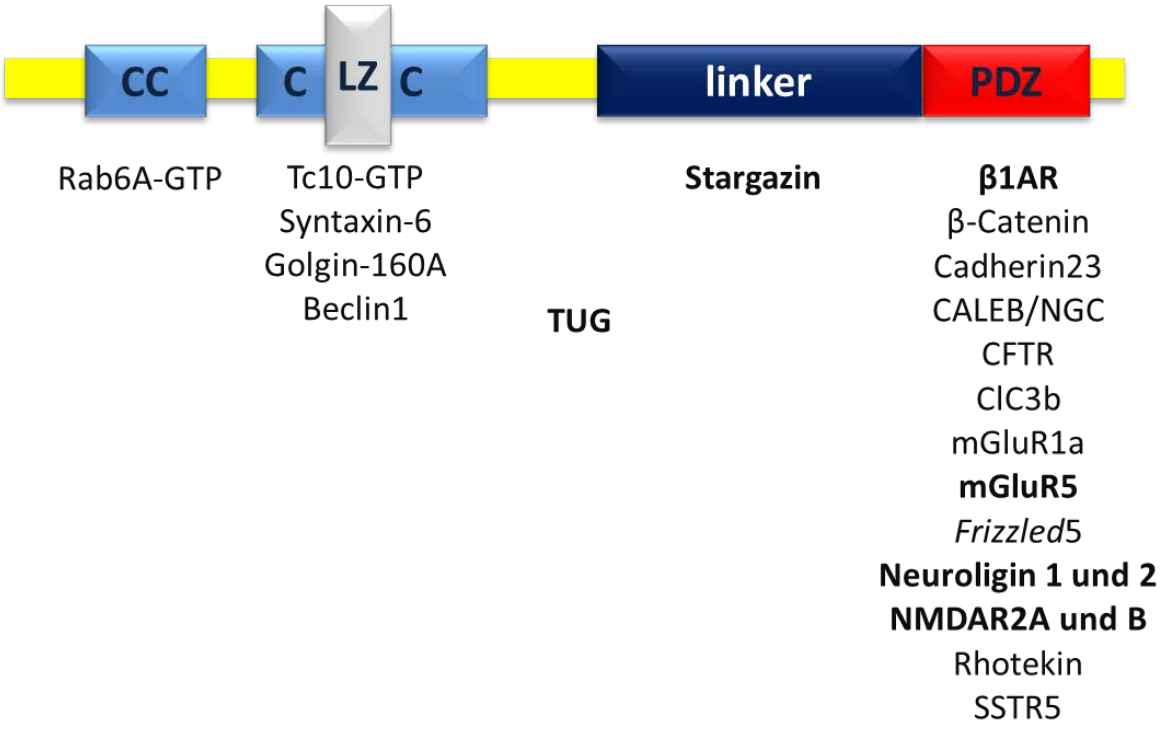

Abbildung 1.4 Die Domänenstruktur und Interaktionspartner von PIST.

PIST enthält zwei *Coiled-coil*-Domänen (CC), von denen die zweite noch eine Leucin-Zipper-Region (LZ) enthält. Weiterhin ist eine Linker-Region definiert, sowie eine PDZ-Domäne bekannt. Über alle Domänen werden verschiedene Interaktionen mit weiteren Proteinen vermittelt. Über welche Domäne die Interaktion mit dem Protein TUG vermittelt wird, ist bisher nicht bekannt.

In mehreren weiteren Publikationen wurde PIST als *Golgi-associated PDZ and coiled-coil motif-containing protein* (GOPC; Yao et al. 2001), CFTR-associated ligand (CAL; Cheng et al. 2002), und *Fused in Glioblastoma* (FIG; Charest et al. 2001) definiert.

PIST ist ein Multidomänenprotein und interagiert über diese Domänen mit einer Bandbreite von Proteinen (Abb. 1.4). Von N- nach C-Terminus gesehen finden sich in der Domänenstruktur von PIST zunächst zwei *Coiled-coil*-Domänen, von denen die zweite eine Leucin-*Zipper*-Region enthält. Eine Interaktion mit der am Golgi-Apparat lokalisierten GTPase Rab6 wird durch die erste *Coiled-Coil*-Domäne vermittelt (Bergbrede et al. 2009). Über die zweite *Coiled-coil*-Domäne interagiert PIST mit dem Q-Snare Protein Syntaxin6 (Charest et al. 2001), sowie mit dem Golgi-assoziierten Protein Golgin160 (Hicks und Machamer 2005). Weiterhin ist eine Linker-Region beschrieben, über die PIST mit Stargazin interagiert, welches wichtig für die Verankerung von AMPA-Rezeptoren in der postsynaptischen Membran ist (Cuadra et al. 2004). Schließlich enthält PIST eine PDZ-Domäne, die Interaktionen mit einer Reihe verschiedener Membranproteine vermittelt. Die Funktion dieser Domäne wird im Kapitel 1.4 weiter beleuchtet werden.

PIST ist in vielen verschiedenen Geweben exprimiert. Neudauer et al. (2001) konnten durch *Northern Blot* Analyse PIST in Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskulatur, Niere und Pankreas nachweisen. Cuadra et al. (2004) konnten diese Ergebnisse auf Proteinebene bestätigen und durch Milz, Thymus und Hoden ergänzen. Im Magen wurde hingegen PIST nicht detektiert. Die Verteilung von PIST im zentralen Nervensystem wurde noch genauer untersucht. In allen Regionen des Cerebralen Cortex und dem Cerebellum wurde starke oder sehr starke Expression nachgewiesen (Chen et al. 2012). Weiterhin wurde gezeigt, dass PIST in den hippocampalen Regionen CA1 und CA3 nur wenig, in CA2 dagegen stark exprimiert ist. Diese Daten bestätigten zum Großteil die Daten von Cuadra et al. (2004), die PIST in Cerebellum, Cortex und Hippocampus nachwiesen. Hier wurde allerdings eine starke Expression in allen Bereichen des Hippocampus detektiert.

Subzellulär ist PIST im Wesentlichen am TGN lokalisiert. Die Lokalisierung von PIST am TGN wird über die zweite *Coiled-coil*-Domäne vermittelt (Yao et al. 2001; Charest et al. 2001). In neuronalen Zellen wurde PIST auch in Dendriten nachgewiesen, wo es wie das somatisch lokalisierte PIST mit dem trans-Golgi-Markerprotein TGN38 kolokalisiert war (Cuadra et al. 2004; Ito et al. 2006a). Golgi-Ausläufer in Dendriten sind wichtig für die Regulation von

Proteinkomplexen an der Postsynapse (Horton und Ehlers 2003). Außerhalb des Golgi-Apparates wurde PIST nur unter bestimmten Bedingungen beschrieben. So führte die gemeinsame Überexpression mit *frizzled*5 zu einem detektierbaren Level an PIST an der Plasmamembran (Yao et al. 2001). Auch haben Cheng et al. (2005) gezeigt, dass die Überexpression der konstitutiv aktiven Form TC10(Q75L) zu einer Umverteilung von PIST vom TGN zur Plasmamembran führt. Im Gegensatz dazu ist in HEK293-Zellen und Neuronen überexprimiertes PIST durch Photokonvertierungsexperimente in Lebendzellmikroskopie über 30 Minuten analysiert worden, wobei lediglich eine langsame Verteilung des Proteins innerhalb des Golgis beobachtet wurde (Chen et al. 2012).

Mehrere verschiedene Isoformen von PIST sind bekannt. Die Expression der Isoformen ist zum einen entwicklungs-, zum anderen gewebespezifisch reguliert. Die Analyse von Proteinlysaten aus dem Gehirn von Ratten verschiedener Entwicklungsstadien mithilfe eines Antikörpers gegen die PDZ-Domäne von PIST gibt Aufschluss über die entwicklungsabhängige Expression verschiedener Isoformen (Abb. 1.5; Ito et al. 2006a). Die Isoform von 55kDa, die auch in den Publikationen üblicherweise das Protein von Interesse darstellt, ist bereits ab frühen Embryonalstadien (E12,5) und auch in adulten Tieren exprimiert. Eine Isoform von 60kDa ist dagegen nur in Embryonalstadien exprimiert und verschwindet mit der Geburt. Eine weitere Isoform von 57kDa nimmt mit der Embryonalentwicklung ab, verschwindet bei der Geburt und wird ab dem 21. Tag nach der Geburt (P21) wieder exprimiert.

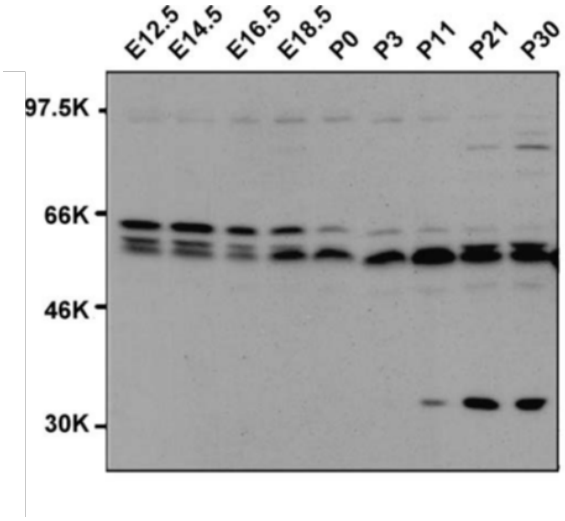

Abbildung 1.5 Die entwicklungsabhängige Expression verschiedener Isoformen von PIST im Gehirn von Ratten. (aus: Ito et al. 2006a)

Schließlich gibt es noch eine kleine Isoform von 35kDa, die erst ab P11 exprimiert wird. Gewebeabhängig unterscheidet man zwei verschiedene Isoformen. Neuronales PIST (nPIST) unterscheidet sich von der Hauptform durch acht zusätzliche Aminosäuren in der zweiten Coiled-coil-Domäne (Yue et al. 2002). Diese Isoform ist wie die Hauptform am TGN lokalisiert und vor allem im Gehirn exprimiert.

1.4. Die durch die PDZ-Domäne vermittelte Funktion von PIST

Durch PDZ-Domänen vermittelte Interaktionen sind wichtig für die korrekte Verteilung von Membranproteinen. Auch für PIST sind Funktionen in der subzellulären Sortierung einiger Membranproteine durch Interaktion über die PDZ-Domäne bekannt.

So übernimmt PIST eine Rolle bei der Verteilung des *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR). Cheng et al. (2002) zeigten, dass PIST den CFTR in der Zelle zurückhält und so die Menge des Rezeptors an der Plasmamembran reduziert. Weiterhin wurde auch eine Funktion von PIST für den lysosomalen Abbau von CFTR vorgeschlagen (Cheng et al. 2004). Dass PIST die Proteinmenge von Interaktionspartnern beeinflusst, ist auch für andere Interaktionspartner bekannt. Der Chloridkanal Clc-3B ist beispielsweise am Golgi lokalisiert und seine Proteinmenge wird durch Überexpression von PIST reduziert (Gentzsch et al. 2003).

Auch für die Retention von Interaktionspartnern in der Zelle durch PIST sind weitere Beispiele bekannt. So wird Cadherin23, das Zell-Zell-Adhäsionen vermittelt, durch PIST in der Zelle am TGN zurückgehalten (Xu et al. 2010; Siemens et al. 2004). Die Interaktion mit weiteren PDZ-Domänenproteinen, MAGI-1 (Xu et al. 2008) und Harmonin (Siemens et al. 2002) hebt die Retention von Cadherin23 durch PIST am TGN auf (Xu et al. 2010). Mutationen im Harmonin-Gen können das Usher Syndrom Typ 1C bewirken (Bitner-Glindzicz et al. 2000). Diese Patienten sind von eingeschränkten sensorineuralen Fähigkeiten und Blindheit betroffen, also Symptomen die mit der Erkennung und Weiterleitung von Signalen durch Membranrezeptoren einhergehen. Eine ähnliche Regulation wie für Cadherin23 wurde für den Somatostatinrezeptor 5 (SSTR5) nachgewiesen. Durch die Arbeitsgruppe Kreienkamp wurde PIST als Interaktionspartner des SSTR5 identifiziert (Wente et al. 2005). SSTR5 wird durch PIST am TGN zurückgehalten, bis er durch NHERF1 aus dieser Interaktion gelöst und zur Zelloberfläche transportiert wird (Bauch et al. 2014). Diese Publikation, zu der ich Daten zur Zelloberflächenexpression und dem Recycling von SSTR5, sowie zur Expression beteiligter

Proteine in verschiedenen Geweben beigetragen habe, bildete die Grundlage für die vorliegende Arbeit, indem sich die Frage stellte, ob sich diese Funktion von PIST auf weitere Interaktionspartner übertragen lässt und welche Relevanz dieser Regulationsprozess im zellulären Zusammenhang hat.

Die Rolle von PIST im zentralen Nervensystem ist bisher nicht klar. Es wurde vorgeschlagen, dass PIST mit Rhotekin und β-Catenin interagiert und mit beiden Proteinen in Synapsen kolokalisiert ist (Ito et al. 2006b). Dies steht im Widerspruch zu den oben diskutierten Daten, in denen PIST in Synapsen nicht detektiert wurde. Rhotekin ist ein Effektorprotein der kleinen GTPase Rho und ist im zentralen Nervensystem exprimiert (Reid et al. 1996). Des Weiteren ist das Membranprotein CALEB/NGC wichtig für die Bildung von Neuriten (Schumacher et al. 1997) und PIST vermittelt dessen Transport vom Zellkörper von Neuronen in die Dendriten (Hassel et al. 2003). Schließlich interagiert PIST mit verschiedenen Neurotransmitterrezeptoren und Proteinen der PSD, die nun einzeln betrachtet werden sollen.

1.4.1. Der β1-adrenerge Rezeptor (β1AR)

Die β-adrenergen Rezeptoren 1-3 sind $G\alpha_S$-Protein gekoppelte Rezeptoren (α_SGPCR; Green et al. 1992; Abb. 1.6). Die Aktivierung des G-Proteins führt zum Austausch des an die α_S-Untereinheit gebundenen GDP zu GTP und folgender Dissoziation von α_S und βγ-Untereinheiten (Pierce et al. 2002). Die aktivierte α_S-Untereinheit induziert die Aktivierung der Adenylatzyklase, die ATP zu cAMP umsetzt und so zu einem cAMP-Anstieg in der Zelle führt.

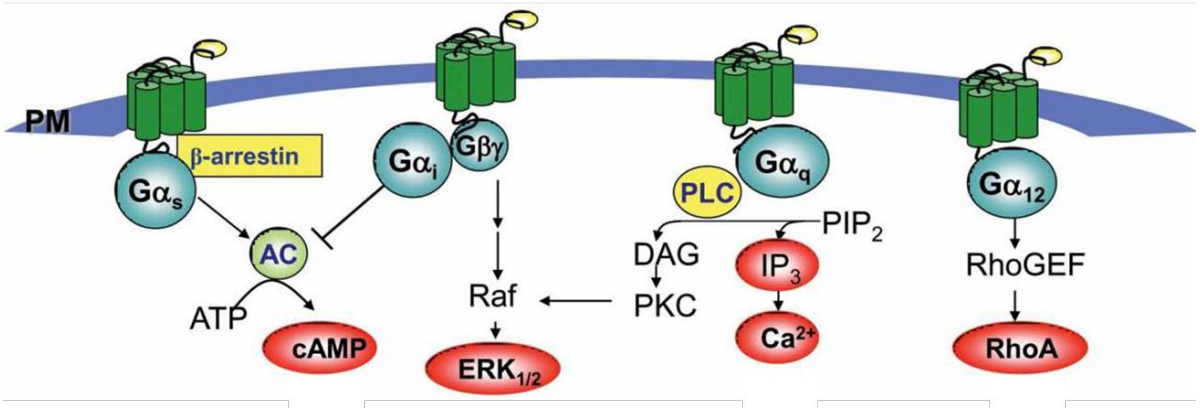

Abbildung 1.6 Signalwege G—Protein gekoppelter Rezeptoren. (modifiziert nach: Cheng et al. 2010b)

Weiterhin bindet β1AR über den PDZ-Liganden an den cAMP-abhängigen Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor von ras, CNrasGEF, und aktiviert so den ras/raf/MAPK Signalweg (Pak et al. 2002).

Zu diesem Signalweg trägt auch durch die βγ-Untereinheiten vermittelte Rekrutierung von β-Arrestin bei (Shenoy und Lefkowitz 2005; DeWire et al. 2007). Da die Interaktion mit β-Arrestin auch die Internalisierung des Rezeptors induziert, werden offenbar Signaltransduktion und subzelluläre Sortierung des Rezeptors gemeinsam reguliert (Tohgo et al. 2003).

β1AR und β2AR übernehmen wichtige Funktionen im Organismus von Säugetieren. Beide Rezeptoren sind im Herzen exprimiert und regulieren den Herzschlag (Jaber et al. 1996). β-adrenerge Rezeptoren werden durch das Hormon Adrenalin und den Neurotransmitter Noradrenalin stimuliert und zeigen in nichtdifferenzierten Zellen eine sehr ähnliche Signalantwort (Bai et al. 1992). In Myozyten aktivieren beide Rezeptoren dagegen unterschiedliche Signalwege (Devic et al. 2001). So führt die Stimulierung von β1AR bei *knockdown* von β2AR zu einer Erhöhung der Kontraktionsrate durch Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). β2AR koppelt bei *knockdown* von β1AR dagegen zuerst an $G\alpha_S$, was zu einem PKA-unabhängigen Anstieg der Kontraktionsrate führt und von einer Kopplung an $G\alpha_i$ gefolgt wird, die einen anschließenden Abfall der Kontraktionsrate zur Folge hat. Begründet ist dieser Unterschied in den Signalwegen in einer unterschiedlichen Verteilung der Rezeptoren in Myozyten (Rybin et al. 2000). Es wurde jedoch auch gezeigt, dass die Signalantwort auf verschiedene Liganden unterschiedliche Konformationsänderungen der Rezeptoren und damit unterschiedliche Antworten in der Zelle bewirkt (Galandrin und Bouvier 2006).

Antagonisten der β-adrenergen Rezeptoren, sogenannte Betablocker, gehören zu den am häufigsten eingesetzten Medikamenten gegen Bluthochdruck. Man unterscheidet hierbei selektive Betablocker, die antagonistisch auf β1AR, nicht aber auf β2AR wirken, wie Propanolol, Oxprenolol oder Pindolol, sowie nicht selektive Betablocker, die auf beide β-adrenerge Rezeptoren gleichermaßen antagonistisch wirken, wie Metoprolol, Atenolol und Esmolol (Mehvar und Brocks 2001). Selektive Betablocker werden vor allem bei Patienten eingesetzt, bei denen zusätzlich Asthma oder Diabetes diagnostiziert ist und daher der Antagonismus von β2AR ein Risiko darstellen könnte. Gemeinsam ist allen Betablockern ein

aromatischer Ring in der molekularen Struktur, der auch in den physiologischen Agonisten Adrenalin und Noradrenalin zu finden ist.

Weiterhin sind die β-adrenergen Rezeptoren β1AR und β2AR im Gehirn exprimiert (Cash et al. 1986). β2AR ist hierbei vor allem in Gliazellen zu finden (Waeber et al. 1991), wohingegen β1AR an postsynaptischen Membranen angereichert ist (Aoki et al. 1987). Die Stimulierung von hippocampalen Schnitten aus Rattengehirnen mit dem β-adrenergen Agonisten Isoproterenol fördert Langzeitpotenzierung (LTP; Hopkins und Johnston 1988). Dieser Effekt wird im Wesentlichen über β1AR vermittelt, da die Isoproterenol-Stimulierung in β1AR-*knockout*-Mäusen keine LTP zur Folge hat (Winder et al. 1999).

Subzelluläre Lokalisation und Funktion von β1AR werden durch PDZ-Domänen-vermittelte Interaktionen reguliert. Über den PDZ-Liganden interagiert β1AR mit PSD-95 (Hu et al. 2000). Diese Interaktion fördert die Verankerung von β1AR in NMDA-Rezeptorkomplexen an der Postsynapse und hemmt die Internalisierung des Rezeptors. Ein anderer durch PDZ-Domänen vermittelter Interaktionspartner ist MAGI-2 (Xu et al. 2001). MAGI-2 ist wie PSD-95 ein Protein, das an der Verankerung von Rezeptoren in der PSD beteiligt ist und wie PSD-95 mit Neuroligin und NMDA-Rezeptoren interagiert (Hirao et al. 1998). Im Gegensatz zu PSD-95 fördert MAGI-2 die Internalisierung von β1AR. Da die beiden Proteine in einigen Gehirnregionen gemeinsam exprimiert sind und miteinander interagieren, könnten sie eine gemeinsame Funktion für die Regulation von β1AR ausüben (Xu et al. 2001).

He et al. (2004) haben durch Affinitätschromatographie-Experimente PIST als weiteren PDZ-Domänen-vermittelten Interaktionspartner von β1AR gefunden. Hier wurde auch gezeigt, dass β1AR durch Überexpression von PIST in der Zelle zurückgehalten wird. Durch *in vitro* Experimente wurde außerdem eine Kompetition von PIST und PSD-95 um die Interaktion mit dem PDZ-Liganden von β1AR nachgewiesen.

1.4.2. Metabotrope Glutamatrezeptoren

PIST wurde durch Affinitätschromatographie als Interaktionspartner von mGluR5 und mGluR1a identifiziert (Cheng et al. 2010a; Zhang et al. 2008). Beide Rezeptoren gehören zur Klasse 1 der metabotropen Glutamatrezeptoren (Conn und Pin 1997). Diese Interaktion wird über die PDZ-Domäne von PIST und den PDZ-Liganden der Rezeptoren vermittelt. Durch die Interaktion mit PIST wird die Signaltransduktion von mGluR1a vermindert (Zhang et al. 2008). Interessant ist hierbei, dass unter basalen Bedingungen keine Kolokalisierung der

beiden Proteine beobachtet wird. Erst nach Stimulierung des Rezeptors war ein großer Anteil mit PIST kolokalisiert.

mGluR5 spielt eine wichtige Rolle im zentralen Nervensystem und ist in Hippocampus, Cortex, Thalamus und Cerebellum exprimiert (Niswender et al. 2005). Der Rezeptor ist an der synaptischen Plastizität beteiligt. So wird durch Stimulierung von mGluR5 Langzeitdepression (LTD) induziert und in mGluR5-defizienten Mäusen sind Lernverhalten und Erinnerungsvermögen reduziert (Huber et al. 2001; Jia et al. 2001). Weiterhin wurde gezeigt, dass mGluR5 den ras/raf/MAPK-Signalweg, sowie durch Aktivierung der PI3-Kinase den AKT-Signalweg induziert (Hou und Klann 2004; Mao und Wang 2003; Thandi et al. 2002). PIST greift in die Regulierung von mGluR5 ein, indem es der Ubiquitinierung des Rezeptors entgegenwirkt und diesen so stabilisiert (Cheng et al. 2010a).

1.4.3. Ionotrope Glutamatrezeptoren

Ionotrope Glutamatrezeptoren, die einen großen Anteil der Signale exzitatorischer Synapsen tragen, lassen sich in NMDA-, AMPA- und Kainat-Rezeptoren unterteilen. Für NMDA- und AMPA-Rezeptoren ist eine durch PDZ-Domänen vermittelte Verankerung in der PSD bekannt.

Die Verankerung von AMPA-Rezeptoren wird durch das PDZ-Domänenprotein Stargazin vermittelt. Die Mauslinie Stargazer trägt eine Mutation im Stargazin-Gen und zeigt einen epileptischen Phänotyp (Letts et al. 1998). Diese Mäuse bilden keine funktionellen AMPA-Rezeptoren in der PSD von Körnerzellen im Kleinhirn (Hashimoto et al. 1999). NMDA-Rezeptoren sind dagegen in Menge und Funktion nicht verändert. Chen et al. (2000) konnten zeigen, dass Stargazin mit den Untereinheiten GluR1, 2 und 4 der AMPA-Rezeptoren direkt interagiert.

Stargazin besitzt einen C-terminalen PDZ-Liganden, der mit der PDZ-Domäne von PSD-95 interagiert. Eine Variante von Stargazin, der dieser PDZ-Ligand fehlt, ist nicht an Synapsen detektierbar und stört die durch AMPA-Rezeptoren vermittelte Signalantwort in hippocampalen Neuronen (Chen et al. 2000). Daneben ist aber noch eine weitere Region zwischen den Aminosäuren 144-283 wichtig für die synaptische Lokalisierung von Stargazin. Cuadra et al. (2004) zeigten, dass ein Teil dieser Region, die Aminosäuren 262-282, mit der Linker-Region von PIST interagiert. Diese Interaktion ist also nicht durch die PDZ-Domäne vermittelt. Dies bedeutet, dass Stargazin mit PIST und PSD-95 gleichzeitig interagieren kann,

da diese an verschiedene Regionen des Verankerungsproteins binden. Die Überexpression einer dominant-negativen Variante von PIST, der Linker- und PDZ-Domäne fehlten, bewirkte einen stark verringerten Einbau der AMPA-Rezeptor-Untereinheit GluR1 in die PSD. Offenbar ist also die Interaktion von Stargazin mit PIST essentiell für dessen Funktion im Einbau von AMPA-Rezeptoren in die postsynaptische Membran.

Auch die NMDAR2A- und 2B-Untereinheiten der NMDA-Rezeptoren interagieren mit PSD-95, sowie mit PIST über die jeweiligen PDZ-Domänen (Kornau et al. 1995; Cuadra et al. 2004). Obwohl eine Defizienz von PSD-95 die Menge und die Aktivität von NMDA-Rezeptoren nicht beeinflusst, sind die NMDA-Rezeptor-abhängige synaptische Plastizität, sowie die Stickstoffmonoxid-vermittelte Exzitotoxizität verändert (Migaud et al. 1998; Sattler et al. 1999).

Der ras/raf/MAPK-Signalweg wird sowohl durch die Stimulierung von AMPA-, als auch NMDA-Rezeptoren aktiviert (Perkinton et al. 1999). Im NMDA-Rezeptor-Signalweg ist hierbei das GTPase aktivierende Protein SynGAP beteiligt (Chen et al. 1998). Weiterhin aktiviert die Stimulierung beider Rezeptoren den PI3-Kinase/AKT-Signalweg (Xilouri und Papazafiri 2008; Kessels und Malinow 2009).

1.4.4. Neuroligin

Ein wichtiger Bestandteil der PSD sind die Mitglieder der Neuroligin-Familie. Im Menschen gibt es fünf verschiedene Neuroligine, von denen eines auf dem Y-Chromosom codiert wird. Alle Mitglieder dieser Familie sind in der PSD angereichert. Während jedoch Neuroligin1 in der PSD exzitatorischer Synapsen angereichert ist, findet man Neuroligin2 nur in inhibitorischen Synapsen (Song et al. 1999; Varoqueaux et al. 2004). Durch die Interaktion mit dem präsynaptischen Protein β-Neurexin stabilisieren Neuroligine die Konnektivität von prä- und postsynaptischen Membranen (Ichtchenko et al. 1995; Ichtchenko et al. 1996). Diese Interaktion wird durch die LNS-Domäne von Neurexin und die Acetylcholinesterase-homologe Domäne von Neuroligin vermittelt (Araç et al. 2007). Die Interaktion von Neurexin und Neuroligin nimmt eine zentrale Rolle bei der Ausbildung von Synapsen ein. So führt zum einen die Überexpression von Neuroligin in nicht-neuronalen Zellen zur Ausbildung von präsynaptischen Strukturen in den Axonen umliegender Neuronen (Scheiffele et al. 2000). Zum anderen bilden umliegende Neuronen präsynaptische Strukturen aus, wenn in nicht-neuronalen Zellen Neuroligin überexprimiert wird (Nam und Chen 2005). Weiterhin ist in

Neuronen, die Neuroligin überexprimieren, die Zahl der Synapsen erhöht (Chih et al. 2004). Elektrophysiologische Experimente haben gezeigt, dass *knockout*-Mäuse, denen Neuroligin1-3 fehlt, morphologisch kaum veränderte Synapsen besitzen, die jedoch elektrophysiologisch stark verändert sind (Varoqueaux et al. 2006). Mutationen in Neuroliginen sind mit Krankheiten des zentralen Nervensystems wie beispielsweise Autismus assoziiert (Jamain et al. 2003a; Jamain et al. 2003b).

Neuroligine besitzen PDZ-Ligand-Motive vom Typ 1, die wichtig für die subzelluläre Sortierung des Membranproteins sind. Über diese Domäne interagiert Neuroligin unter anderem mit PSD-95 (Irie et al. 1997). Schapitz et al. (2010) konnten zeigen, dass Neuroligin1 und PSD-95 gemeinsam bei induzierter LTD die Postsynapse verlassen, während LTP zu einer synaptischen Anreicherung von Neuroligin führt. Offenbar ist also die Menge an Neuroligin an der Synapse ein wichtiger Aspekt der synaptischen Plastizität und streng reguliert. Dresbach et al. (2004) zeigten jedoch, dass der Einbau von Neuroligin in die Postsynapse weder von der Interaktion mit Neurexin, noch mit PSD-95 abhängig ist. Meyer et al. (2004) haben durch Hefe-2-Hybrid Experimente PIST als Interaktionspartner für Neuroligin1 und 2 identifiziert.

1.5. Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle von PIST im Zusammenspiel mit anderen PDZ-Domänenproteinen bei der subzellulären Sortierung von Neurotransmitterrezeptoren aufzuklären. Hierzu soll zum einen die Funktion von PIST für einen ausgewählten Interaktionspartner, zum anderen der Einfluss einer Reduktion der PIST-Proteinmenge auf eine Reihe von Interaktionspartnern in komplexen Systemen untersucht werden.

Als Modellprotein wurde der β1-adrenerge Rezeptor gewählt. Dieser ist durch wichtige physiologische Funktionen, unter anderem bei der Regulation von Herzschlag und Blutdruck und in der synaptischen Plastizität, ein sehr interessanter Interaktionspartner. Entsprechend wichtig ist die Regulation seiner subzellulären Lokalisierung. PIST interagiert mit β1AR, aber nicht mit β2AR. Ein experimenteller Vorteil von β1AR als Modellprotein ist somit, dass β2AR als Negativkontrolle genutzt werden kann, um die spezifische Wirkung von PIST auf β1AR zu testen. Die beiden Rezeptoren sind zu 54% sequenzhomolog, beide in Herz und Gehirn exprimiert und durch die gleichen Agonisten stimulierbar. Dennoch aktivieren sie verschiedene Signalwege, die teilweise zu entgegengesetzten Effekten führen. Auch sind die

Sequenzen des jeweiligen PDZ-Liganden mit ESKV (β1AR) bzw. DSLL (β2AR) verschieden. Physiologisch deutet dies darauf hin, dass eine strenge Regulation der beiden Rezeptoren nötig ist und zum Teil durch PDZ-Domänen-vermittelte Interaktionen garantiert werden kann. Interessant ist hierbei die Frage, ob eine der bekannten Funktionen von PIST, Membranproteine in der Zelle zurückzuhalten, auf β1AR übertragen werden kann und wie diese Prozesse ablaufen. Mögliche Funktionen von PIST bei der postendozytotischen Regulierung von β1AR sind bisher unbekannt; auch diese Fragestellung soll im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden.

Um einen generellen Einblick in die Rolle von PIST im Gesamtorganismus zu erhalten, soll weiterhin eine PIST-*knockout*-Mauslinie etabliert werden. Dies ermöglicht die Analyse der physiologischen Funktion von PIST, beispielsweise im zentralen Nervensystem. Da PIST mit verschiedenen entscheidenden Komponenten der postsynaptischen Membran wie β1AR, Neuroligin, mGluR5, NMDA-Rezeptoren und Stargazin interagiert, soll die Proteinzusammensetzung der postsynaptischen Dichte auf mögliche Veränderungen untersucht und weitere erste Analysen von Mäusen mit reduzierter PIST-Proteinmenge durchgeführt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Verwendete Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen, wenn nicht anders angegeben.

2.1.2. Puffer

BBS (2x)	50mM BES 280mM NaCl 1,5mM Na_2PO_4 pH 6,96
DNA-Ladepuffer (6x)	10mM Tris-HCl; pH 7,6 0,03% Bromphenolblau 0,03% Xylen-Cyanol FF 60% Glycerol 60mM EDTA
KCM-Puffer (5x)	500mM KCl 150mM $CaCl_2$ 250mM $MgCl_2$
Lämmli-Probenpuffer (5x)	300mM Tris/HCl; pH 6,8 50% (v/v) Glycerin 7,5% (w/v) SDS 0,5M DTT 0,01% Bromphenolblau
PSD-Puffer 1	10mM HEPES; pH 7,4 2mM EDTA 5mM Na_3VO_4 30mM NaF 20mM β-Glycerolphosphat

PSD-Puffer 2	50mM HEPES; pH 7,4
	2mM EDTA
	2mM EGTA
	5mM Na_3VO_4
	30mM NaF
	20mM β-Glycerolphosphat
	1%(w/v) Triton-X-100
PSD-Puffer 3	50mM Tris; pH 9
	5mM Na_3VO_4
	30mM NaF
	20mM β-Glycerolphosphat
	1%(w/v) Natriumdesoxycholat
PBS	137mM NaCl
	2,7mM KCl
	8mM Na_2HPO_4
	2mM KH_2PO_4
	pH 7,7
PBS-T	PBS
	0,05%(v/v) Tween 20
RIPA-Puffer	150mM NaCl
	50mM Tris/HCl; pH 8,0
	5mM EDTA
	0,5% (w/v) Natriumdeoxycholat
	1% (v/v) NP-40
	0,1% (w/v) SDS
SDS-PAGE-Laufpuffer	1* Tris/Glycin
	0,1% SDS
TAE-Puffer	40mM Tris-Acetat; pH 8
	2mM EDTA
TBS-T	10 mM Tris/HCl, pH 8
	150 mM NaCl
	0,05%(v/v) Tween 20

Transferpuffer	1x Tris/Glycin
	0,02% SDS
	20%(v/v) Methanol
Tris/Glycin (10x)	0,25 M Tris, pH 8.3
	1,92 M Glycin
TSB-Puffer	LB-Medium; pH 6,1
	10% PEG 3350
	5% DMSO
	10µM $MgSO_4$
	10µM $MgCl_2$
Universalpuffer	100mM NaCl
	50mM Hepes; pH 7,4
Versene	PBS
	0,5mM EDTA

2.1.3. Medien und Zusätze

Antibiotika	50µg/ml Ampicillin
	10µg/ml Kanamycin
	100µg/ml Penicillin
	100µg/ml Streptavidin
	15µg/ml Tetrazyklin
Kulturmedium	DMEM
	10% FBS
	100µg/ml Penicilin/Streptavidin
Lagermedium	DMEM
	10%(v/v) FBS
	10%(v/v) Glycerin
LB-Agar	LB-Medium
	15mg/ml Agar

LB-Medium	10mg/ml Trypton
	5mg/ml Hefeextrakt
	5mg/ml NaCl
	pH 7,5
Neuronen-Plattiermedium	MEM
	10%(v/v) Pferdeserum
	0,6%(v/v) Glucose
Neuronen-Kulturmedium	Neurobasal-Medium
	1x B27
	50mg/ml Primocin
	25µM Glutamat
	500mM L-Glutamin

2.1.4. Oligonukleotide

Klonierung

PISTshRNA-6 ff	**GATCCCCGGCGGACATCACTTATGAGTTCAAGAGACTCATAAGTGATGTCCGCCTTTTTA**
PISTshRNA-6 rev	**AGCTTAAAAAGGCGGACATCACTTATGAGTCTCTTGAACTCATAAGTGATGTCCGCCGGG**

Sequenzierung

B1AR-middle ff	**GTGGACCTCAGTGGACGTGCT**
CMV ff	**GCTAGCGATTACGCC**
GFP-N ff	**AATGTCGTAACAACTC**
GFP rev	**AGCTCGACCAGGATGGGCACC**
M13 ff	**GTTTTCCCAGTCACGAC**
M13 rev	**AACAGCTATGACCATG**
pmRFP ff	**CCTACAAGACCGACATCAAG**
pmRFP rev	**GTCACCTTCAGCTTGGCG**
SVPA2 rev	**ATTCATTTTATGTTTCAGGTTCAG**
SP6 rev	**GATTTAGGTGACACTATAG**

Genotypisierung von Mäusen

GOPC-1 ff	**CTTTGACGTGAAGCTGCCCA**
GOPC-2 ff	**AACTCAGGGGAAGCTGAGCA**
GOPC-WT-1 rev	**TGTACAGGCATGCACGAAGAA**
GOPC-WT-2 rev	**CACCCTGGCTACACAGAGTTC**
GOPC-KO-1 rev	**CCCGTCCCCCTTCCTATGTA**
GOPC-KO-2 rev	**GCTAGCCAGTCAAGGGGAAT**

2.1.5. Vektoren

2.1.5.1. Generierte Vektoren

Tabelle 2.1 Generierte Vektoren

Name	Generierung
GFP/FUW	Restriktion mit SalI/BamHI, Ligation in FUW
PIST-GFP/FUW	Restriktion mitSalI/EcoRI, Ligation in FUW
PISTsh-6/pLVTHM	Hybridisierung von Oligonukleotiden für die shRNA, Linearisierung von pSuper durch BglII/HindIII, Ligation in pSuper, Restriktion mit EcoRI/ClaI, Ligation in pLVTHM

2.1.5.2. Zur Verfügung gestellte Vektoren

Tabelle 2.2 Zur Verfügung gestellte Vektoren

Name	Herkunft
peGFP-C3	Clontech
GFP-NHERF1	AG Kreienkamp
peGFP-PIST	AG Kreienkamp
Flag-PIST	AG Kreienkamp
PSD-95-GFP	AG Kreienkamp
Snx27-GFP	AG Kreienkamp
SP-flag-β1AR	AG von Zastrow, UCSF
SP-flag-β2AR	AG von Zastrow, UCSF
SP-RFP-β1AR	AG Kreienkamp
SP-RFP-β2AR	AG von Zastrow, UCSF

2.1.6. Antikörper

2.1.6.1. Primärantikörper

Tabelle 2.3 Primärantikörper

Antigen	Wirt	*Western Blot*	Immuncytochemie	ELISA	Quelle
AKT	Kaninchen	1:000	-	-	Cell Signaling
β1AR	Kaninchen	1:1000	-	-	Thermo Scientific
CD63	Maus	-	1:2000	-	DSHB
EEA1	Maus	-	1:1000	-	BD Biosciences
ERK	Kaninchen	1:000	-	-	Cell Signaling
Flag	Kaninchen	1:2000	1:1000	-	Sigma-Aldrich
Flag	Maus	1:1000	1:1000	-	Sigma-Aldrich
GAPDH	Maus	1:500	-	-	Antibodies-online
GFP	Maus	1:1000	-	-	Covance
LAMP1	Maus	-	1:2000	-	BD Biosciences
mGluR5	Kaninchen	1:1000	-	-	Millipore
NMDAR1	Maus	1:1000	-	-	Millipore
pAKT	Kaninchen	1:000	-	-	Cell Signaling
pERK	Kaninchen	1:000	-	-	Cell Signaling
PIST	Meer-schweinchen	1:1000	1:1000	-	AG Kreienkamp
PIST	Kaninchen	1:1000	1:500	-	Abcam
RFP	Ratte	1:000	-	1:1000	ChromoTek
Snx1	Maus	-	1:1000	-	BD Biosciences
Transferrin-Rezeptor	Maus	-	-	1:500	Life Technologies

2.1.6.2. Sekundärantikörper

Tabelle 2.4 Sekundärantikörper

Spezifität	Markierung	Wirt	Verdünnung	Quelle
Kaninchen	HRP	Ziege	1:2500	Dianova
Kaninchen	Alexa488	Ziege	1:2000	Life Technologies
Kaninchen	Cy3	Ziege	1:500	Dianova
Maus	HRP	Ziege	1:2500	Dianova
Maus	Cy3	Ziege	1:500	Dianova
Meerschweinchen	HRP	Ziege	1:2500	ImmunoReagent
Meerschweinchen	Alexa633	Ziege	1:1000	Life Technologies
Meerschweinchen	Alexa555	Ziege	1:2000	Life Technologies
Ratte	HRP	Ziege	1:2500	Dianova

2.1.7. Organismen

Für molekularbiologische Methoden wurden *E.Coli*-Bakterien vom Stamm Top10F‘ verwendet.

Die Zelllinien HEK293 und HEK293-T (*human embryonic kidney*, ATCC, Manassas, USA) wurden für verschiedene zellbiologische Methoden verwendet.

Hippocampus- und Cortexneuronen zur Kultivierung wurden aus Ratten der Spezies *Rattus Norvegicus* gewonnen. Diese wurden durch die Versuchstierhaltung des UKE von der Firma *Charles River*, Erkrath, Deutschland bezogen und betreut.

Die im Rahmen dieser Arbeit etablierten Mauslinien hatten den genetischen Hintergrund B57BL/6N und wurden ebenfalls durch die Versuchstierhaltung des UKE betreut.

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. Hybridisierung von Oligonukleotiden

Komplementäre Oligonukleotide wurden hybridisiert, indem jeweils 3µg beider DNA-Fragmente in 50µl Universalpuffer verdünnt wurden. Dieser Ansatz wurde für 5 Minuten bei

95°C, gefolgt durch 10 Minuten bei 70°C, 10 Minuten bei 50°C und 20 Minuten bei 20°C inkubiert.

2.2.2. Agarose-Gelelektrophorese

Durch Agarose-Gelelektrophorese wurden DNA-Fragmente der Größe nach aufgetrennt. Hierzu wurden Agarosegele von 1,0 - 1,3% Agarose in TAE-Puffer und mit Zugabe von 0,1µg/ml Ethidiumbromid (*Serva*, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Die DNA-Proben wurden mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt und auf das Gel geladen. Der Gellauf erfolgte bei 100V in TAE-Puffer. Anschließend wurde die DNA unter UV-Licht detektiert. Zum Größenvergleich wurde der 1kb DNA *Ladder* von *Life Technologies* (Darmstadt, Deutschland) verwendet.

2.2.3. Restriktionsverdau doppelsträngiger DNA

Zum gezielten Verdau doppelsträngiger DNA wurden die FastDigest-Restriktionsenzyme und 10x Reaktionspuffer von *Thermo SCIENTIFIC* (Schwerte, Deutschland) verwendet. Diese erkennen spezifische 6-8 Basenpaare lange Sequenzen und führen Schnitte durch, die je nach Enzym zu 5‘-, 3‘- oder keinen Überhängen führen können. 1-2µg DNA wurden mit 10x Reaktionspuffer und je 1U der Restriktionsenzyme in Ansätzen von 30µl vermischt und für 20 Minuten bei 37°C inkubiert.

2.2.4. Ligation

Durch Ligationsreaktionen werden doppelsträngige DNA-Moleküle miteinander verbunden. Hierbei wurden durch Restriktionsenzyme erzeugte komplementäre Überhänge ausgenutzt. Ligationsansätze, in denen Vektor- und Insert-DNA im molekularen Verhältnis von 1:4 mit 20U/ml T4-Ligase und 10x Reaktionspuffer von *Thermo SCIENTIFIC* (Schwerte, Deutschland) vermischt waren wurden über Nacht bei 16°C inkubiert.

2.2.5. Präparation von kompetenten *E.Coli*

5 ml LB-Medium mit Tetrazyklin wurden mit Kolonien der Stammplatte angeimpft. Über Nacht wurde diese Kultur bei 37°C und schütteln inkubiert, anschließend mit 500ml LB/Tetrazyklin verdünnt und weiter bei 37°C angezogen, bis eine optische Dichte bei 600nm von 0,3-0,6 erreicht war. Nun wurde die Kultur für wenige Minuten in Eiswasser abgekühlt und für fünf Minuten bei 5000g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 ml kaltem TSB

resuspendiert, für 10-15 Minuten auf Eis inkubiert und in Aliquots von 500µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.2.6. Transformation

Für die Vervielfältigung von DNA-Plasmiden wurden *E.Coli*- Bakterien des Stammes Top10F' (*Life Technologies,* Darmstadt, Deutschland) verwendet. Hierzu wurde 1-10µg der zu vervielfältigen DNA in 100µl KCM-Puffer verdünnt, 100µl auf Eis aufgetaute kompetenter *E.Coli* Zellen (siehe 2.2.5) zugegeben und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Dann erfolgte ein Hitzeschock für 5 Minuten bei 37°C. Anschließend wurde 1ml LB-Medium ohne Antibiotikum hinzugegeben, der Ansatz für 40 Minuten bei 37°C unter Rotation inkubiert und auf LB-Agarplatten mit dem jeweiligen Antibiotikum ausplattiert.

2.2.7. Isolation von DNA-Plasmiden, kleiner Maßstab (Minipräparation)

3ml LB-Medium mit dem geeigneten Antibiotikum wurden mit je einer Kolonie von LB-Agarplatten angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Dann wurden 1,5ml der Kultur für 1 Minute bei 20.000g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde in 100µl Resuspensionspuffer (alle Puffer von *Macherey und Nagel,* Düren, Deutschland) aufgenommen und mit 100µl Lysispuffer versetzt. Nach 2 Minuten Inkubation wurde die Lyse durch Zugabe von 100µl Neutralisationspuffer abgestoppt, wobei die Proteine ausgefällt wurden. Diese wurden für 20 Minuten bei 20.000g abzentrifugiert und 200µl des Überstandes wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 120µl Isopropanol versehen und gut invertiert. Dadurch wurde die DNA ausgefällt und durch erneute Zentrifugation für 20 Minuten und 20.000g präzipitiert. Diese wurde nun zweimal mit je 500µl 70% Ethanol gewaschen, die DNA durch Zentrifugation für 5 Minuten und 20.000g pelletiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde schließlich 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und in 100µl H_2O suspendiert. Die isolierte DNA wurde durch gezielten Verdau mit Restriktionsenzymen (siehe 2.2.3), sowie durch Sequenzierung (siehe 2.2.9) überprüft.

2.2.8. Isolation von DNA-Plasmiden, großer Maßstab (Midipräparation)

100ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurden mit 1,5ml einer Übernacht-Kultur angeimpft. Diese Kultur wurde über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation für 20 Minuten bei 5000g und 4°C

pelletiert und für eine Midipräparation mithilfe von Nucleo Bond Xtra Midi Kit von *Macherey und Nagel* (Düren, Deutschland) nach Protokoll des Herstellers genutzt. Die auf diese Weise gewonnene DNA wurde durch Testverdau mit Restriktionsenzymen (siehe 2.2.3) und Sequenzierung (siehe 2.2.9) überprüft und die Konzentration über die optische Dichte bei 260nm bestimmt.

2.2.9. DNA-Sequenzierung

Für die Sequenzierung doppelsträngiger DNA wurde ein Reaktionsansatz gemäß der Tabelle 2.5 vermischt und inkubiert. Big Dye und Sequenzierpuffer wurden von der Firma *Life Technologies* (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Das Reaktionsprodukt wurde mit 40µl H_2O, 130µl Ethanol und 5µl 3M Natriumacetat (pH 5,5) vermischt um die DNA auszufällen. Diese wurde durch Zentrifugation für 30 Minuten bei 20.000g und 4°C pelletiert und mit 500µl 70% Ethanol, sowie durch erneute Zentrifugation für 5 Minuten bei 20.000g und 4°C gewaschen. Dann wurde die Sequenz des Produktes mithilfe des *Genetic Analyzer 3500* (*Life Technologies*, Darmstadt, Deutschland) im Institut für Humangenetik bestimmt.

Tabelle 2.5 DNA-Sequenzierung

Reaktionsansatz	Inkubationsfolge			
0,1µg DNA-Template	**Initiale Denaturierung**	3 Minuten	95°C	
0,5µM Primer	**Denaturierung**	30 Sekunden	95°C	
1µl BDT	**Primer-Hybridisierung**	45 Sekunden	55°C	25 Zyklen
2µl 5x Sequenzierpuffer	**Elongation**	4 Minuten	60°C	
5µl H2O	**Lagerung**		4°C	

2.3. Zellbiologische Methoden

2.3.1. Kultivierung von HEK293 und HEK293-T Zellen

Die Zelllinien HEK293 und HEK293-T wurden bei -150°C gelagert. In Kultur genommen wurden sie, indem ein Aliquot bei 37°C aufgetaut und in 10ml Kulturmedium aufgenommen wurde. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei Raumtemperatur und 1000g für 3 Minuten pelletiert, erneut in Kulturmedium resuspendiert und auf einer 10cm-Kulturschale ausplattiert.

Ab diesem Zeitpunkt wurden die Zellen alle 3-4 Tage passagiert, indem zunächst das Medium abgenommen und die Zellen mit 10ml Versene gewaschen wurden. Dann wurden die Zellen für ca. 5 Minuten bei Raumtemperatur mit 1x Trypsin (*Life Technologies*, Darmstadt, Deutschland) in Versene inkubiert. Während dieser Zeit lösten sich die Zellen von der Platte und untereinander. Nun konnten die Zellen leicht in Kulturmedium resuspendiert und je nach Anwendung verdünnt auf eine neue Kulturschale ausplattiert werden.

Neue Aliquots für die Lagerung bei -150°C wurden erzeugt, indem Platten, die dicht mit Zellen besetzt waren, mit 10ml Versene gewaschen wurden. Dann wurden die Zellen wie zum Passagieren mit Trypsin inkubiert und in Kulturmedium resuspendiert. Diese Suspensionen wurden für 3 Minuten bei Raumtemperatur und 1000g zentrifugiert, wobei die Zellen pelletiert wurden. Die Zellen wurden nun in 1ml Lagermedium resuspendiert und in einem Kryoröhrchen zunächst von Isopropanol umgeben bei -80°C langsam heruntergekühlt. Nach 24h wurden die Kryoröhrchen bei -150°C gelagert.

2.3.2. Stabile Zelllinien

Eine nach dem Flp-In-System der Firma *Life Technologies* (Darmstadt, Deutschland) stabil mit RFP-β1AR transfizierte HEK293-Zelllinie der Arbeitsgruppe Kreienkamp wurde verwendet. Die Kultivierung dieser Zelllinie erfolgte wie in 2.3.1 beschrieben. Alle drei Passagen wurden diese Zellen zusätzlich mit 200µg/ml Hygromycin B behandelt, um eine Kontamination mit nicht transfizierten HEK293-Zellen zu verhindern.

2.3.3. Kultivierung pränataler Hippocampus- und Cortex Neuronen

Hippocampus- und Cortexkulturen wurden aus den Gehirnen von Rattenembryonen (E19) gewonnen. Hierzu wurden zunächst Deckgläschen (18mm, *Hecht assistent*, Sondheim, Deutschland), die vorher für 4 Stunden bei 200°C gebacken worden waren, in 12well-Platten ausgelegt und über Nacht mit 1 mg/ml Poly-L-Lysin in PBS bei 4°C inkubiert. Für Cortexkulturen wurden 12well-Platten direkt mit Poly-L-Lysin/PBS inkubiert. Anschließend wurden die Platten fünfmal mit PBS gewaschen und bis zum Ausplattieren der Neuronen bei 4°C gelagert.

Eine schwangere Ratte wurde mit CO_2 betäubt und dekapitiert. Die Bauchdecke wurde geöffnet und der Uterus entfernt. Auf Eis wurden der Uterus und die einzelnen Fruchtblasen geöffnet und die Embryos ebenfalls dekapitiert. Die Gehirne wurden isoliert und in mit HBSS

(*PAA*, Cölbe, Deutschland; inkl. Penicillin/Streptavidin) gefüllte Gewebeschale überführt. Mithilfe eines Binokular-Mikroskops wurden die Hemisphären isoliert und von der Hirnhaut befreit. Die Hippocampi wurden isoliert und in eine mit HBSS/Penicillin/Streptavidin gefüllte Schale überführt. Der Rest der Hemisphären wurde als Cortex ebenfalls gesammelt und mechanisch zerkleinert. Durch Inkubation mit 1x Trypsin/HBSS/Penicillin/Streptavidin für 15 Minuten (Hippocampus), bzw. 30 Minuten (Cortex) bei 37°C wurden die Zellen nun vereinzelt. Anschließend wurden sie jeweils fünfmal mit Neuronen-Plattiermedium gewaschen und schließlich mithilfe von Pasteurpipetten, die mittels einer Flamme verengt wurden, trituriert. Die vereinzelten Zellen wurden nun gezählt und in Konzentrationen von 130.000/ml (Hippocampus), bzw. 300.000/ml (Cortex) ausplattiert. Nach drei Stunden wurde das Medium gegen Neuronen-Kulturmedium ausgetauscht.

2.3.4. Transfektion von HEK293 und HEK293-T Zellen

In Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Transfektionsmethoden verwendet. HEK293 und HEK293-T Zellen wurden im Regelfall mithilfe des Reagenz Turbofect (*Life Technologies*, Darmstadt, Deutschland) transfiziert. In einigen Fällen wurde stattdessen Lipofectamin (*Life Technologies*, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die Transfektion von siRNA war besonders effizient mithilfe von Lipo-RNAi max (*Life Technologies*, Darmstadt, Deutschland), welches gezielt für diese Anwendung optimiert ist. Für die Produktion von Lentiviren wurde die Calciumphosphat-Methode genutzt, die weniger toxisch für die Zellen ist.

2.3.4.1. Transfektion von HEK293 und HEK293-T Zellen mit Turbofect

Für die Turbofect-vermittelte Transfektion von HEK293- oder HEK293-T Zellen wurde zunächst ein Transfektionsansatz nach Tabelle 2.6 vermischt. Bei Kotransfektion von verschiedenen Plasmiden gibt die Gesamt-DNA-Menge die addierte Menge aller Plasmide an, die hierbei meist im gleichen Verhältnis verwendet wurden. Eine Ausnahme bildete hierbei das Plasmid SP-flag-β1AR, von dem nicht mehr als 3µg verwendet wurden, da höhere Mengen zum Tod der Zellen führten. Der Transfektionsansatz wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann zu den Zellen ins Medium gegeben. Nach 4 Stunden wurde das Medium gegen frisches Kulturmedium ausgetauscht.

Tabelle 2.6 Transfektionsansatz für Turbofect-Transfektion

Größe der Kulturschale	Medium	DNA (gesamt)	Turbofect (Invitrogen)
10cm-Schale	1ml DMEM (GIBCO)	10µg	18µl
6well-Schale (/well)	200µl DMEM (GIBCO)	4µg	4µl
12well-Schale (/well)	100µl DMEM (GIBCO)	2µg	2µl

2.3.4.2. Transfektion von HEK293 Zellen mit Lipofectamin

Für die Transfektion von 6cm-Schalen der HEK293-Zellen mithilfe von Lipofectamin wurde ein Transfektionsansatz erzeugt, indem zum einen 4µg DNA, zum anderen 4µl Lipofectamin in jeweils 50µl OptiMEM verdünnt und jeweils für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Dann wurden beide Ansätze vermischt und für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Transfektionsansatz wurde in das Medium der Zellen gegeben, welches nach 4 Stunden gegen frisches Kulturmedium ausgetauscht wurde.

2.3.4.3. Reverse Transfektion von HEK293 und HEK293-T Zellen mit siRNA

Für die reverse Transfektion von HEK293 und HEK293-T Zellen auf 12well-Platten wurden je Ansatz zum einen 20nM siRNA, zum anderen 4µl Lipo-RNAi MAX (*Life Technologies*, Darmstadt, Deutschland) in jeweils 50µl OptiMEM (*Life Technologies*, Darmstadt, Deutschland) verdünnt. Für den knockdown von PIST wurde die siRNA GOPC#9 (Sequenz: CAAGGTGTTGGTCCAATTAGA) der Firma *Qiagen* (Hilden, Deutschland) verwendet. Nach einzelner Inkubation beider Ansätze für 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Ansätze vereinigt und für weitere 20 Minuten inkubiert. Dann wurde der Transfektionsansatz in 1ml vorbereitetes Kulturmedium gegeben und HEK293-T Zellen direkt wie in 2.3.1 beschrieben auf die Schale ausgesät.

2.3.4.4. Transfektion von HEK293-T Zellen mit Calciumphosphat zur Virusproduktion

Für die Transfektion von HEK293-T Zellen mit Calciumphosphat wurden 428µl H_2O mit 7,5µg des zu viralen Vektors, 5µg psPAX.2 und 2,5µg pMD2.G vermischt. Unter Vortexen wurden hierzu 50µl 2,5M $CaCl_2$ getropft. Anschließend wurden zum Transfektionsansatz 500µl 2xBBS unter Vortexen getropft. Der Ansatz wurde dann für 20 Minuten bei Raumtemperatur

inkubiert und zu den Zellen gegeben. Nach 6 Stunden wurde das Medium gegen frisches Kulturmedium ausgetauscht. Nach 24h wurde das Medium abgenommen und durch neues ersetzt, das nach 48h ebenfalls abgenommen wurde. Die Virus-haltigen Überstände wurden sterilfiltriert (0,45µm) und gleiche Transfektionsansätze vereinigt. Virale Partikel wurden entweder durch Ultrazentrifugation (2h, 25.000g, 4°C) oder mittels Lenti-X-Concentrator (*Clontech*, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) nach Herstellerangaben pelletiert. Anschließend wurde der Überstand jeweils verworfen, die viralen Partikel wurden in 200µl kaltem PBS resuspendiert und bei -80°C gelagert. Jeweils 15µl hiervon wurden je Napf von 12well-Platten verwendet. Hierbei wurde durchgehend nach den S2-Sicherheitsbestimmungen gearbeitet.

2.4. Proteinbiochemische Methoden

2.4.1. Lyse von HEK293-T Zellen und Cortexneuronen

HEK293-, HEK293-T Zellen oder Cortexneuronen wurden zunächst zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Dann wurden sie durch Inkubation für 15 Minuten mit kaltem RIPA-Puffer, der mit den Proteaseinhibitoren 2µg/ml Pepstatin A, 43µg/ml PMSF und 10µg/ml Leupeptin oder Complete-Tabletten (EDTA-frei; *Roche*, Penzberg, Deutschland; nach Anleitung des Herstellers) versehen war, lysiert. Bei Experimenten, in denen die Menge an phosphorylierten Proteinen quantifiziert wurde, wurden zusätzlich Phosphataseinhibitoren (PhosStop; *Roche*, Penzberg, Deutschland) eingesetzt. Für 10cm-Schalen wurden 1ml, für 6- oder 12well-Schalen pro Napf 200µl RIPA-Puffer verwendet. Nach 15 Minuten Inkubation auf Eis wurden die Lysate in ein Reaktionsgefäß überführt und für 20 Minuten bei 20.000g und 4°C zentrifugiert. Hierbei wurden Zelltrümmer pelletiert, während der Überstand direkt für weitere Experimente verwendet, oder mit Lämmli-Probenpuffer versehen und dann in *Western Blot* Analysen ausgewertet wurde.

2.4.2. Protein-Koimmunpräzipitation (GFP-Trap)

Durch Protein-Koimmunpräzipitation wurden gezielt GFP-Fusionsproteine und Interaktionspartner aus einem Zelllysat angereichert. Hierzu wurden 50µl eines Zelllysats (siehe 2.4.1) als *Input*-Probe verwendet und mit 12,5µl 5-fach Lämmli-Probenpuffer versehen. Der Rest des Proteinlysats wurde auf eine GFP-bindende Agarose-Matrix gegeben (GFP-Trap_A; *ChromoTek*, Planegg, Deutschland), die zuvor mit RIPA-Puffer equilibriert wurden. Unter Rotation und bei 4°C wurden diese für zwei Stunden inkubiert. Anschließend

wurde die Agarose viermal mit je 1ml RIPA gewaschen und schließlich in 50µl 1-fach Lämmli-Probenpuffer aufgenommen. Die Analyse der Proben erfolgte durch *Western Blot* (siehe 2.4.4). Die Präzipitatproben wurden auf die *Input*proben normiert.

2.4.3. Zelloberflächenbiotinylierung

Durch Zelloberflächenbiotinylierung wurden an der Zelloberfläche lokalisierte Proteine spezifisch kovalent mit Biotin markiert, und durch Ausnutzung der Interaktion von Biotin mit Streptavidin quantifiziert.

Für die Markierung wurden transfizierte HEK293-T Zellen zunächst zweimal mit HBSS (*Lonza*, Verviers, Belgien) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 0,5 mg/ml Sulfo-NHS-SS-Biotin/HBSS für 30 Minuten unter Schwenken bei 4°C inkubiert. Da dieses Reagenz nicht membrandurchgängig ist, wurden während dieser Zeit nur an der Zelloberfläche lokalisierte Proteine durch kovalente Bindung an Lysinresten markiert. Anschließend wurde nicht gebundenes Biotin durch zweimaliges Waschen mit 5mM Tris, pH 7,5 in HBSS entfernt und die Zellen lysiert (siehe 2.3.1). Die Menge von Biotin-markierten Proteinen im Zelllysat wurde durch Biotin-Streptavidin-ELISA oder durch Biotin-Streptavidin-Präzipitation quantifiziert.

2.4.3.1. Biotin-Streptavidin-ELISA

Um die Menge an RFP-fusionierten Rezeptoren zu bestimmen, die durch Biotin markiert sind, wurden Streptavidin-ELISA-Experimente nach dem Protokoll (Coligan et al. 2001, Kapitel 18.7) durchgeführt. Hierzu wurden ELISA-Platten (*nunc*, Roskilda, Dänemark) über Nacht mit dem RFP-Antikörper der Firma *ChromoTek* (Martinsried, Deutschland; 1:1000 in PBS) inkubiert. Zur Kontrolle wurde jeweils auch ein Dreifachansatz mit einem Antikörper für den Transferrin-Rezeptor sowie mit 5 % BSA als Negativkontrolle beschichtet. Anschließend wurden die Platten dreimal mit PBS-T gewaschen und dann für 3h mit den Proteinlysaten inkubiert. Während dieser Zeit wurden die überexprimierten RFP-Fusionsproteine durch die verwendeten Antikörper spezifisch gebunden. Die Proteinlysate wurden 1:10 verdünnt, weiterhin wurde jeweils auch eine 1:5, 1:7,5 und 1:20-Verdünnung verwendet. So konnte sichergestellt werden, dass die Testverdünnung im linearen Testbereich war. Nach der Inkubation mit den Proteinlysaten wurde die Platte erneut dreimal mit PBS-T gewaschen und nun mit Streptavidin-HRP-Konjugaten (2,5 µg/ml in 5% FBS/PBS; *Sigma-Aldrich*, Taufkirchen, Deutschland) für 30 Minuten inkubiert. Die Interaktion von Streptavidin mit der

Biotinmarkierung von Proteinen führte nun dazu, dass die Menge an immobilisierter HRP mit der Menge an Biotinmarkierung korrelierte. Nachdem wieder fünfmal mit PBS-T gewaschen wurde, wurde nun 100µl TMB (1,2,4-Trimethylbenzen) zugegeben, das ein Substrat für HRP ist. Dieses wurde zu einem blauen Produkt umgesetzt. Nach 5 Sekunden wurde diese Reaktion durch Zugabe von 100µl 5M Phosphorsäure abgestoppt und zu einem gelben Produkt umgewandelt. Die Menge dieses Produktes wurde über seine Absorption bei 450nm ausgelesen. Die so bestimmte Menge der Biotin-markierten RFP-Fusionsproteine wurde auf die Menge des Biotin-markierten Transferrin-Rezeptors an der Zelloberfläche normiert.

2.4.3.2. Biotin-Streptavidin-Präzipitation

50µl des Proteinlysats wurden mit 12,5µl 5-fach Lämmli-Probenpuffer versehen und direkt als *Input*-Probe verwendet. Der Rest des Proteinlysats wurde über Nacht mit je 30µl RIPA-equilibriertem *Red Streptavidin Affinity Gel* (*Sigma-Aldrich*, Taufkirchen, Deutschland) unter Rotation bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die *Beads* viermal mit RIPA-Puffer gewaschen und anschließend in 50µl 1-fach Lämmli-Probenpuffer aufgenommen. Die Analyse von *Input*- und Präzipitatproben erfolgte durch *Western Blot* (siehe 2.4.4). Die Menge der Rezeptoren in den Präzipitatproben wurden auf die *Input*proben normiert.

2.4.4. *Western Blot*

Die *Western Blot* Analyse bietet die Möglichkeit, nach ihrer Größe aufgetrennte Proteine aus Zelllysaten auf eine Nitrozellulosemembran zu übertragen und anschließend durch spezifische Antikörper zu detektieren und quantifizieren. Hierzu wurden in Lämmli-Probepuffer verdünnte Zelllysate verwendet. Die Proteine aus dem Zelllysat wurden zunächst durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrer Größe aufgetrennt. Das Gel für die SDS-PAGE wurde nach Tabelle 2.7 mit dem *BioRad* (München, Deutschland) Protean II-System gegossen. Die Dicke des Gels betrug 1,5mm, die Konzentration an Polyacrylamid im Trenngel wurde je nach Größe der zu trennenden Proteine mit 8%, 10% oder 12% gewählt. Als Größenvergleich diente der *Proteinmarker PageRuler Plus Pre-Stained Protein Ladder (10 - 250 kDa)* von *Thermo Scientific* (Schwerte, Deutschland). Es wurden jeweils 15-30µl Probe und 8µl Proteinmarker aufgetragen. Der Gellauf erfolgte für 5 Minuten bei 100V (Sammelgel) und anschließenden ca. 70 Minuten bei 150V (Trenngel) in SDS-PAGE-Laufpuffer bei Raumtemperatur.

Tabelle 2.7 SDS-PAGE

	Trenngel			**Sammelgel**
	8%	**10%**	**12%**	
H_2O (ml)	2,3	1,9	1,6	1,4
Gel 30 AA (ml)	1,3	1,7	2,0	0,3
1,5M Tris; pH 8,8 (ml)	1,3	1,3	1,3	-
1M Tris; pH 6,8	-	-	-	0,3
10% SDS (µl)	50	50	50	20
10% APS (µl)	50	50	50	20
TEMED (µl)	4	4	4	1

Nach der Auftrennung der Proteine nach Größe mittels SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (0,45µm, *GE Healthcare*, München, Deutschland) übertragen. Für den Proteintransfer wurden Transfer-Kammern von *BioRad* (München, Deutschland) entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Der Transfer erfolgte für 120 Minuten bei 400mA oder über Nacht bei 100mA in Transferpuffer bei Raumtemperatur, wobei ein Eisblock zur Kühlung des Systems eingelegt wurde. Anschließend wurden die Membranen für 30 Minuten in 5% Milchpulver in TBS-T bei Raumtemperatur geblockt und anschließend über Nacht mit dem spezifischen Erstantikörper in 5% Milchpulver/TBS-T oder 5% BSA/TBS-T bei 4°C unter Schwenken inkubiert (Tab. 2.3). Nun wurden die Membranen 3-mal für je 10 Minuten in TBS-T gewaschen und dann für eine Stunde mit einem HRP-gekoppelten Zweitantikörper in PBS bei Raumtemperatur inkubiert (Tab. 2.4). Nach erneuten 3 Waschschritten in TBS-T wurden gebundene Zweitantikörper mithilfe der ECL-Methode (Pierce ECL *Western Blot* Substrat, *Thermo Scientific,* Schwerte, Deutschland) nach dem Protokoll des Herstellers detektiert und mit photo-sensitiven Filmen (*GE Healthcare*, Buckinghamshire, Großbritannien) oder dem Molecular Imager Gel Doc XR (*BioRad*, München, Deutschland) und der Software Quantity One entwickelt. Die quantitative

Auswertung der Signalintensitäten erfolgte mit dem Programm ImageLab von *BioRad* (München, Deutschland).

2.4.5. Internalisierungs- und Recyclingexperimente

HEK293 Zellen wurden mit Expressionsvektoren für einen N-terminal an ein flag-Epitop fusionierten Rezeptor und GFP-markierten PDZ-Domänenproteinen transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die transfizierten Zellen auf 12well-Schalen ausgesät. Nach weiteren 24 Stunden wurden drei der Proben für 20 Minuten mit 10µg/ml Isoproterenol inkubiert (Internalisierung). Drei weitere Proben wurden für 20 Minuten mit 10µg/ml Isoproterenol und anschließend für 40 Minuten mit dem Antagonisten Alprerenol (10µg/ml) inkubiert (Recycling). Diese Inkubationszeiten wurden so koordiniert, dass sie zeitgleich beendet waren (Abb. 2.1). Nun wurden alle Proben zweimal mit kaltem PBS gewaschen und für 20 Minuten mit einem Alexa647 gekoppelten, gegen die flag-Markierung gerichteten Antikörper 1:500 in PBS unter Schütteln und bei 4°C inkubiert (Maus anti-flag M1, *Sigma Aldrich*, Taufkirchen, Deutschland; *AlexaFluor647 Labeling Kit*, *Life Technologies*, Darmstadt, Deutschland). Hierbei wurden selektiv nur Zelloberflächen-lokalisierte Rezeptoren über die flag-Markierung gebunden. Zur Kontrolle wurden drei Proben mit PBS ohne den Antikörper inkubiert. Alle Zellsuspensionen wurden nun durch Durchflusszytometrie ausgewertet.

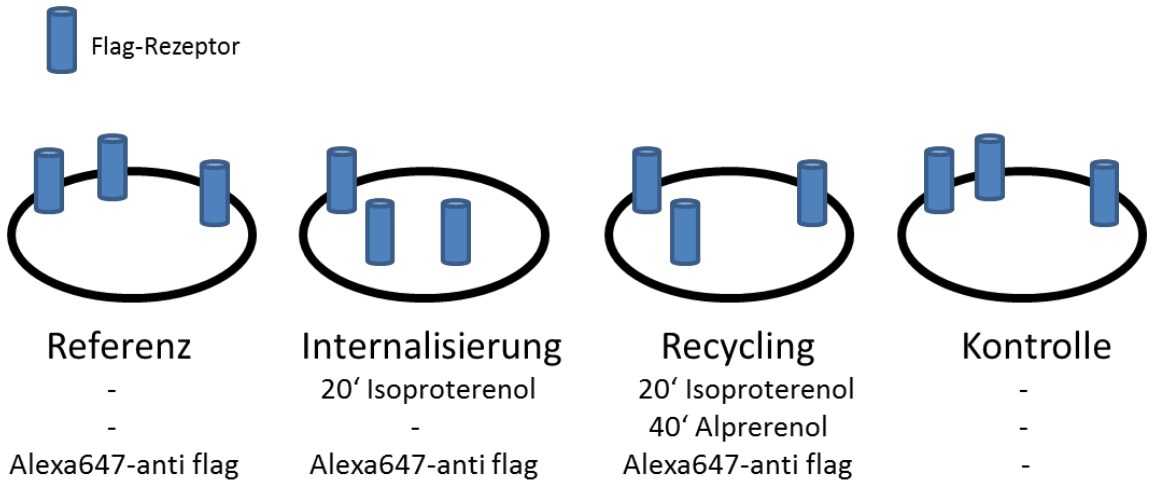

Abbildung 2.1 Schema der Internalisierungs- und Recyclingexperimente

Die Fluoreszenz von GFP- bzw. Alexa647 wurde hierbei ausgenutzt, indem ein Mindestmaß an beiden Fluoreszenzsignalen für die Selektion von zu messenden Zellen gewählt wurde, das erfolgreicher Transfektion der entsprechenden Plasmide entsprach. Nicht mit Isoproterenol, aber mit dem Antikörper inkubierte Proben wurden als Referenz genutzt. Die Menge an internalisierten Rezeptoren wurde bestimmt als die Differenz der Messwerte für internalisierte und Referenzproben und auf die Referenz normiert. Die Menge an Rezeptoren, die nach der Recycling-Phase an der Zelloberfläche detektiert werden konnten, wurde ebenfalls auf die Referenz normiert.

2.4.6. Immuncytochemie

Zu analysierende HEK293-T Zellen oder Hippocampus-Neuronen wurden auf Lebendzell-Mikroskopieplatten der Firma *ibidi* (Martinsried, Deutschland) oder Deckgläschen (18mm, *Hecht assistent*, Sondheim, Deutschland; siehe 2.3.3) ausplattiert, die jeweils mit 1 mg/ml PLL in PBS beschichtet waren. Diese Zellen wurden durch Inkubation mit 4% PFA in PBS für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und dann für drei Minuten mit 0,1% Triton-X-100 permeabilisiert. Wieder wurden die Proben dreimal mit PBS gewaschen und dann wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation für eine Stunde mit 2% Pferdeserum in PBS geblockt. Nun folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in 2% Pferdeserum/PBS für drei Stunden bei Raumtemperatur (Tab. 2.3). Überschüssiger Antikörper wurde durch drei Waschschritte mit PBS entfernt und dann die Proben mit dem sekundären Antikörper und ggf. DAPI in PBS für 40 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (Tab 2.4). Abschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und Deckgläschen mit *Mounting Medium* von Vector Laboratories (Burlingame, USA) auf Objektträger (*Hecht assistent*, Sondheim, Deutschland) fixiert. Die Analyse erfolgte anschließend mithilfe eines konfokalen *Perkin Elmer Spinning Disc*-Mikroskops.

2.4.7. Lebendzellmikroskopie

Für Lebendzellmikroskopie von HEK293-T Zellen wurden diese auf Lebendzell-Mikroskopieplatten der Firma *ibidi* ausplattiert (Martinsried, Deutschland). Die Analyse erfolgte in HBSS (*PAA*, Cölbe, Deutschland) bei 37°C und 5% CO_2 mithilfe eines konfokalen *Perkin Elmer Spinning Disc*-Mikroskops.

2.5. Etablierung und Analyse einer KO-Mauslinie

2.5.1. Bestimmung des Genotyps von Mäusen

Der Genotyp von Mäusen wurde durch PCR mit genomischer Maus-DNA als Template und spezifischen Primern bestimmt. Hierzu wurden zunächst ca. 2 mm lange Spitzen der Mausschwänze in 50 µl DirectPCR-Tail (*peqlab*, Erlangen, Germany) unter Zugabe von 0,2mg/ml Proteinase K (*Life Technologies*, Darmstadt, Deutschland) lysiert. 1µl dieses Lysats wurde für die PCR nach Tabelle 2.8 eingesetzt. Für die PCR wurden alle Reagenzien von *Life Technologies* (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Durch Agarose-Gelelektrophorese wurden die PCR-Produkte ausgewertet.

Tabelle 2.8 Genotypisierungs-PCR

Reaktionsansatz	Inkubationsfolge			
1µl Lysat	**Initiale Denaturierung**	1 Minute	95°C	
10x Taq-Reaktionspuffer	**Denaturierung**	30 Sekunden	95°C	40 Zyklen
2µM Primer ff	**Primer-Hybridisierung**	30 Sekunden	59°C	
2µM Primer rev	**Elongation**	1 Minute	72°C	
0,4 mM dNTP	**Finale Elongation**	5 Minuten	72°C	
1,5 mM $MgCl_2$	**Lagerung**		4°C	
0,2% (v/v) Q				
0,2µl Taq				

2.5.2. Anreicherung der PSD aus dem Cortex von Mäusen

Mäuse wurden durch CO_2 betäubt und dekapitiert. Die Schädeldecke wurde geöffnet und das Gehirn isoliert. Nun wurden Hippocampi isoliert, in 500µl RIPA-Puffer durch pottern lysiert und in Lämmli-Probenpuffer aufgenommen (siehe 2.4.1).

Das Cortexgewebe einer Maus wurde vereinigt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurde das Gewebe in 350µl PSD-Puffer 1 auf Eis suspendiert. Durch Zentrifugation für fünf Minuten bei 500g und 4°C wurden nicht aufgenommene Gewebeteile präzipitiert und der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. 50µl dieses

Überstandes wurden mit Lämmli-Probenpuffer verdünnt und als Probe für die Gesamtfraktion verwendet. Der Rest wurde für 15 Minuten bei 10.000g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde in 300 µl PSD-Puffer 2 resuspendiert und für 80 Minuten bei 20.000g und 4°C zentrifugiert. 50µl des Überstandes wurden mit Lämmli-Probenpuffer versehen und als postnukleäre Fraktion verwendet. Das Pellet wurde als PSD-Fraktion in 100µl PSD-Puffer 3 resuspendiert und mit Lämmli-Probenpuffer versehen. Alle Puffer enthielten Proteaseinhibitoren (Complete-Tabletten, EDTA-frei; *Roche*, Penzberg, Deutschland; nach Anleitung des Herstellers). Die Analyse erfolgte anschließend durch *Western Blot* (2.4.4).

2.5.3. Messung des Glukosespiegels im Blut von Mäusen

Bevor der Nüchtern-Glukosespiegel von Mäusen gemessen wurde, wurden diese für fünf Stunden ohne Nahrung gehalten. Dann wurden die Mäuse mit CO_2 betäubt und der Glukosegehalt des Blutes wurde nach Angaben des Herstellers mit dem Gerät *AccuCheck-Aviva* von *Roche* (Penzberg, Deutschland) bestimmt.

3. Ergebnisse

3.1. Die Rolle von PIST im anterograden Transport von β1AR

Im anterograden Transport wird die Menge von Rezeptoren an der Zelloberfläche reguliert, die dort extrazelluläre Signale erkennen und umsetzen können. Um den Einfluss von PIST auf die Verfügbarkeit von β1AR an der Zelloberfläche aufzuklären, wurde der Anteil an β-adrenergen Rezeptoren bestimmt, der bei Überexpression verschiedener PDZ-Domänenproteine in HEK293-T Zellen an der Zelloberfläche lokalisiert ist. Hierzu wurden Zellen verwendet, die RFP-β1AR gemeinsam mit PIST und/oder PSD-95, bzw. RFP-β2AR gemeinsam mit PIST und/oder NHERF1 exprimieren. β1AR interagiert spezifisch mit PSD-95 und β2AR mit NHERF1. PSD-95 und NHERF1 sind Proteine mit Verankerungsfunktionen für Membranproteine an der Zelloberfläche (Kim et al. 1995; Ardura und Friedman 2011; Imamura et al. 2002). Des Weiteren interagiert β2AR im Gegensatz zu β1AR nicht mit PIST und wurde als Negativkontrolle für die Spezifität der Wirkung von PIST auf den Rezeptor verwendet.

An der Zelloberfläche lokalisierte Rezeptoren wurden kovalent mit Sulfo-NHS-SS-Biotin markiert und durch Streptavidin-HRP-ELISA quantifiziert. Anschließend wurde die an der Zelloberfläche detektierte Menge der β-adrenergen Rezeptoren auf die des Transferrin-Rezeptors, der keinen PDZ-Liganden hat und somit durch Überexpression von PDZ-Domänenproteinen nicht beeinflusst wird, normiert. Der Wert für ein jeweiliges Kontrollexperiment, in dem GFP statt der GFP-fusionierten PDZ-Domänenproteine überexprimiert wurde, wurde jeweils auf 100% gesetzt (Abb. 3.1).

Die Überexpression von PIST führte zu einer signifikanten Verringerung der Menge von β1AR an der Zelloberfläche, hatte dagegen aber keinen Einfluss auf die Zelloberflächen-Proteinmenge von β2AR. Bei zusätzlicher Koexpression von PSD-95 wurde der Effekt von PIST auf die Menge von β1AR an der Zelloberfläche wieder aufgehoben.

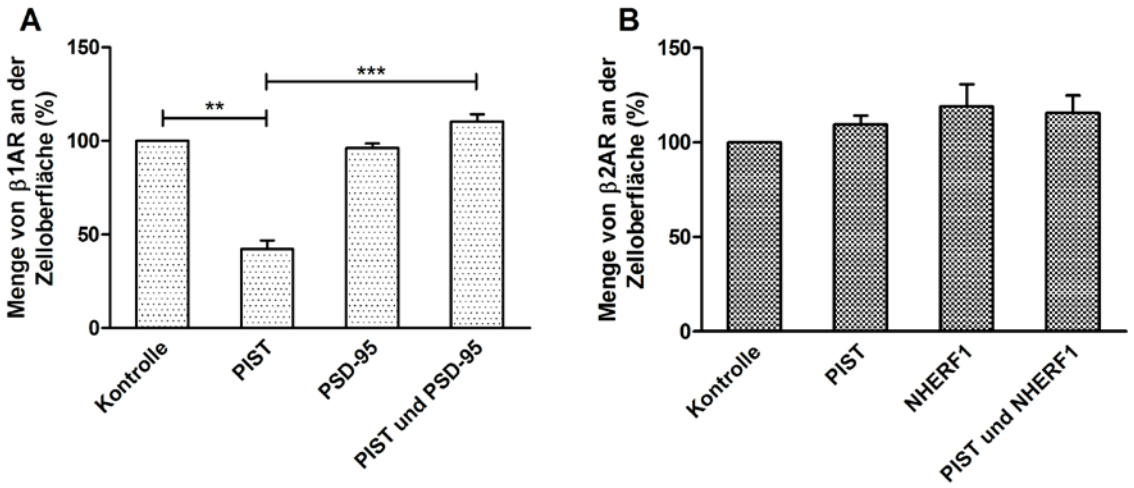

Abbildung 3.1 PIST hemmt den Transport des β1ARs, aber nicht des β2ARs an die Zelloberfläche. Die Koexpression von PSD-95 hebt diesen Effekt auf.

Die Menge von Rezeptoren an der Zelloberfläche von transfizierten HEK293-T Zellen wurde durch Biotin-Markierung und Streptavidin-HRP-ELISA bestimmt. GFP wurde als Kontrolle statt der GFP-fusionierten PDZ-Domänenproteine eingesetzt und es wurden jeweils Dreifachbestimmungen für jede Probe durchgeführt. Die Menge β-adrenergen Rezeptoren an der Zelloberfläche wurde auf die des Transferrin-Rezeptors normiert. **A** HEK293-T Zellen wurden mit Plasmiden für die Expression von RFP-β1AR und den interagierenden PDZ-Domänenproteinen PIST und PSD-95 transfiziert. Die Überexpression von PIST führte zu einer signifikanten Reduktion der Menge von β1AR an der Zelloberfläche. Die Koexpression von PSD-95 hob diesen Effekt wieder auf. **B** HEK293-T Zellen wurden mit Plasmiden für die Expression von β2AR und PIST, sowie dem interagierenden PDZ-Domänenprotein NHERF1 transfiziert. Die Menge des Rezeptors an der Zelloberfläche wurde durch die Überexpression von PIST oder NHERF1 nicht verändert. (ungepaarter t-test, 2 Seiten, N=3, Signifikanzlevel: *$p \leq 0{,}05$; **$p \leq 0{,}01$; ***$p \leq 0{,}001$)

Um den Effekt von PIST auf den Transport des ß1AR näher zu untersuchen, wurde weiterhin die Menge von β1AR an der Zelloberfläche bei reduzierter PIST-Proteinmenge ermittelt. Zur gezielten posttranskriptionellen Reduktion von PIST wurden HEK293 Zellen, die RFP-β1AR stabil überexprimieren, mit *small interfering* RNA (siRNA) transfiziert. Die Proteinmenge von PIST in mit dieser siRNA transfizierten HEK293 oder HEK293-T Zellen war bei allen dargestellten Experimenten auf ca. 30% reduziert. Kontrollzellen wurden mit einer Negativ-siRNA transfiziert. Die Rezeptoren an der Zelloberfläche wurden mit Sulfo-NHS-SS-Biotin markiert und durch Biotin-Streptavidin-Präzipitation quantifiziert. Die Werte für die an der Zelloberfläche detektierten Rezeptoren wurde auf die gesamtzellulären Rezeptormengen normiert und die Kontrolle auf 100% gesetzt (Abb. 3.2). Bei *knockdown* von PIST wurde ein signifikant erhöhter Anteil von β1AR an der Zelloberfläche ermittelt.

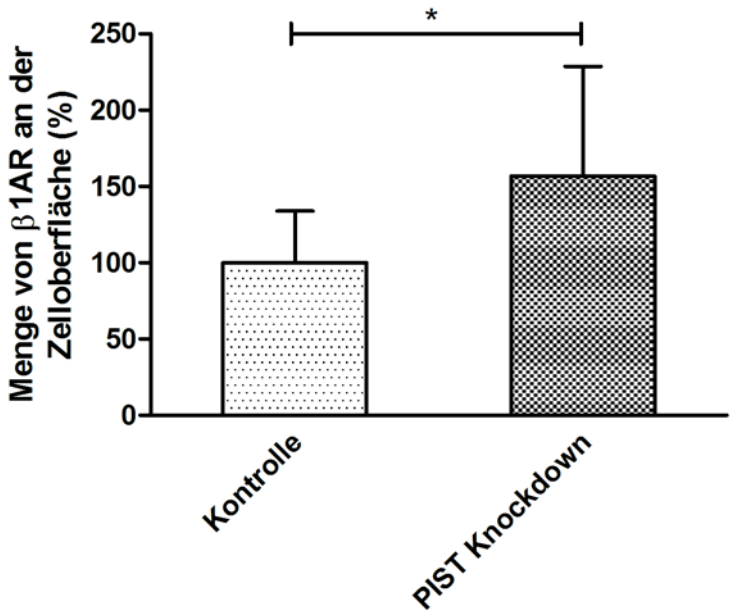

Abbildung 3.2 Bei *knockdown* von PIST ist die Proteinmenge von β1AR an der Zelloberfläche signifikant erhöht.

Stabil RFP-β1AR exprimierende HEK293 Zellen wurden mit siRNA für PIST oder einer Kontroll-siRNA transfiziert. Die Rezeptormenge an der Zelloberfläche wurde durch Biotin-Markierung und Biotin-Streptavidin-Präzipitation ermittelt und auf die Gesamtrezeptormenge normiert. Bei *knockdown* von PIST wurde signifikant mehr β1AR an der Zelloberfläche detektiert. (ungepaarter t-test, 2 Seiten; N=11; Signifikanzlevel: *$p \leq 0{,}05$; **$p \leq 0{,}01$; ***$p \leq 0{,}001$).

Um einen umfassenderen Einblick in die subzelluläre Lokalisation der beteiligten Proteine zu erhalten, wurden HEK293-T Zellen mithilfe eines konfokalen *Spinning Disc*-Mikroskops durch Lebendzell-Mikroskopie analysiert, die RFP-β1AR, PIST-GFP, PSD-95-GFP oder SNX27-GFP exprimieren. SNX27 ist ein weiteres PDZ-Domänenprotein, für das eine Rolle beim postendozytotischen, jedoch nicht beim anterograden Transport von β1AR bekannt ist. Weiterhin wurde geprüft, ob und wie sich die Lokalisation der Proteine bei gemeinsamer Koexpression verändert (Abb. 3.3).

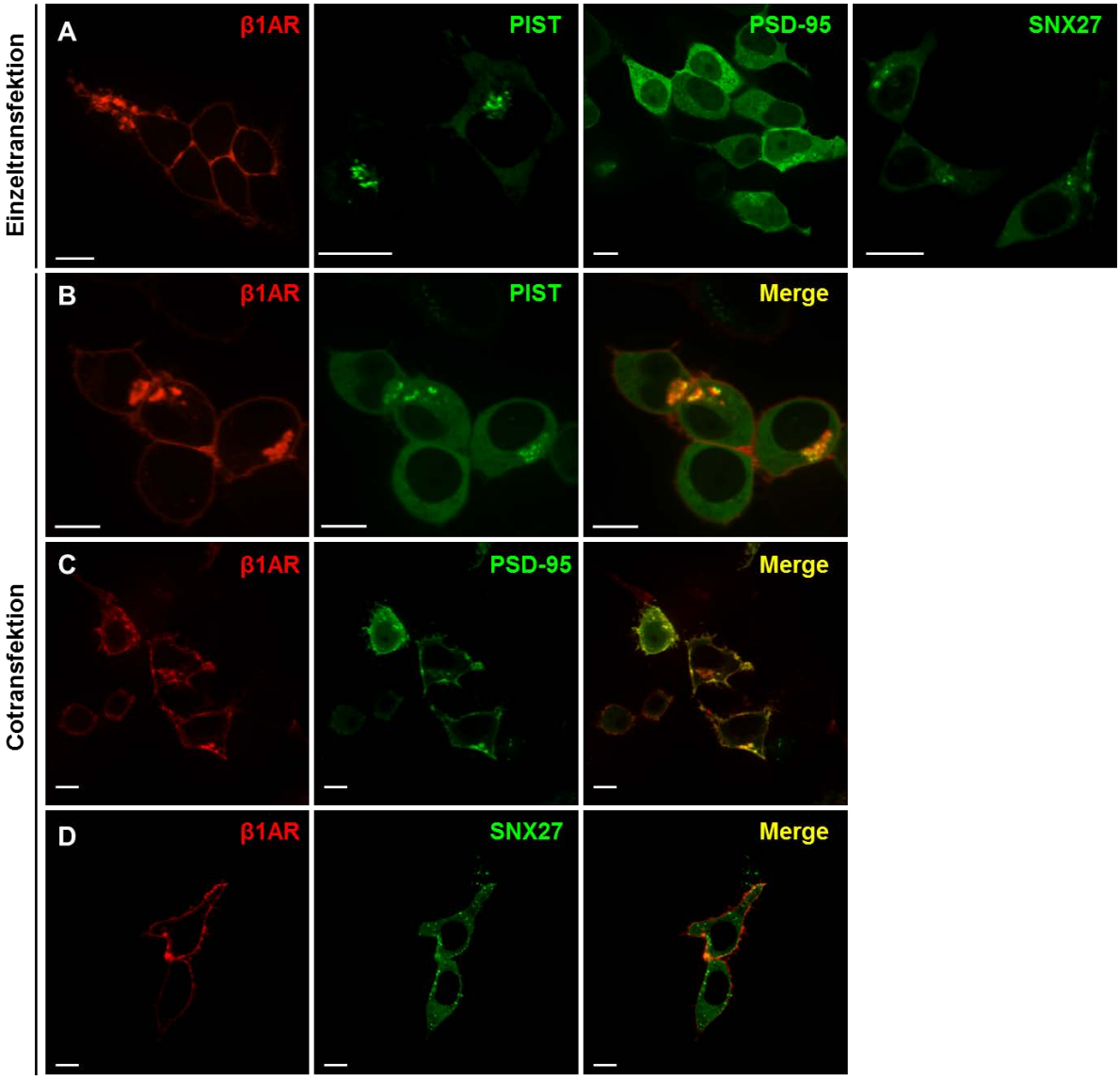

Abbildung 3.3 β1AR ist bei jeweiliger Koexpression mit PIST und PSD-95, jedoch nicht mit SNX27 kolokalisiert.

HEK293-T Zellen wurden einzeln oder in den angegebenen Kombinationen mit Expressionsvektoren für RFP-β1AR, PIST-GFP, PSD-95-GFP und SNX27-GFP transfiziert, auf Lebendzell-Mikroskopieplatten ausplattiert und bei 37°C und 5% CO_2 durch Lebendzellmikroskopie mittels konfokaler *Spinning Disc*-Mikroskopie analysiert. **A** β1AR wird im Wesentlichen an der Plasmamembran detektiert. PIST befindet sich in einem größeren subzellulären Kompartiment, PSD-95 ist fast in der gesamten Zelle verteilt, SNX27 ist in kleinen subzellulären Kompartimenten angereichert. **B** Bei Koexpression sind β1AR und PIST in einem perinukleären Kompartiment kolokalisiert. **C** β1AR und PSD-95 sind bei Koexpression in kleinen subzellulären Kompartimenten und an der Plasmamembran kolokalisiert. **D** β1AR und SNX27 sind bei Koexpression nicht kolokalisiert. (Skalierung: 10µm)

Bei Einzelexpression ist RFP-β1AR im Wesentlichen an der Plasmamembran der HEK293-T Zellen lokalisiert. PIST-GFP wird in einem größeren perinukleären Kompartiment detektiert, PSD-95-GFP ist fast überall in der Zelle verteilt und SNX27-GFP befindet sich in kleinen subzellulären Kompartimenten. Die Koexpression von RFP-β1AR mit PIST-GFP führt zu einer starken Umverteilung des Rezeptors. Während nur noch ein Teil an der Plasmamembran zu

detektieren ist, ist der größte Teil nun mit PIST-GFP in einem perinukleären Kompartiment kolokalisiert. Bei Koexpression von β1AR und PSD-95-GFP ist ebenfalls starke Kolokalisation zu beobachten. Beide Proteine sind hierbei hauptsächlich an der Plasmamembran und in kleinen subzellulären Kompartimenten zu finden. SNX27-GFP ist nicht mit RFP-β1AR kolokalisiert und beide Proteine verändern ihre Lokalisation gegenüber der Einzeltransfektion nicht.

Die Reduktion der Verfügbarkeit von β1AR an der Zelloberfläche durch PIST warf die Frage auf, ob sich diese Veränderung auch in der Aktivität des β1AR-Signalweges widerspiegelt. Die Stimulierung von β1AR mit seinem Agonisten Isoproterenol führt zur Aktivierung des Ras/Raf/MAPK-Signalweges (Pak et al. 2002). Da dies die Phosphorylierung des Proteins ERK bewirkt, kann die Aktivität des Signalwegs durch das Verhältnis von phosphoryliertem ERK (pERK) zur Gesamtproteinmenge von ERK gemessen werden.

Um den Einfluss von PIST auf die Aktivität des β1AR zu untersuchen, wurden HEK293 Zellen, die stabil RFP-β1AR exprimieren, verwendet. Diese wurden mit Expressionsvektoren für PIST-GFP, bzw. als Kontrolle für GFP transfiziert.

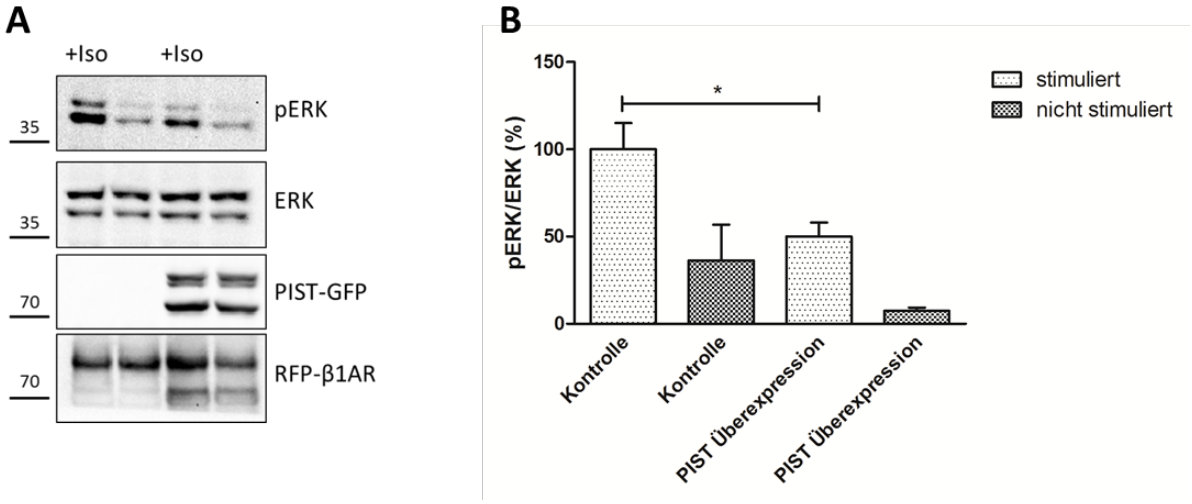

Abbildung 3.4 Die Überexpression von PIST führt zur Reduktion der Agonist-induzierten Aktivität von β1AR.

Stabil RFP-β1AR exprimierende HEK293 Zellen wurden mit Expressionsvektoren für PIST-GFP oder zur Kontrolle für GFP transfiziert. Die Zellen wurden mit Isoproterenol für 20 Minuten stimuliert und lysiert. Vergleichsproben wurden ohne den Agonisten inkubiert. **A** Das Lysat wurde für eine *Western Blot* Analyse verwendet, indem durch den Einsatz von spezifischen Antikörpern die Menge an phosphoryliertem (pERK) und gesamten ERK bestimmt wurde. **B** Der Quotient pERK/ERK ist ein Maßstab für die Aktivität des MAPK-Signalweges in der Zelle. Das Experiment ergab, dass die Aktivität der Kinase ERK durch Überexpression von PIST signifikant reduziert wurde. (ungepaarter t-test, 2 Seiten, N=5; Signifikanzlevel: *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001)

Nach einer Inkubation für 16h mit serumfreiem Medium wurden die Zellen für 20 Minuten mit 10µg/ml Isoproterenol stimuliert. Zum Vergleich wurde je eine Probe nicht stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und durch *Western Blot* mit spezifischen Antikörpern die Mengen an pERK sowie ERK bestimmt (Abb. 3.4). Die Menge an phosphoryliertem ERK wurde auf die Gesamtmenge von ERK normiert und der Wert für die stimulierte Kontrolle auf 100% gesetzt. Die Überexpression von PIST führte zu einer signifikanten Reduktion der durch den Agonisten induzierten MAPK-Aktivität. Auch die basale Aktivität des MAPK-Signalweges war bei Überexpression von PIST verringert; dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

Zum Vergleich wurde nun die Agonist-induzierte Aktivität von β1AR bei *knockdown* von PIST bestimmt. Hierzu wurden stabil RFP-β1AR exprimierende Zellen mit einer siRNA für PIST oder als Kontrolle mit einer Negativ-siRNA transfiziert. Nach 16h Inkubation mit serumfreiem Medium wurden die Zellen mit Isoproterenol stimuliert und anschließend ebenfalls der Quotient von pERK und ERK als Maßstab für die Aktivität dieser Proteinkinase bestimmt (Abb. 3.5).

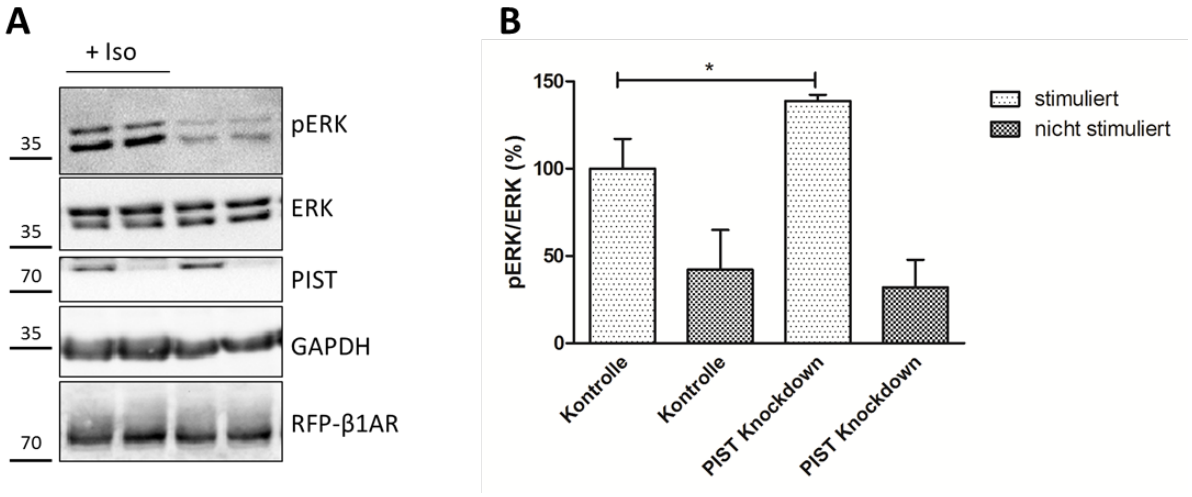

Abbildung 3.5 Die Reduktion der Proteinmenge von PIST erhöht die Agonist-induzierte Aktivität von β1AR.

Stabil RFP-β1AR exprimierende HEK293 Zellen wurden mit siRNA für PIST oder einer Negativkontrolle transfiziert. Die Zellen wurden für 20 Minuten mit Isoproterenol stimuliert und lysiert. Vergleichsproben wurden ohne Isoproterenol inkubiert. **A** Die Zellen wurden lysiert und die Proteinmenge an phosphoryliertem ERK und ERK in den Lysaten durch *Western Blot* bestimmt. **B** Der Quotient der Menge von phosphoryliertem ERK zur Gesamtmenge von ERK wurde als Maß für die Aktivität von ERK bestimmt. Die Reduktion der Menge an PIST durch siRNA führte zu einer signifikanten Steigerung der Aktivität des MAPK-Signalweges in der Zelle. (ungepaarter t-test, 2 Seiten N=3; Signifikanzlevel: *$p \leq 0{,}05$; **$p \leq 0{,}01$; ***$p \leq 0{,}001$)

Zum Vergleich wurde je eine Probe nicht stimuliert. Der Wert für das stimulierte Kontrollexperiment wurde auf 100% gesetzt. Während die Überexpression von PIST zu einer Reduktion der MAPK-Aktivität nach β1AR-Stimulierung führte, erhöhte die Reduktion der PIST-Menge in der Zelle die Aktivität von ERK.

Da β1AR sowohl mit PIST, als auch mit PSD-95 über seinen PDZ-Liganden interagiert, sollte nun die Frage geklärt werden, welchen Einfluss PIST auf die Interaktion des Rezeptors mit PSD-95 hat. Hierzu wurde durch Koimmunpräzipitation die Menge von RFP-β1AR bestimmt, die mit PSD-95-GFP interagiert, wenn PIST (in diesem Fall eine mit *flag-tag* markierte Variante) oder ein Kontrollprotein, das mit keinem der anderen Proteine interagiert, koexprimiert wird. Stabil RFP-β1AR exprimierende HEK293-T Zellen wurden mit Expressionsvektoren für PSD-95-GFP und PIST-*flag* oder als Kontrolle DDX1-*flag* transfiziert. Zusätzlich wurde als Kontrolle für die Spezifität dieser Analyse PSD-95-GFP durch GFP ersetzt. Die Zellen wurden lysiert und zum einen als *Input*probe verwendet, zum anderen mit einer Agarosematrix inkubiert, die an GFP-Fusionsproteine bindet (GFP-Trap). Die Analyse der *Input*-, sowie der Präzipitatproben erfolgte durch *Western Blot* (Abb. 3.6).

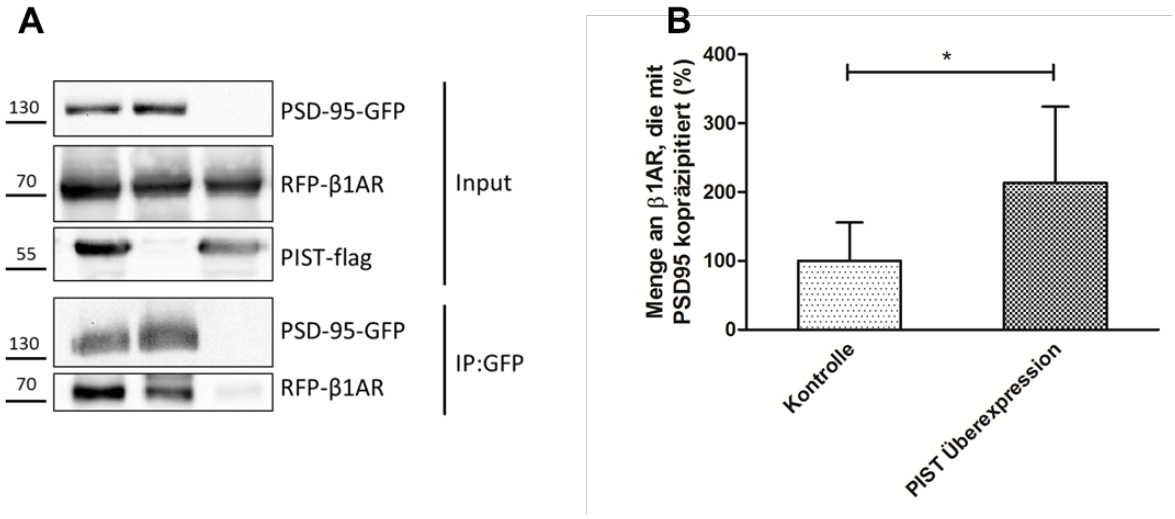

Abbildung 3.6 PIST verstärkt die Interaktion von β1AR mit PSD-95.

A Stabil RFP-β1AR exprimierende Zellen wurden mit Expressionsvektoren für PSD-95-GFP und PIST-*flag* oder zur Kontrolle für DDX1-flag transfiziert. Zum Vergleich wurde PSD-95-GFP durch GFP ersetzt, um die Spezifität der Analyse zu gewährleisten. GFP-Fusionsproteine wurde mit Hilfe der GFP-Trap-Matrix immunpräzipitiert und die Menge an kopräzipitiertem RFP-β1AR im *Western Blot* bestimmt. **B** Die Menge an kopräzipitiertem Rezeptor wurde auf dessen Gesamtmenge normiert. Im Vergleich zur Kontrolle führte die Koexpression von PIST-*flag* zu einer signifikanten Erhöhung von kopräzipitiertem RFP-β1AR. (ungepaarter t-test, 2 Seiten N=7; Signifikanzlevel: *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001)

Anschließend wurde die Proteinmenge des Rezeptors in der Präzipitatprobe auf die in der *Input*probe normiert. Der Wert für das Kontrollexperiment wurde auf 100% gesetzt. Im Vergleich zur Kontrolle war die Menge an β1AR, die mit PSD-95 interagierte, bei Überexpression von PIST signifikant erhöht.

Weiterhin wurde auch der Einfluss einer reduzierten PIST-Proteinmenge auf die Interaktion von β1AR mit PSD-95 überprüft. Hierzu wurden stabil RFP-β1AR exprimierende HEK293-T Zellen mit siRNA für PIST oder einer Negativkontroll-siRNA und zusätzlich mit Expressionsvektoren für PSD-95-GFP oder GFP transfiziert. Die Menge an mit PSD-95 interagierendem Rezeptor wurde ebenfalls mithilfe von GFP-Trap bestimmt (Abb. 3.7). Die Menge des kopräzipitierten Rezeptors wurde erneut auf dessen Gesamtmenge normiert und die Werte für das Kontrollexperiment auf 100% gesetzt. Während die Überexpression von PIST die Menge von β1AR, die mit PSD-95 interagiert, erhöht, wird diese bei Reduktion der PIST-Proteinmenge signifikant verringert.

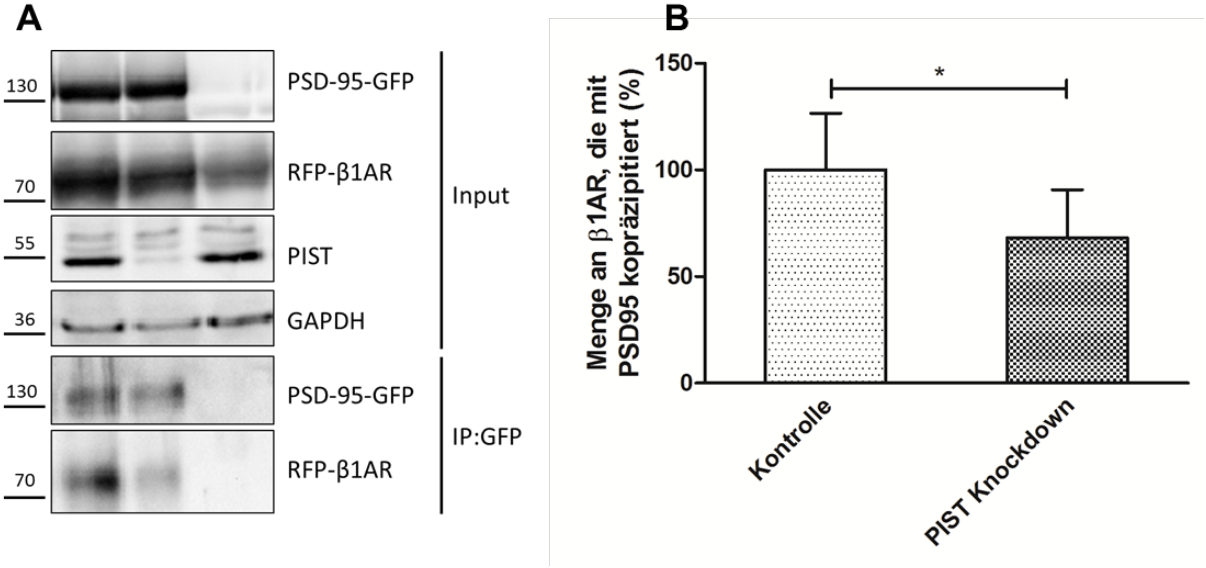

Abbildung 3.7 Die Reduktion der Proteinmenge von PIST durch siRNA führt zu einer verringerten Interaktion von β1AR mit PSD-95.

A HEK293 Zellen, die stabil RFP-β1AR exprimieren, wurden mit siRNA für PIST, bzw. einer Negativkontroll-siRNA transfiziert. Nach 24h wurden sie zusätzlich mit Expressionsvektoren für PSD-95-GFP, bzw. GFP transfiziert. Nach 72h wurden die Zellen lysiert und die Menge an Rezeptoren, die mit PSD-95-GFP interagierten, durch GFP-Trap und *Western Blot* bestimmt. **B** Der Anteil an kopräzipitiertem Rezeptor zur Gesamtproteinmenge des Rezeptors wurde ermittelt. Die Reduktion der PIST-Proteinmenge führte zu einer signifikanten Reduktion der Interaktion von RFP-β1AR mit PSD-95-GFP. (ungepaarter t-test, 2 Seiten, N=9; Signifikanzlevel: *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001)

3.2. Die Rolle von PIST bei der postendozytotischen Sortierung von β1AR

Werden Rezeptoren stimuliert, so führt dies in den meisten Fällen zu einer Internalisierung der Rezeptoren in endosomale Kompartimente. Da auch diese Transportwege häufig durch PDZ-Domänenproteine reguliert sind, entstand die Frage, ob PIST auch hier die subzelluläre Sortierung von β1AR beeinflusst.

Daher wurden Internalisierung und Recycling von β1AR, sowie vergleichsweise β2AR, in HEK293 Zellen bestimmt (Abb. 3.8). Hierzu wurden HEK293 Zellen verwendet, die *flag*-β1AR oder *flag*-β2AR jeweils gemeinsam mit PIST-GFP oder GFP exprimieren. Die Internalisierung der Rezeptoren nach Stimulierung für 20 Minuten mit dem Agonisten wurde gemessen; ebenso die Menge der Rezeptoren an der Zelloberfläche nach Stimulierung für 20 Minuten und einer folgenden 40-minütigen Recyclingphase durch Inkubation mit dem Antagonisten Alprerenol. Die Analyse der zelloberflächenlokalisierten Rezeptoren erfolgte mithilfe eines Antikörpers, der gegen die *flag*-Markierung des Rezeptors gerichtet und an Alexa647 gekoppelt war, und Durchflusszytometrie. Die Fluoreszenz von GFP und Alexa647 wurde für jede Zelle gemessen und die Durchschnittsfluoreszenz für Alexa647 der Zellen, die einen Mindestwert für beide Fluoreszenzbereiche überschritten, wurde ermittelt. Nicht mit dem Antikörper inkubierte Zellen dienten als Negativkontrolle und erzielten in allen Experimenten maximal 1% der durchschnittlichen Alexa647-Fluoreszenzintensität der anderen Proben. Nicht stimulierte Zellen wurden als Referenz verwendet.

Die Rezeptoren der mit dem Agonisten stimulierten Zellen wurden in den 20 Minuten Inkubationszeit teilweise internalisiert. Die Menge an internalisierten Rezeptoren wurde als Differenz der Zelloberflächenrezeptoren zwischen den stimulierten und den Referenzproben bestimmt und auf die Referenz normiert. Der Anteil an nach der Recycling-Phase an der Zelloberfläche lokalisierten Rezeptoren wurde ebenfalls auf die Referenz normiert (Abb. 3.8). Die Internalisierung beider β-adrenerger Rezeptoren wurde durch Überexpression von PIST nicht beeinflusst. Hingegen war die Menge der nach der Recycling-Phase an der Zelloberfläche detektierten β1-adrenergen Rezeptoren bei Überexpression von PIST signifikant reduziert. Das Recycling von β2AR war nicht verändert.

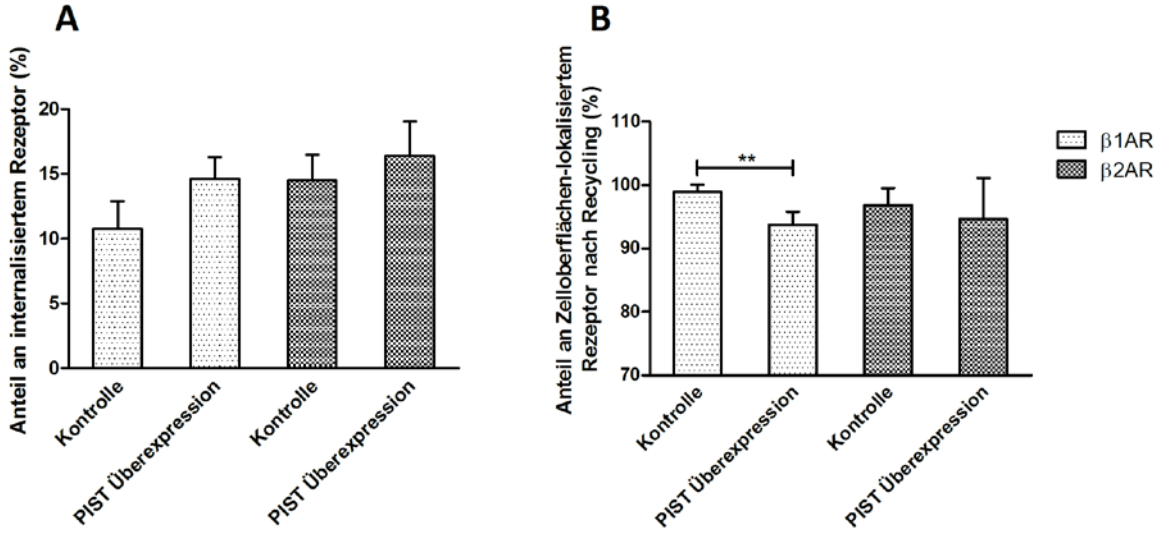

Abbildung 3.8 PIST hemmt das Recycling des β1AR.

HEK293 Zellen, die *flag*-β1AR oder *flag*-β2AR gemeinsam mit PIST-GFP oder GFP exprimieren, wurden mithilfe eines Alexa647-gekoppelten anti-*flag*-Antikörpers und Durchflusszytometrie analysiert. Es wurde die Menge an **A** nach 20 Minuten internalisiertem, sowie **B** nach 40 weiteren Minuten Recycling an der Zelloberfläche lokalisiertem Rezeptor bestimmt. Während die Überexpression von PIST die Internalisierung beider β-adrenerger Rezeptoren nicht signifikant veränderte, führte sie zu einer signifikanten Reduktion des Recyclings von β1AR, aber nicht von β2AR. (ungepaarter t-test, 2 Seiten; N=7; Signifikanzlevel: *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001)

Um den Einfluss von PIST auf das Recycling von β1AR weiter zu prüfen, wurden die Experimente zur Bestimmung von Internalisierung und Recycling bei *knockdown* von PIST wiederholt (Abb. 3.9). Hierzu wurden die HEK293-Zellen mit Plasmiden transfiziert, die zur Expression von GFP und einer shRNA (*short hairpin* RNA) für PIST führten. Die Transfektion dieses Plasmids bewirkte eine Reduktion des PIST-Proteinlevels, genauer beschrieben in Kapitel 3.3.2. Durch die Expression von GFP konnten auch hier erfolgreich transfizierte Zellen über ein Mindestmaß an Fluoreszenzsignal für die Durchflusszytometrie-Analyse selektioniert und bezüglich der Menge an internalisierten, sowie nach einer fokgenden Recyclingphase an der Zelloberfläche zu detektierenden Rezeptoren analysiert werden. Hierbei zeigte sich, dass der *knockdown* von PIST die Internalisierung von β1AR ebenfalls nicht signifikant beeinflusste, während die Menge an Rezeptoren an der Zelloberfläche nach einer Recyclingphase signifikant erhöht war.

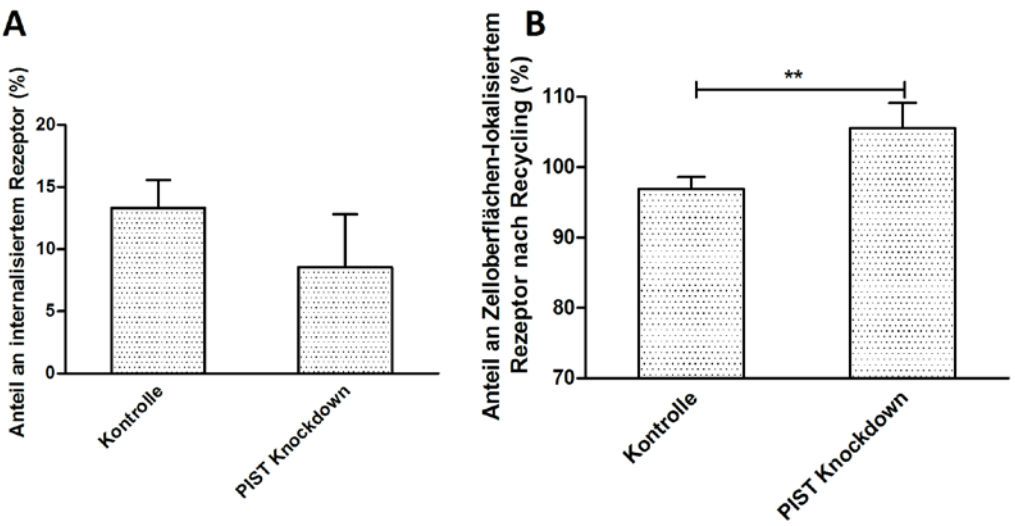

Abbildung 3.9 Bei *knockdown* von PIST ist die Internalisierung von β1AR nicht signifikant beeinflusst; das Recycling ist dagegen signifikant gesteigert.

HEK293-Zellen wurden mit einem Expressionsvektor für *flag*-β1AR gemeinsam mit shPIST/PLV, das zur Expression einer shRNA für PIST einerseits und GFP andererseits führt, oder einem Kontrollplasmid für die Expression von GFP transfiziert. Nach 72h wurde der Anteil an **A** nach 20 Minuten internalisierten, sowie **B** der nach weiteren 40 Minuten Recycling an der Zelloberfläche lokalisierten Rezeptoren bestimmt. Die Internalisierung von β1AR war bei reduzierter PIST-Menge nicht verändert. Das Recycling wurde dagegen signifikant gesteigert. (ungepaarter t-test, 2 Seiten; N=8; Signifikanzlevel: *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001)

Bisher war PIST im Wesentlichen als TGN-lokalisiertes Protein bekannt. Aufgrund der vorgestellten Ergebnisse ist es daher interessant zu untersuchen, wo in der Zelle PIST auf den internalisierten Rezeptor trifft und sein Recycling beeinflusst.

Es wurde beobachtet, dass die Verteilung von PIST in mit Isoproterenol stimulierten β1AR-überexprimierenden Zellen verändert ist. Statt punktuell in einer engen Umgebung um den Zellkern verteilten sich nach der Stimulierung von β1AR die PIST-Proteine breiter über die gesamte Zelle (Abb. 3.10). Um diese Beobachtung zu bestätigen wurde die Proteinverteilung von PIST in stimulierten und nicht-stimulierten Zellen quantitativ ausgewertet. Hierzu wurde mit dem Programm ImageJ zunächst ein geeigneter Mindestwert für das PIST-Signal gewählt, der zwischen Zellregionen mit oder ohne PIST-Lokalisation unterscheiden lässt. Nun wurden Bereiche von Interesse, äquivalent zu dem Umriss von Zellen, ausgewählt und die Menge der Pixel die diesen Mindestwert erreichen sowie die Gesamtheit der Pixel im ausgewählten Bereich ermittelt. Der Quotient dieser Werte wurde dann als Maß für die Verbreitung von PIST für jeweils 10 stimulierte und nicht-stimulierte Zellen berechnet. Dabei zeigte sich, dass

der Anteil der Zelle, der PIST-positiv war, bei Stimulation von β1AR durch Isoproterenol massiv erhöht war.

Um zu klären, in welchem subzellulären Kompartiment der internalisierte β1AR und PIST miteinander interagieren, wurden nun Kolokalisierungs-Experimente mit verschiedenen Markerproteinen für subzelluläre Kompartimente durchgeführt.

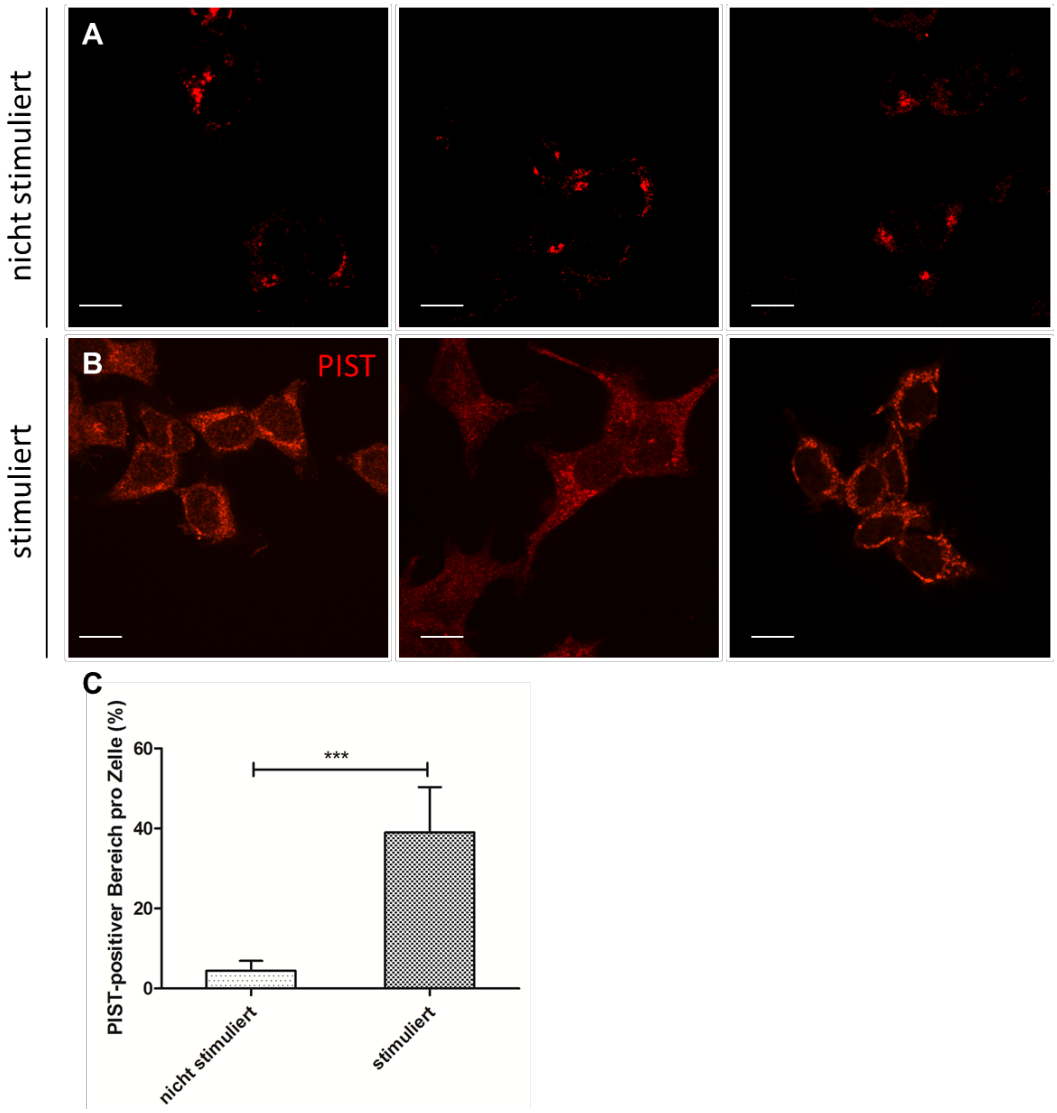

Abbildung 3.10 Die Verteilung von PIST in β1AR-überexprimierenden HEK293-T Zellen wird durch Stimulierung mit Isoproterenol verändert.

HEK293-T Zellen, die für verschiedene Experimente mit β1AR transfiziert und **A** nicht stimuliert oder **B** für 20 Minuten mit Isoproterenol stimuliert wurden, wurden zufällig ausgewählt und auf die Verteilung des endogenen PIST untersucht (rot). PIST war in den stimulierten Zellen wesentlich breiter und in kleineren Kompartimenten über die Zelle verteilt. (Skalierung: 10µm) **C** Der Bereich der Verteilung von PIST wurde quantifiziert. Hierzu wurde die Menge an Pixeln eines ausgewählten Bereichs ermittelt, der einen Mindestwert an Fluoreszenzsignal erreicht und auf den gesamten Bereich normiert. (ungepaarter t-test, 2 Seiten; N=10; Signifikanzlevel: *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001).

Nach Bindung ihres spezifischen Liganden internalisieren Rezeptoren in die frühen Endosomen der Zelle. Um zu testen, ob PIST hier mit dem Rezeptor interagiert, wurden HEK293 Zellen, die *flag*-β1AR und PIST-GFP exprimieren, auf Lebendzellmikroskopie-Platten ausgesät. Diese Zellen wurden mit einem Antikörper inkubiert, der direkt an Alexa-555 gekoppelt und gegen die *flag*-Markierung des Rezeptors gerichtet war. Nach 20 Minuten wurden die Zellen mit 10µg/ml Isoproterenol inkubiert und so die Internalisierung des Rezeptors induziert. Nach weiteren 20 Minuten wurden die Zellen fixiert und das Markerprotein EEA1 für das frühe Endosom durch Immuncytochemie angefärbt (Mu et al. 1995). Auf diese Weise konnte gezielt nur der Anteil des Rezeptors detektiert werden, der nach der Stimulierung internalisiert war. Diese Proben wurden mithilfe eines konfokalen *Spinning Disc*-Mikroskops ausgewertet (Abb. 3.11).

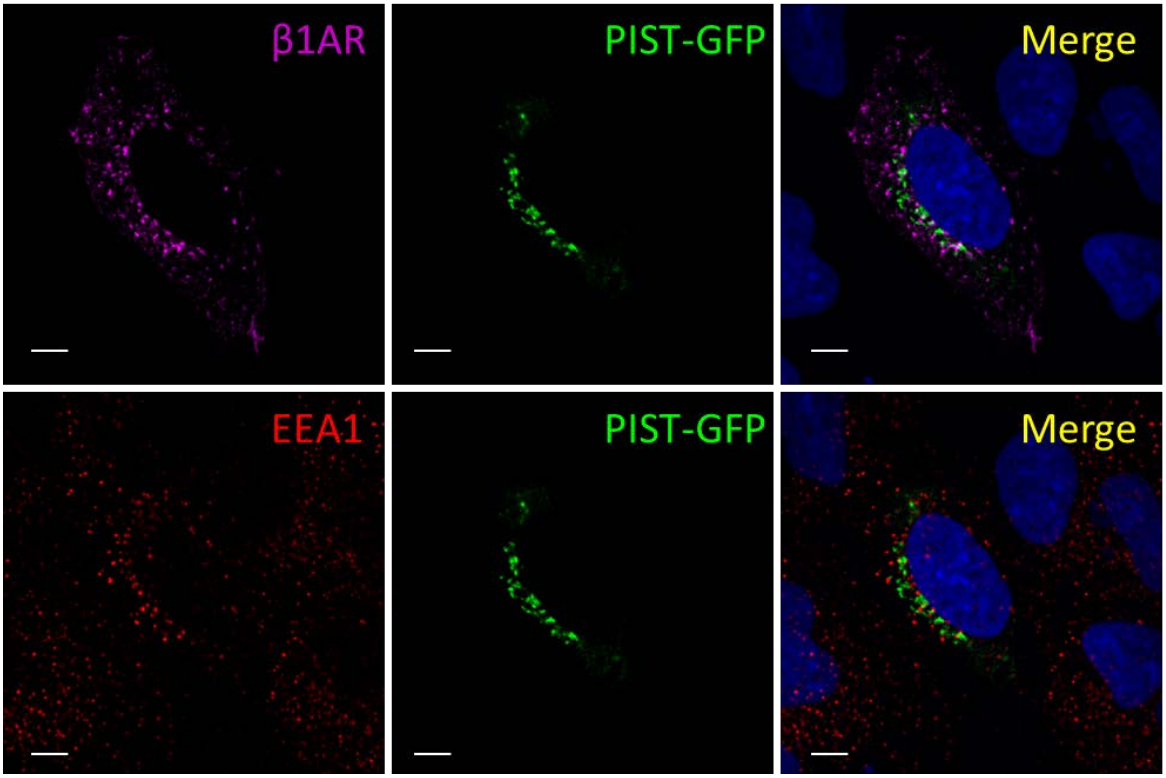

Abbildung 3.11 Der internalisierte β1AR und PIST kolokalisieren nicht im frühen Endosom.

Mit Expressionsvektoren für *flag*-β1AR und PIST-GFP transfizierte HEK293-T Zellen wurden auf Lebendzellmikroskopie-Platten ausgesät. Die Zellen wurden mit einem an Alexa555-gekoppelten Antikörper gegen die *flag*-Markierung inkubiert (magenta), für 20 Minuten mit Isoproterenol stimuliert, mit 4% PFA fixiert und durch Immuncytochemie für ein Markerprotein für das frühe Endosom, EEA1, gefärbt (rot). Die Zellen wurden mithilfe eines konfokalen *Spinning Disc*-Mikroskops analysiert. Während der internalisierte Rezeptor zu einem Teil mit PIST kolokalisiert ist, was sich durch weiße Punkte bei der Überlagerung von magenta und grün zeigt, wurde keine Kolokalisation von PIST-GFP und EEA1 detektiert. (Skalierung: 5µm)

Während der internalisierte Rezeptor teilweise mit PIST kolokalisiert war, war PIST nicht mit EEA1 kolokalisiert, wurde also nicht in frühen Endosomen detektiert.

Nach der Internalisierung in frühe Endosomen werden Rezeptoren häufig weitertransportiert in späte Endosomen.

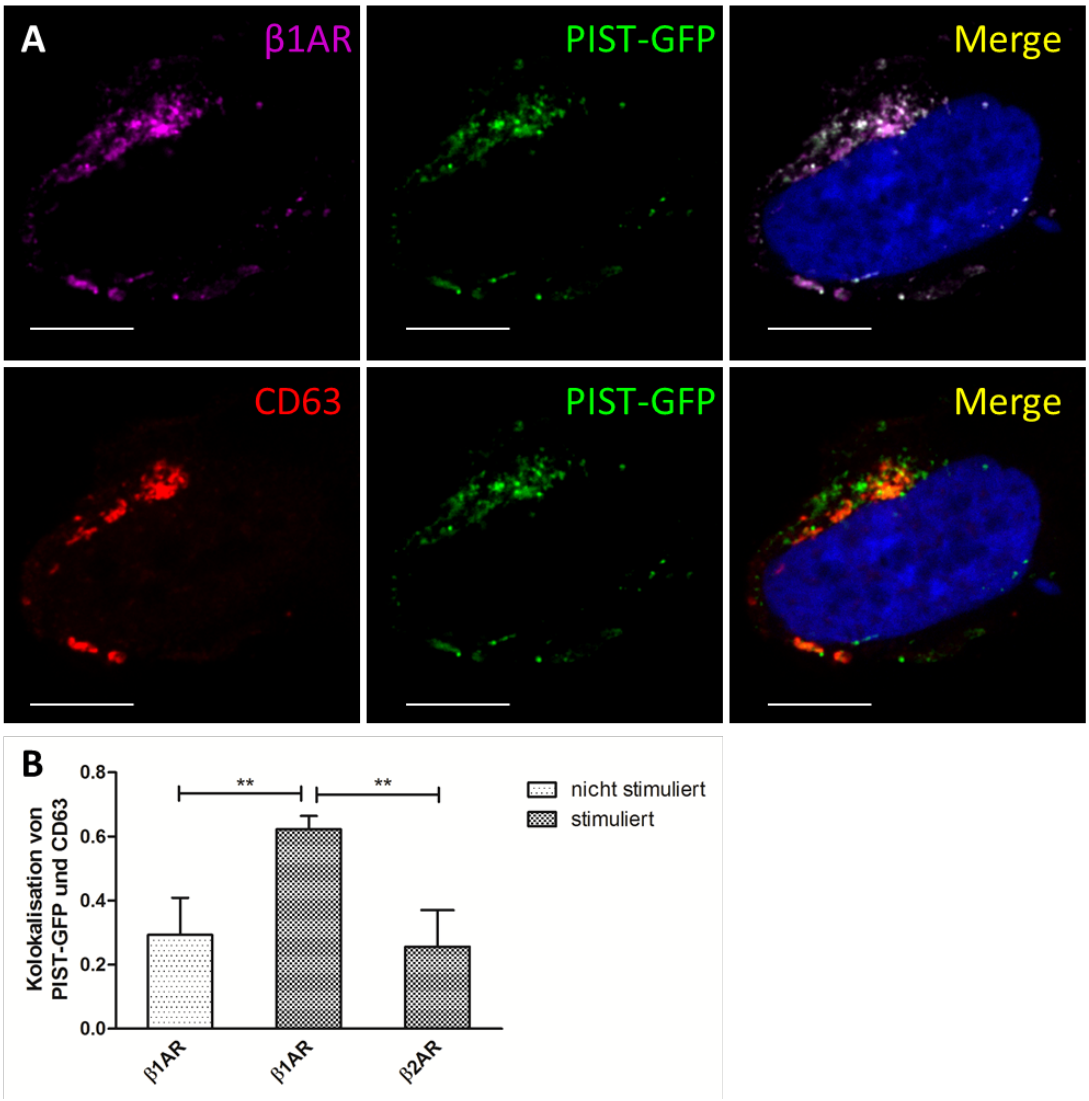

Abbildung 3.12 PIST ist in β1AR-überexprimierenden Zellen nach Stimulierung durch Isoproterenol mit CD63, einem Markerprotein für das späte Endosom, kolokalisiert.

A HEK293 Zellen, die *flag*-β1AR und PIST-GFP exprimieren, wurden auf Lebendzellmikroskopie-Platten ausgesät und mit einem Alexa555-markierten Antikörper inkubiert, der gegen die *flag*-Markierung gerichtet ist (magenta). Anschließend wurden die Zellen für 20 Minuten mit Isoproterenol stimuliert und fixiert. Durch Immuncytochemie wurde CD63 als intrazellulärer Marker für das späte Endosom detektiert (rot). Sowohl der internalisierte Rezeptor als auch CD63 war mit PIST-GFP kolokalisiert. Zu sehen ist dies durch weiße Bereiche (Überlagerung von magenta und grün), bzw. gelbe Bereiche (Überlagerung von rot und grün; Skalierung: 10µm) **B** Der Kolokalisations-Koeffizient von PIST-GFP und CD63 in β1AR-überexprimierenden Zellen mit und ohne Stimulation, sowie in stimulierten β2AR-überexprimierenden Zellen wurde ermittelt. Die Kolokalisation von PIST-GFP mit CD63 ist bei stimuliertem ß1AR signifikant höher als bei den Vergleichsexperimenten. (ungepaarter t-test, 2 Seiten; N=5; Signifikanzlevel: *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001)

Um zu prüfen, ob PIST hier mit dem internalisierten Rezeptor interagiert, wurde das oben beschriebene Experiment mit CD63 als Markerprotein für das späte Endosom wiederholt (Metzelaar et al. 1991). In diesem Experiment wurde deutlich, dass PIST sowohl mit dem internalisierten Rezeptor, als auch mit CD63 kolokalisiert ist (Abb. 3.12A). Offenbar ist also PIST nach Stimulierung von β1AR durch Isoproterenol in späten Endosomen zu finden. Die Kolokalisation von PIST mit CD63 wurde mithilfe des Tests Colok2 von ImageJ quantifiziert. Für die Überexpression von β1AR und Stimulierung durch Isoproterenol wurde ein Kolokalisationskoeffizient von 0,6 ermittelt. Dieser Wert war signifikant höher als in Vergleichsexperimenten. In diesen wurde ein Kolokalisationskoeffizient für PIST und CD63 von 0,25 für den nicht-stimulierten β1AR, sowie 0,28 für den stimulierten β2AR detektiert (Abb. 3.12B).

Nachdem Rezeptoren internalisiert sind, werden sie häufig zum Lysosom transportiert und dort abgebaut. Um zu testen, ob PIST und β1AR nach Stimulierung des Rezeptors im Lysosom zu finden sind, wurde das beschriebene Experiment mit LAMP1 als Markerprotein für das Lysosom wiederholt (Winchester 2001).

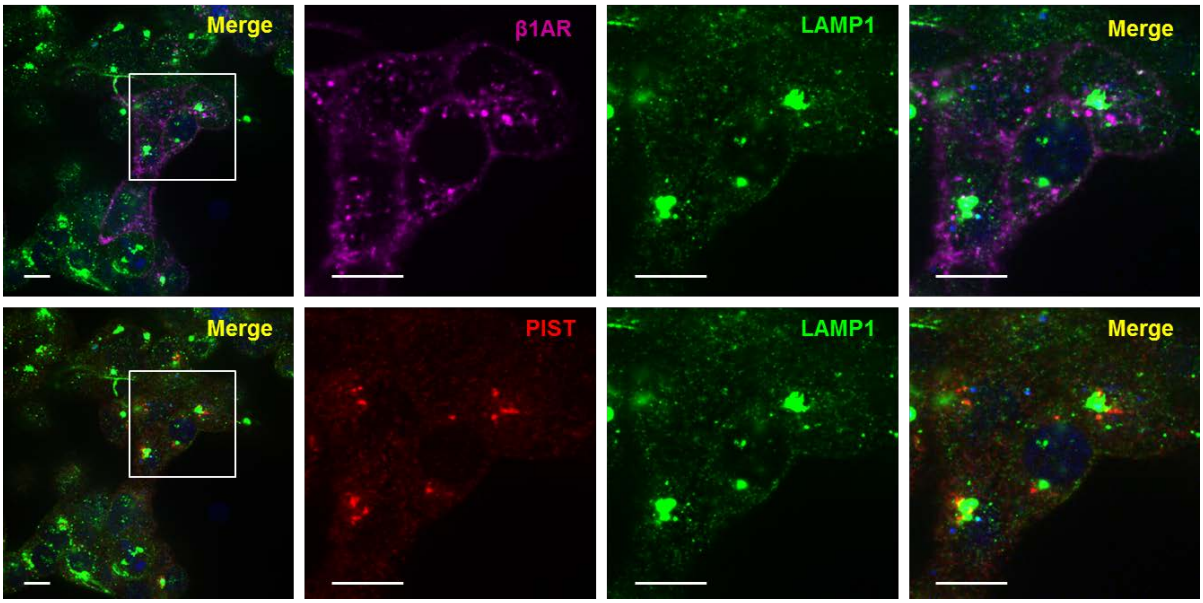

Abbildung 3.13 PIST und β1AR sind nach Stimulierung des Rezeptors nur zu einem geringen Anteil im Lysosom detektierbar.

HEK293-T Zellen, die *flag*-β1AR exprimieren, wurden auf Lebendzellmikroskopie-Platten ausplattiert. Die Zellen wurden mit einem an Alexa647 gekoppelten anti-*flag* Antikörper inkubiert (magenta), für 20 Minuten mit Isoproterenol stimuliert und mit 4% PFA fixiert. Anschließend wurden durch Immuncytochemie PIST (rot) und das lysosomale Protein LAMP1 (grün) angefärbt und im konfokalen *Spinning Disc*-Mikroskop analysiert. Nur wenige weiße Punkte in der Überlagerung weisen auf eine Kolokalisation von β1AR und LAMP1 hin. Wenige gelbe Punkte in der Überlagerung indizieren, dass PIST und LAMP1 zu einem geringen Anteil kolokalisiert waren. (Skalierung: 10µm)

Nachdem bei Überexpression von PIST-GFP hier aber keine eindeutige Aussage möglich war, wurde das Experiment dahingehend modifiziert, dass HEK293-T Zellen, die lediglich *flag*-β1AR exprimieren, verwendet wurden und zusätzlich das endogene PIST angefärbt wurde (Abb. 3.13). Sowohl der Rezeptor als auch PIST wurden im Lysosom nur zu einem geringen Anteil detektiert.

Das Retromer ist ein subzellulärer Komplex, der für den Transport von Membranproteinen von Endosomen zum TGN verantwortlich ist (Bonifacino und Rojas 2006). Somit ist eine Beteiligung des Retromers an dem PIST-vermittelten postendozytotischen Transport von β1AR möglich. Um dies zu prüfen, wurden *flag*-β1AR exprimierende HEK293-T Zellen auf Lebendzellmikroskopie-Platten mit einem an Alexa647 gekoppelten anti-*flag* Antikörper inkubiert und für 20 Minuten mit 10µg/ml Isoproterenol stimuliert. Nun wurden die Zellen fixiert und endogenes PIST, sowie SNX1 als subzellulärer Marker für das Retromer angefärbt (Abb. 3.14; Griffin et al. 2005). Es wurde festgestellt, dass PIST in nicht stimulierten Zellen teilweise mit SNX1 in einem perinukleären Kompartiment kolokalisiert war. Nach Stimulierung durch Isoproterenol waren beide Proteine kolokalisiert und deutlich breiter in kleinen Kompartimenten über die Zelle verteilt. Außerdem war PIST nun mit dem endozytierten Rezeptor kolokalisiert.

β1AR ist ein mit dem G-Protein $G\alpha_S$ gekoppelter Rezeptor. Somit führt seine Stimulierung zur Aktivierung der Adenylatcyclase, was einen cAMP-Anstieg in der Zelle zur Folge hat. Daher ist es interessant, ob auch ein β1AR-unabhängiger cAMP-Anstieg in der Zelle zu der beobachteten Umverteilung von PIST führt. Dies wurde durch die Stimulierung nicht transfizierter HEK293-T Zellen mit 500µM IBMX und 50µM Forskolin untersucht (Abb. 3.15). IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin) ist ein Inhibitor der Phosphodiesterase (PDE), einem Enzym, das den cAMP-Abbau katalysiert. Forskolin stimuliert die Adenylatcyclase. Tatsächlich wurde nach Stimulierung der Zellen mit IBMX und Forskolin die gleiche Umverteilung von PIST beobachtet wie bei Stimulierung von β1AR-exprimierenden Zellen, die wiederum zu seiner Kolokalisierung von PIST mit SNX1 führte. Im Vergleich dazu wurde der Golgi mithilfe des Markerproteins Giantin detektiert (Linstedt und Hauri 1993). Dieses Protein war in nicht-stimulierten Zellen mit PIST kolokalisiert. Nach der Stimulierung mit IBMX und Forskolin war weiterhin ein Teil von PIST mit Giantin kolokalisiert, während der größte Teil nun nicht mehr mit Giantin kolokalisiert und stattdessen breit über die Zelle

verteilt war. Die Verteilung von Giantin in der Zelle schien dagegen von der IBMX/Forskolin-Stimulierung unbeeinflusst zu sein.

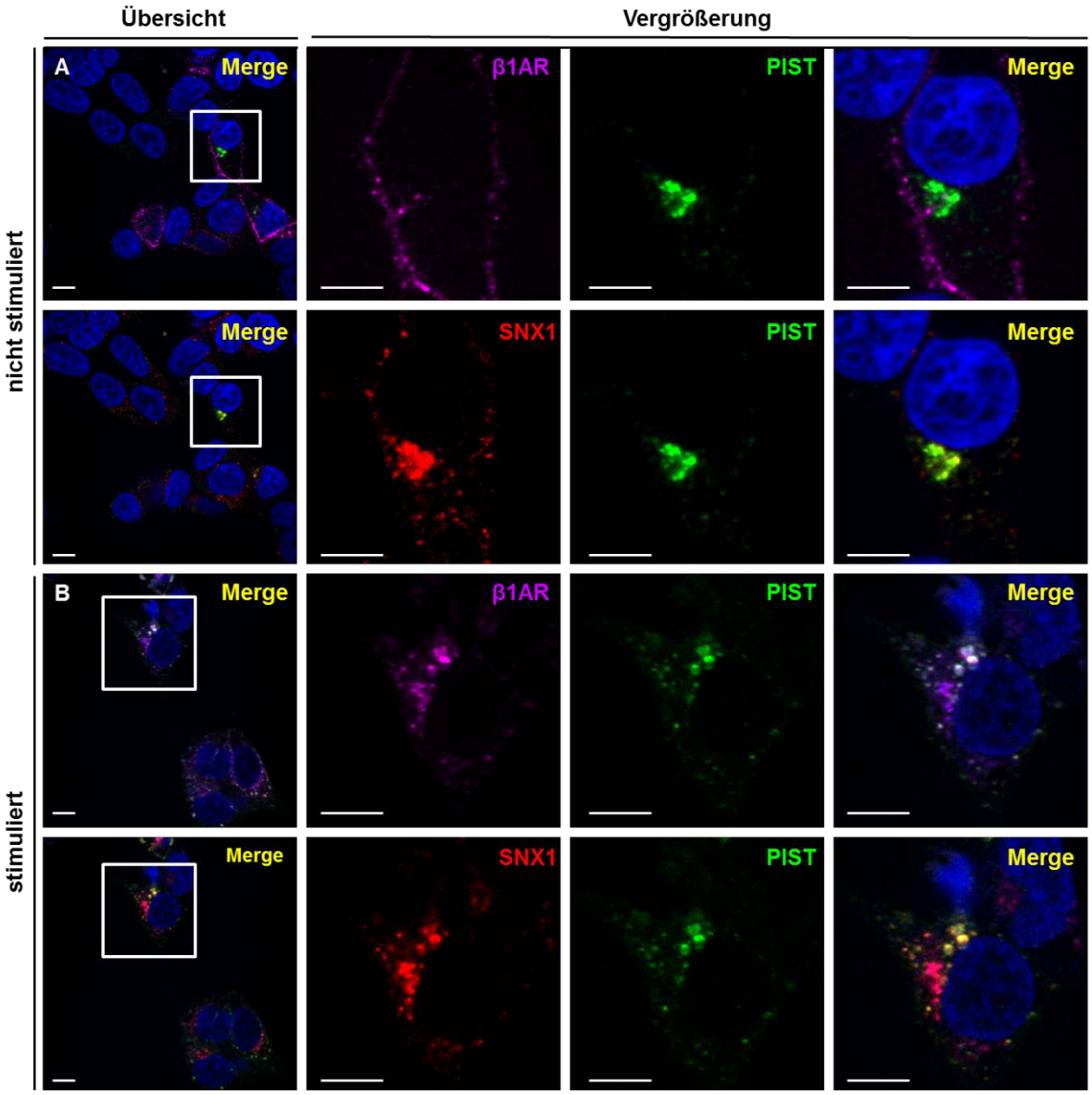

Abbildung 3.14 Nach Stimulierung von β1AR ist PIST mit dem internalisierten Rezeptor und dem Retromer-Protein SNX1 kolokalisiert.

HEK293-T Zellen, die *flag*-β1AR exprimieren, wurden auf Lebendzellmikroskopie-Platten ausgesät. An der Zelloberfläche lokalisierte β1-adrenerge Rezeptoren wurden durch einen Alexa-647 gekoppelten, gegen die *flag*-Markierung gerichteten Antikörper markiert (magenta). Anschließend wurden die Zellen **A** direkt mit 4% PFA fixiert oder **B** für 20 Minuten mit dem Agonisten Isoproterenol stimuliert und dann fixiert. Nun wurden durch Immuncytochemie PIST (grün), sowie SNX1 (rot) angefärbt. In nicht-stimulierten Zellen waren PIST und SNX1 teilweise kolokalisiert in einem perinukleären Kompartiment. In stimulierten Zellen waren beide Proteine breiter über die Zelle verteilt und zu einem Großteil kolokalisiert (gelbe Bereiche). Außerdem war hier PIST mit dem internalisierten Rezeptor stark kolokalisiert (weiße Bereiche; Skalierung: 10µm)

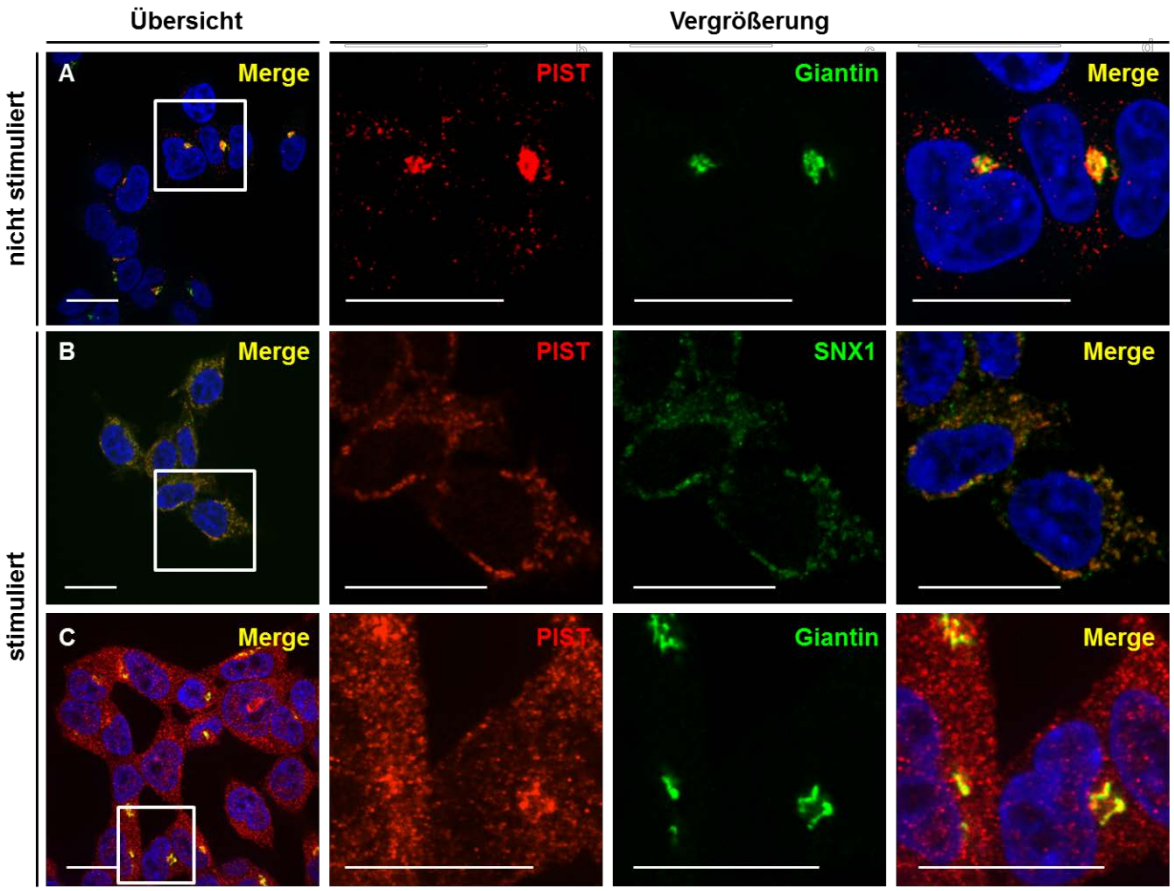

Abbildung 3.15 Nach Stimulierung von HEK293-T Zellen mit IBMX und Forskolin ist PIST breiter über die Zelle verteilt und mit SNX1 kolokalisiert.

HEK293-T Zellen wurden auf Lebendzellmikroskopie-Platten ausgesät. Die Zellen wurden **A** direkt mit 4% PFA fixiert oder **B, C** für 20 Minuten mit 500µM IBMX und 50µM Forskolin stimuliert und anschließend fixiert. Durch Immuncytochemie wurden PIST (rot), sowie die subzellulären Markerproteine Giantin (**A, C**) oder SNX1 (**B**; jeweils grün) gefärbt. In nicht-stimulierten Zellen war PIST mit Giantin stark kolokalisiert. Nach der Stimulierung war PIST deutlich breiter über die Zelle verteilt und nur noch zu einem Teil mit Giantin, jedoch zum Großteil mit SNX1 kolokalisiert (jeweils gelbe Bereiche zeigen Überlagerung von rot und grün an; Skalierung: 10µm)

PIST ist mit dem internalisierten β1AR in den späten Endosomen kolokalisiert und hemmt das Recycling von β1AR zu der Zelloberfläche. Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, ob PIST einen Einfluss auf die Stabilität von β1AR in der Zelle hat. Um die Stabilität des Rezeptors zu bestimmen, wurden HEK293-T Zellen mit Expressionsvektoren für *flag*-β1AR, und zum Vergleich für *flag*-β2AR, sowie für PIST-GFP oder GFP (Kontrolle) transfiziert. Diese Zellen wurden mit 10µg/ml Cycloheximid behandelt um die Proteinbiosynthese zu inhibieren. Nach 30 Minuten wurden die Zellen mit 10µg/ml Isoproterenol stimuliert (t=0) und nach verschiedenen Zeitpunkten jeweils lysiert und durch *Western Blot* analysiert. Die Menge an verbliebenem Rezeptor wurde bestimmt, auf das Haushaltsprotein GAPDH normiert und die

Rezeptormenge zum Zeitpunkt t=0 auf 100% gesetzt (Abb. 3.16). Durch nicht-lineare Regression wurde der Verlauf des Proteinabbaus ermittelt und die Halbwertszeiten der Rezeptoren unter den verschiedenen Bedingungen berechnet. Hierbei zeigte sich, dass die Überexpression von PIST zu einem verzögerten Abbau von β1AR führte. Dies ist im flacheren Kurvenverlauf abzulesen; die Halbwertszeit des Rezeptors stieg entsprechend von 20h auf 53h. Der Abbau von β2AR war hingegen nicht beeinflusst.

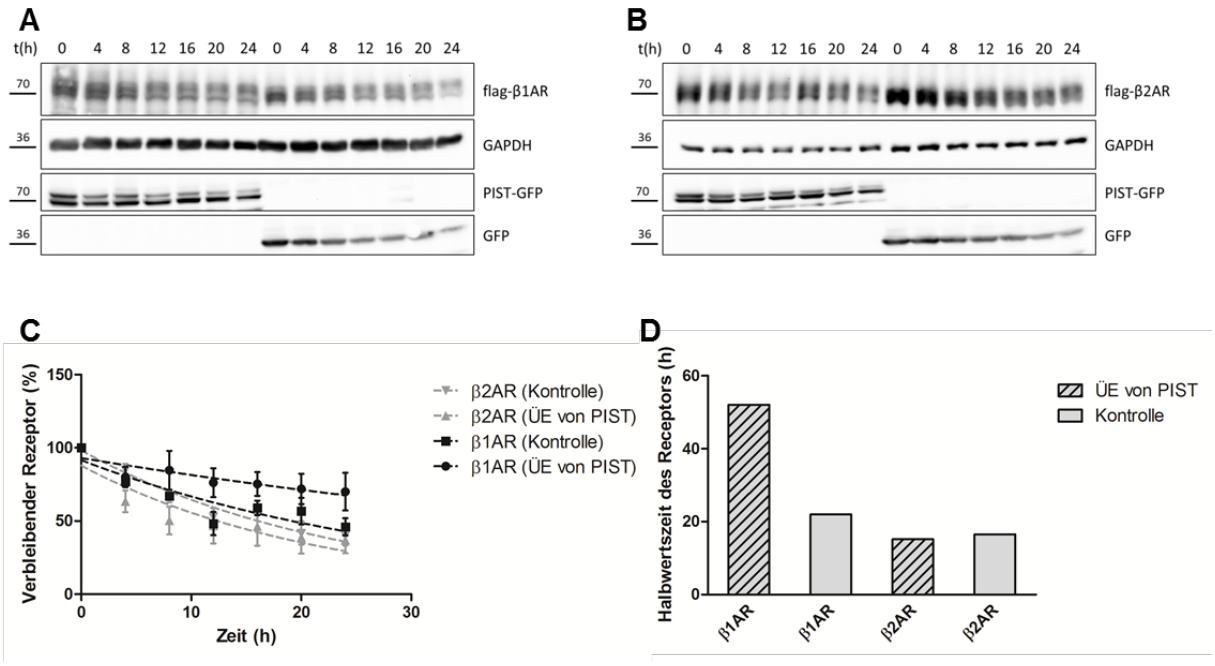

Abbildung 3.16 Bei Überexpression von PIST wird der Abbau des β1AR verzögert.

HEK293-T Zellen, die *flag*-β1AR oder *flag*-β2AR gemeinsam mit PIST-GFP oder GFP (Kontrolle) exprimieren, wurden für 30 Minuten mit Cycloheximid inkubiert und anschließend mit Isoproterenol stimuliert (t=0). **A, B** Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden jeweils Proben lysiert und durch *Western Blot* analysiert. **C** Die Menge an Rezeptoren zu den verschiedenen Zeitpunkten wurde quantifiziert, mithilfe der GAPDH-Signale auf die Zellzahl normiert und der Wert für t=0 auf 100% gesetzt. Eine nicht-lineare Regression wurde durchgeführt (Ein-Phasen-Zerfall, Plateau=0) und **D** die Halbwertszeiten für die Rezeptoren für Kontroll- und PIST-Überexpressionsbedingungen bestimmt.

3.3. Etablierung von Überexpression und *knockdown* von PIST in Neuronen durch Lentiviren

3.3.1. Die Lokalisation von PIST in Neuronen

Um einen Einblick in die subzelluläre Lokalisation von PIST in Neuronen zu bekommen, wurden Neuronen aus den Spinalganglien von Mäusen gewonnen und die endogenen Proteine PIST und zum Vergleich das cis-Golgi-Protein Giantin durch Immuncytochemie

detektiert (Abb. 3.17). Neuronen aus den Spinalganglien eignen sich hierfür besonders gut, da sie stark ausgeprägte Dendriten und dendritische Golgi-Ausläufer haben (Merianda et al. 2009). Die Analyse im konfokalen *Spinning Disc*-Mikroskop zeigte, dass im Soma eine Ansammlung von Strukturen zu finden ist, in denen PIST von Giantin umrahmt wird. Beide Proteine sind auch in den Dendriten zu finden. Auch hier umgibt das Signal für Giantin das Signal für PIST, was auch die Profilanalyse des Querschnitts eines Dendriten zeigt. Bei dieser hohen Auflösung wurde deutlich, dass PIST mit Giantin nicht perfekt kolokalisiert, sondern nur in enger räumlicher Nähe ist, äquivalent zu cis- und trans-Golgi.

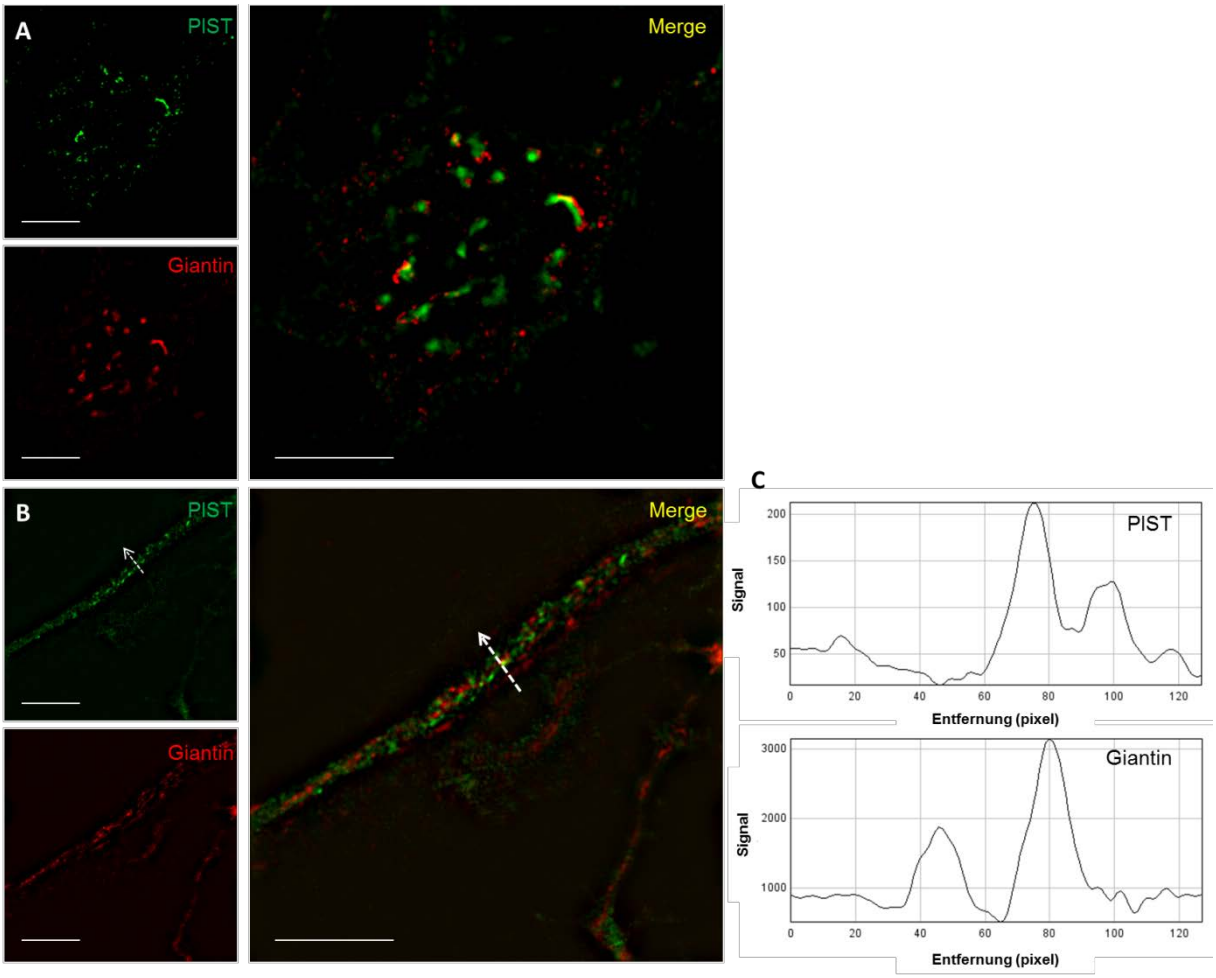

Abbildung 3.17 In Spinalganglion-Neuronen wird PIST sowohl im Soma als auch in Dendriten von Giantin umrahmt.

Neuronen aus Spinalganglien von Mäusen wurden präpariert und mit 4% PFA fixiert. Durch Immuncytochemie wurden die endogenen Proteine PIST (grün) und Giantin (rot) angefärbt. Im *Spinning Disc*-Mikroskop wurden die Färbungen analysiert. **A** Soma eines Neurons **B** Dendriten eines Neurons **C** Mithilfe von ImageJ wurden die Signale über einen linearen Bereich, der einem Querschnitt des Dendriten entspricht, quantifiziert. Sowohl im Soma, als auch im Dendritenquerschnitt wurde PIST von Giantin umgeben. (Skalierung: 5µm)

3.3.2. Lentivirale genetische Modifikation von Neuronen

Um Neuronen in quantitativem Maßstab genetisch zu verändern, reicht die Effizienz diverser Transfektionsmethoden nicht aus. Daher wurden lentivirale Vektoren etabliert, die zur Infektion von Neuronen verwendet werden können und bei der die Infektionsrate um ein Vielfaches höher ist als die Effizienz üblicher Transfektionsmethoden. Hierbei wird die gezielt veränderte virale DNA in das Genom der infizierten Neuronen eingebaut und somit deren genetische Modifikation erreicht.

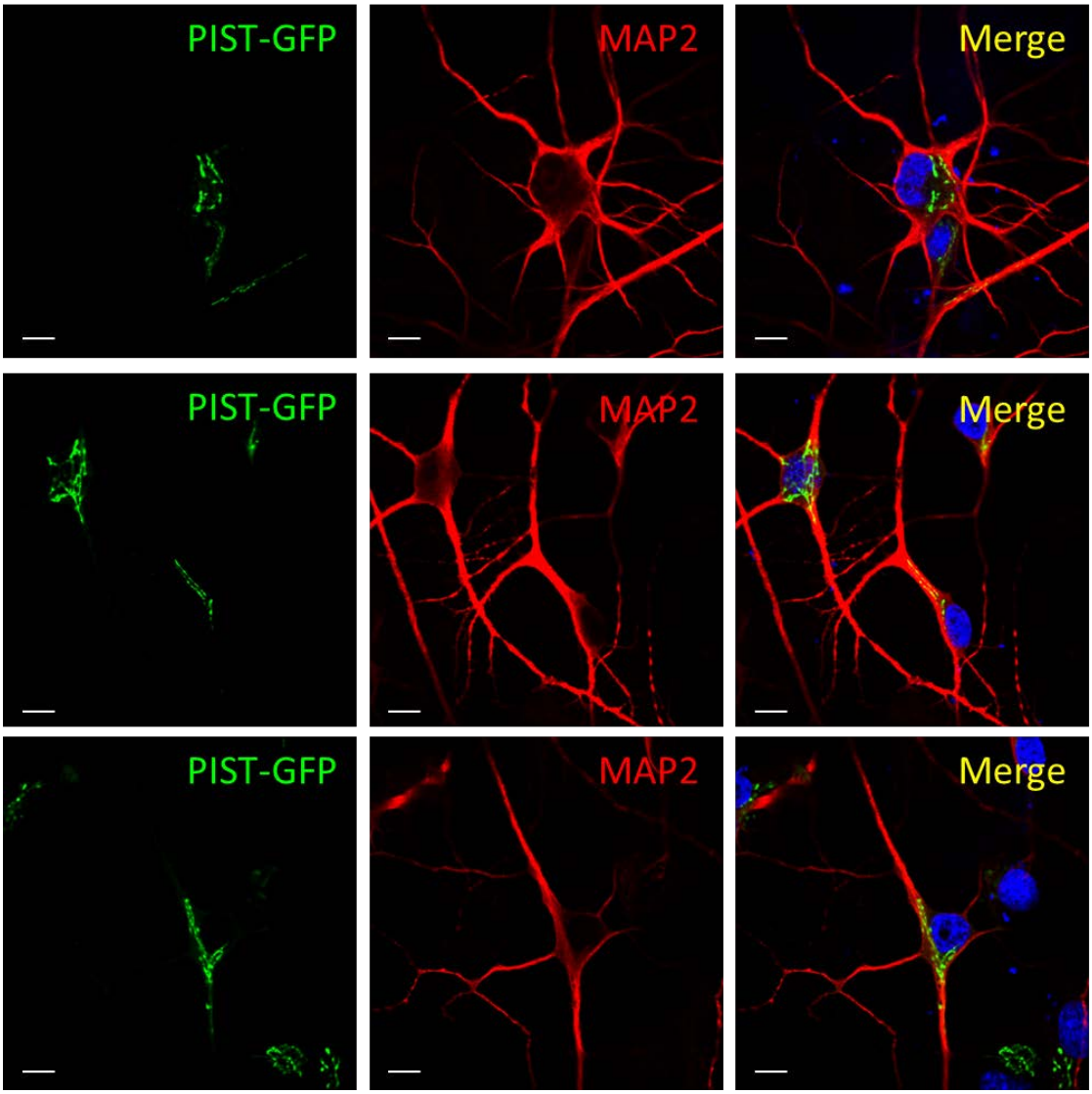

Abbildung 3.18 In infizierten Hippocampus-Neuronen ist PIST-GFP in einer perinukleären Struktur, sowie den Dendriten lokalisiert.

Hippocampus-Neuronenkulturen aus Rattenembryonen wurden an DIV7 mit Lentiviren infiziert, die zur Überexpression von PIST-GFP führen. An DIV14 wurden die Neuronen fixiert und durch Immuncytochemie für den dendritisch lokalisierten Neuronenmarker MAP2 gefärbt (rot). PIST-GFP ist in MAP2-positiven Zellen in einer perinukleären Struktur, sowie den Dendriten lokalisiert. (Skalierung: 5µm)

Für die Überexpression von PIST in Neuronen wurde PIST-GFP in den lentiviralen FUW-Vektor eingebracht. Die viralen Partikel wurden durch HEK293-T Zellen produziert, die mit dem klonierten FUW-Plasmid, sowie mit psPAX2 und pMD2.G transfiziert worden waren.

psPAX2 kodiert für virale Proteine, die für die Verpackung der Lentiviren benötigt werden; pMD2.G kodiert für das VSV-G Protein, welches als virales Hüllprotein die Infektion vieler unterschiedlicher Zelltypen vermittelt (Salmon und Trono 2007). Hippocampus- oder Cortexneuronen wurden aus den Gehirnen von Rattenembryonen kultiviert, an DIV7 infiziert und an DIV14 mit 4% PFA fixiert (Hippocampus-Neuronen) oder mit RIPA-Puffer lysiert (Cortexneuronen). In Abbildung 3.18 sind mit dem PIST-GFP-Überexpressionsvektor infizierte Hippocampus-Neuronen gezeigt, die außerdem für das dendritische Protein MAP2 (rot) angefärbt wurden. Die Analyse erfolgte im konfokalen *Spinning Disc*-Mikroskop. Das überexprimierte PIST-GFP wurde in einer perinukleären Region im Zellkörper, sowie teilweise in Dendriten detektiert.

Weiterhin wurde ein lentiviraler *knockdown* von PIST in Neuronen etabliert. Hierzu wurde das Protokoll nach Brummelkamp et al. (2002) verwendet. Mithilfe des Programmes *Oligoengine* wurden geeignete, gegen PIST gerichtete shRNA-Sequenzen ausgewählt und in den pLVTHM-Vektor kloniert. HEK293-T Zellen wurden analog zum Überexpressions-System mit diesem Vektor gemeinsam mit den Verpackungsvektoren psPAX2 und pMD2.G transfiziert und der so gewonnene PISTsh-Virus für die Infektion von Ratten-Neuronen verwendet.

Auch hier erfolgte die Infektion von Hippocampus- oder Cortex-Neuronen an DIV7 und das Fixieren bzw. die Lyse der Zellen an DIV14. Hier ist als Beispiel der *Western Blot* von lysierten Cortex-Neuronen gezeigt, die mit dem PISTsh- oder einem Kontrollvirus infiziert waren (Abb. 3.19). Der Kontrollvirus exprimierte statt der PIST-shRNA eine zufällige shRNA-Sequenz. Der *knockdown* von PIST durch den PISTsh-Virus führte zu einer Reduktion der PIST-Proteinmenge auf 34%. Ein *knockdown* von PIST in Cortexneuronen durch lentivirale Infektion konnte somit erfolgreich etabliert werden.

Um einen ersten Einblick in die Funktion von PIST im zentralen Nervensystem zu erhalten, wurden verschiedene Proteine analysiert, die hier eine Rolle spielen und durch PIST beeinflusst sein könnten.

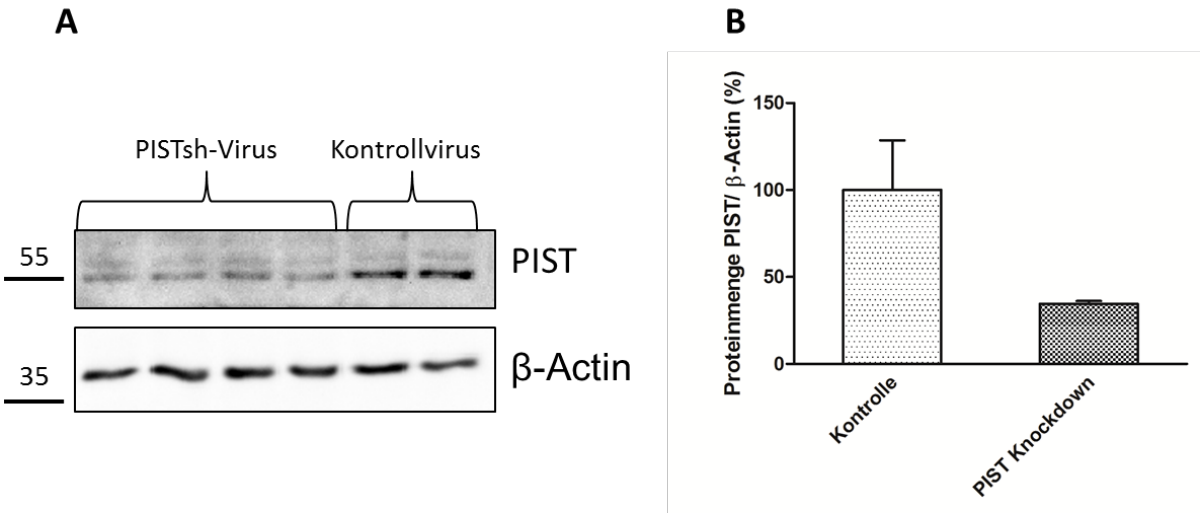

Abbildung 3.19 Durch lentivirale Infektion von Cortex-Neuronen wurde die PIST-Expression effizient mittels RNA-Interferenz herunterreguliert.

A Cortex-Neuronen wurden an DIV7 mit dem PISTsh- bzw. einem Kontrollvirus infiziert, an DIV14 lysiert und durch *Western Blot* analysiert. **B** Die zelluläre Proteinmenge von PIST wurde auf β-Actin normiert und zeigt bei *knockdown* durch PISTsh-Lentivirus eine Verringerung auf 34%.

So interagieren β1AR, Stargazin, NMDA-Rezeptoren, Neuroligin1 und mGluR5 mit PIST. Weiterhin werden AMPA-Rezeptoren durch Stargazin an der Postsynapse verankert.

Daher wurden mit PISTsh-Lentiviren infizierte Cortex-Neuronen lysiert, die zelluläre Menge dieser Proteine durch *Western Blot* Analyse bestimmt und auf das Haushaltsprotein β-Actin normiert (Abb. 3.20). Die Werte für mit Kontrollvirus infizierte Proben wurden auf 100% gesetzt. Für AMPA-Rezeptoren wurde ein Antikörper gegen die Untereinheit GluR1, für NMDA-Rezeptoren gegen die Untereinheit NMDAR1 verwendet. Die Proteinmenge von β1AR, Stargazin, AMPA- und NMDA-Rezeptoren war bei *knockdown* von PIST signifikant erhöht. Die zelluläre Proteinmenge von Neuroligin1 war bei *knockdown* von PIST nicht verändert, von mGluR5 hingegen signifikant reduziert.

Da alle hier analysierten Rezeptoren den MAPK- und den AKT-Signalweg aktivieren, war es weiterhin interessant zu untersuchen, ob die Aktivität dieser Signalwege bei lentiviralem *knockdown* von PIST verändert sind. Dies wurde bestimmt, indem durch *Western Blot* die phosphorylierten und die gesamten Mengen der Proteinkinasen ERK und AKT in den Lysaten ermittelt wurden. Die Quotienten pERK/ERK und pAKT/AKT geben Aufschluss über die Aktivität des MAPK- und des AKT-Signalweges (Abb. 3.21). Die Aktivität beider Proteinkinasen war bei *knockdown* von PIST im Vergleich zu den Kontrollen, die auf 100% gesetzt wurden, signifikant reduziert.

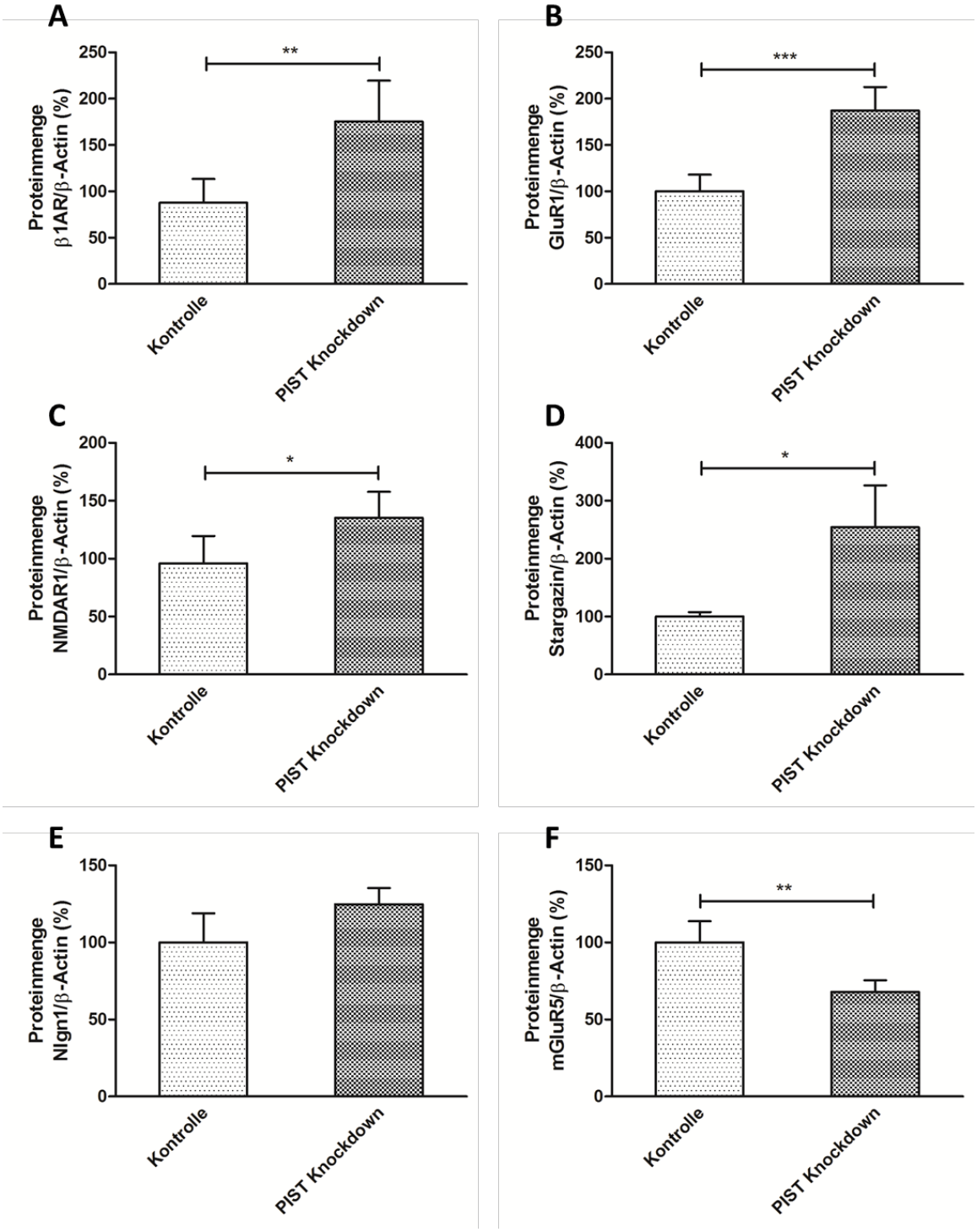

Abbildung 3.20 Der *knockdown* von PIST in Cortexneuronen beeinflusst die Proteinmenge von verschiedenen Interaktionspartnern.

Cortexneuronen aus Rattenembryonen wurden an DIV7 mit PISTsh- oder Kontroll-Lentiviren infiziert und an DIV14 lysiert. Durch *Western Blot* Analyse wurde die Proteinmenge von **A** β1AR **B** GluR1 **C** NMDAR1 **D** Stargazin **E** Neuroligin1 und **F** mGluR5 bestimmt. Der lentivirale *knockdown* führte zu einem signifikanten Anstieg der Gesamtproteinmenge an β1AR, GluR1 und NMDAR1 sowie Stargazin. Die Proteinmenge von Neuroligin1 war nicht verändert; die Proteinmenge von mGluR5 war signifikant reduziert. (ungepaarter t-test, 2 Seiten; N=6; Signifikanzlevel: *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001)

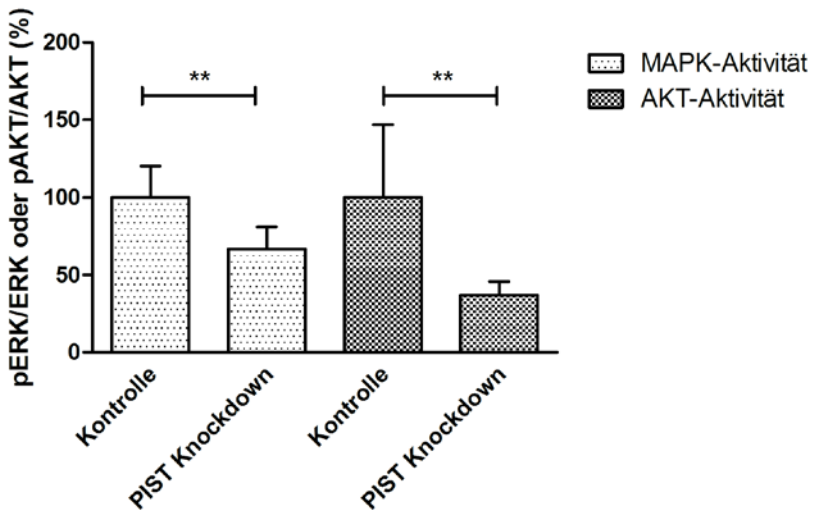

Abbildung 3.21 Die Aktivität der MAP-Kinase ERK und der AKT-Kinase sind bei *knockdown* von PIST reduziert.

An DIV7 mit PISTsh- oder Kontroll-Lentiviren infizierte Cortexneuronen aus Rattenembryonen wurden an DIV14 lysiert. Durch *Western Blot* mit spezifischen Antikörpern wurde jeweils der phosphorylierte und der gesamte Anteil der Proteine ERK und AKT bestimmt. Bei *knockdown* von PIST war der phosphorylierte Anteil beider Proteine signifikant reduziert. (ungepaarter t-test, 2 Seiten; N=3; Signifikanzlevel: *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001)

3.4. Generierung und Analyse einer PIST-*knockout* Mauslinie

Für die Generierung einer *knockout*-Mauslinie für das Protein PIST wurden die kommerziell erhältlichen embryonalen Stammzell-Klone GOPC-B04, GOPC-D03 und GOPC-H08 von der Firma Eucomm genutzt. GOPC ist ein Proteinsynonym für PIST. Diese embryonalen Stammzellen wurden seitens der Firma mit einem *targeting*-Vektor für das Maus-GOPC/PIST-Gen transfiziert und auf das Vorhandensein einer homologen Rekombination im GOPC/PIST-Locus selektioniert. Der *targeting*-Vektor enthielt eine Selektionskassette nach dem *knockout-first*-Prinzip (Abb. 3.22). Der Spleiß-Akzeptor (En2SA) führt dazu, dass das nachgeschaltete lacZ-Gen hinter das zweite Exon auf der mRNA angefügt wird. Ein Stopp-Codon und die folgende Polyadenylierungssequenz (pA) gewährleisten, dass der Rest des Gens nicht mehr abgelesen wird. Stattdessen wird ein verkürztes Protein erzeugt, das aus dem Genprodukt der ersten zwei Exons der kodierten Sequenz von PIST, sowie dem Genprodukt von lacZ, der β-Galaktosidase, besteht.

Abbildung 3.22 Der PIST-*knockout targeting* Vektor.

Der *targeting* Vektor inklusive der *knockout-first* Kassette, die in embryonale Stammzellen zur Generierung von PIST-defizienten Mäusen eingebracht wurde, führt zu einem verkürzten Genprodukt aus den ersten zwei Exons von PIST und der β-Galactosidase.

(https://www.mousephenotype.org; IKMC-Projekt: 93917)

Die bezogenen embryonalen Stammzellen wurden in Blastocysten injiziert und diese von scheinschwangeren Mäusen ausgetragen (durchgeführt von PD Dr. Irm Hermans-Borgmeyer, *Scientific Service Group Transgenic Animals*, ZMNH). Sowohl die embryonalen Stammzellen, als auch die Muttertiere hatten den genetischen Hintergrund C57BL/6N, wobei die Stammzellen einen intakten agouti-Locus trugen, der zu einer entsprechenden Fellfarbe bei den Nachkommen führte.

Die chimären (agouti/schwarze Fellfarbe) Nachkommen wurden mit C57BL/6N-wt Tieren (schwarze Fellfarbe) verpaart und aus je drei dieser Elterngenerationen neue Mauslinien erzeugt. Durch den gleichen genetischen Hintergrund war eine Rückkreuzung nicht nötig und die Vergleichbarkeit von Wildtyp- und PIST-reduzierten Mäusen gewährleistet.

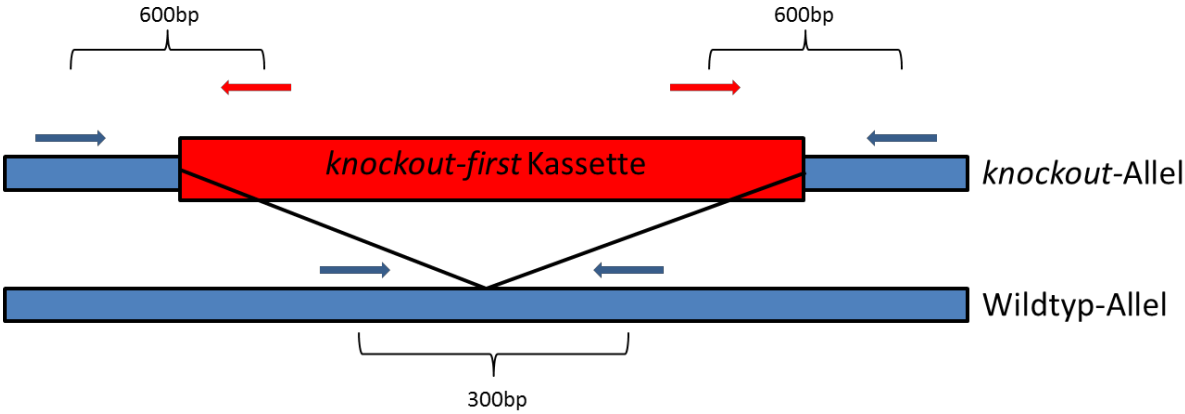

Abbildung 3.23 Der Genotyp von Mäusen der PIST-*knockout*-Linien wurde durch PCR mit genomischer Maus-DNA als Template bestimmt.

Der Genotyp von Mäusen aus den PIST-*knockout*-Linien wurde durch PCR-Analyse bestimmt. Hierbei diente die genomische DNA der Tiere als Template. Durch gezielte Auswahl von Primern, die komplementär zur WT-Sequenz (blaue Pfeile) oder *knockout-first*-Kassette (rote Pfeile) sind, wurde gewährleistet, dass bei inserierter Kassette ein 600bp langes und bei Vorhandensein eines Wildtypallels ein 300bp langes PCR-Produkt erzeugt wurde.

Die Analyse des Genotyps dieser Mäuse erfolgte durch die gezielte sequenzspezifische Auswahl von Primern und Durchführung einer PCR mit genomischer Maus-DNA als Template (Abb. 3.23). Um den Genotyp von Mäusen der PIST-*knockout*-Linien zu bestimmen, wurde Gewebe aus den Schwanzspitzen lysiert und für eine PCR mit gezielt ausgesuchten Primern genutzt. Inserierte *knockout*-Kassetten wurden nachgewiesen, indem ein 600bp-langes PCR-Produkt bei Verwendung eines Primerpaares, das sowohl jeweils *upstream* oder *downstream*, als auch in der Kassette bindet, detektiert wurde. Das Nicht-Vorhandensein der Kassette wurde durch ein weiteres Primerpaar nachgewiesen, das *upstream* und *downstream* der potenziell inserierten Kassette bindet und ein 300bp-langes PCR-Produkt generiert. In Wildtyp-Mäusen wurde nur das 300bp-lange Wildtyp-Produkt, in homozygoten *knockout*-Tieren nur das 600bp-lange *knockout*-Produkt und in heterozygoten Mäusen beide Produkte erwartet.

Aus dem Klon H08 gingen keine lebensfähigen chimären Tiere hervor. Aus der Linie D03 sind Tiere entstanden, die heterozygot für die *knockout-first* Kassette waren. Deren Nachkommen waren jedoch lediglich Wildtyp-Mäuse. Die Linie B04 konnte dagegen erfolgreich etabliert werden. Nach 5 Generationen waren 144 Tiere entstanden, die zu 62% heterozygot für den PIST-*knockout* und zu 37% Wildtyp-Tiere waren. Es wurden lediglich 2 lebensfähige homozygote *knockout*-Tiere nachgewiesen (Abb. 3.24).

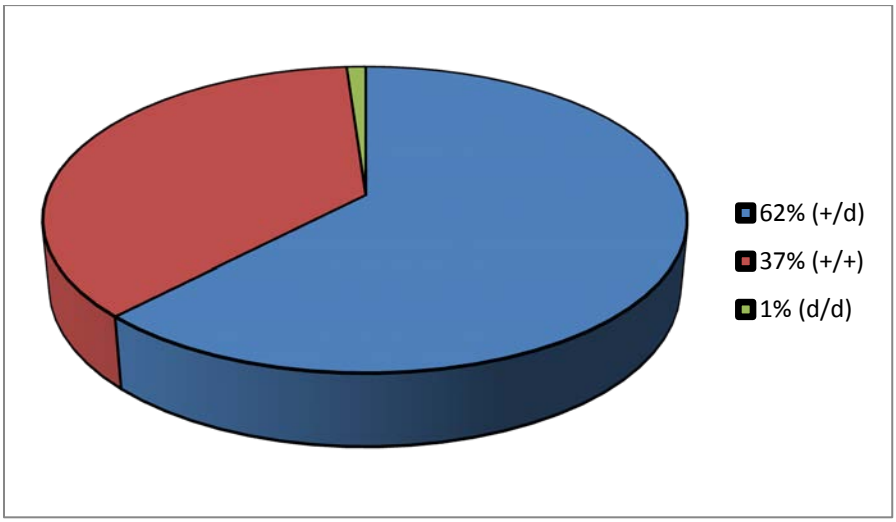

Abbildung 3.24 Die Mauslinie PIST *knockout*-B04 bestand zu 62% aus PIST-heterozygoten, zu 37% aus Wildtyp- und zu 1% aus *knockout*-Tieren.

In der Mauslinie PIST *knockout*-B04 wurden insgesamt 144 Nachkommen aus 5 Generationen auf ihren Genotyp untersucht. 62% hiervon waren heterozygot für den *knockout* von PIST (+/d), 37% waren Wildtyp-Mäuse (+/+). 2 Tiere, und somit 1% waren homozygot für den *knockout* von PIST (d/d).

Die Auswirkungen einer reduzierten Zahl von funktionsfähigen GOPC/PIST-Genen wurden nun anhand der Linie B04 untersucht. Da nur zwei homozygote *knockout*-Mäuse verfügbar waren, wurden hierbei im Wesentlichen heterozygote mit Wildtyp-Mäusen verglichen. Zunächst wurde überprüft, ob sich die Insertion der *knockout-first* Kassette wie erwartet auf die PIST-Proteinmenge auswirkt.

Hierzu wurden Proteinlysate aus dem Hippocampus der Mäuse hergestellt. Mittels *Western Blot* wurde die Menge an PIST ermittelt und auf das Haushaltsprotein β-Actin normiert. In heterozygoten Mäusen wurde eine Reduktion der Proteinmenge von PIST auf ca. 62% detektiert (Abb. 3.25). In den beiden PIST-*knockout* Mäusen wurde kein PIST detektiert.

Das Protein PIST ist an der subzellulären Regulation von einigen wichtigen Membranproteinen glutamaterger Synapsen beteiligt. In diesem Zusammenhang wurde daher die Zusammensetzung der postsynaptischen Dichte im Cortex von heterozygoten Mäusen analysiert. Hierzu wurden jeweils Wildtyp- und heterozygote Mäuse im Alter von 11-13 Wochen mittels CO_2 betäubt und dekapitiert.

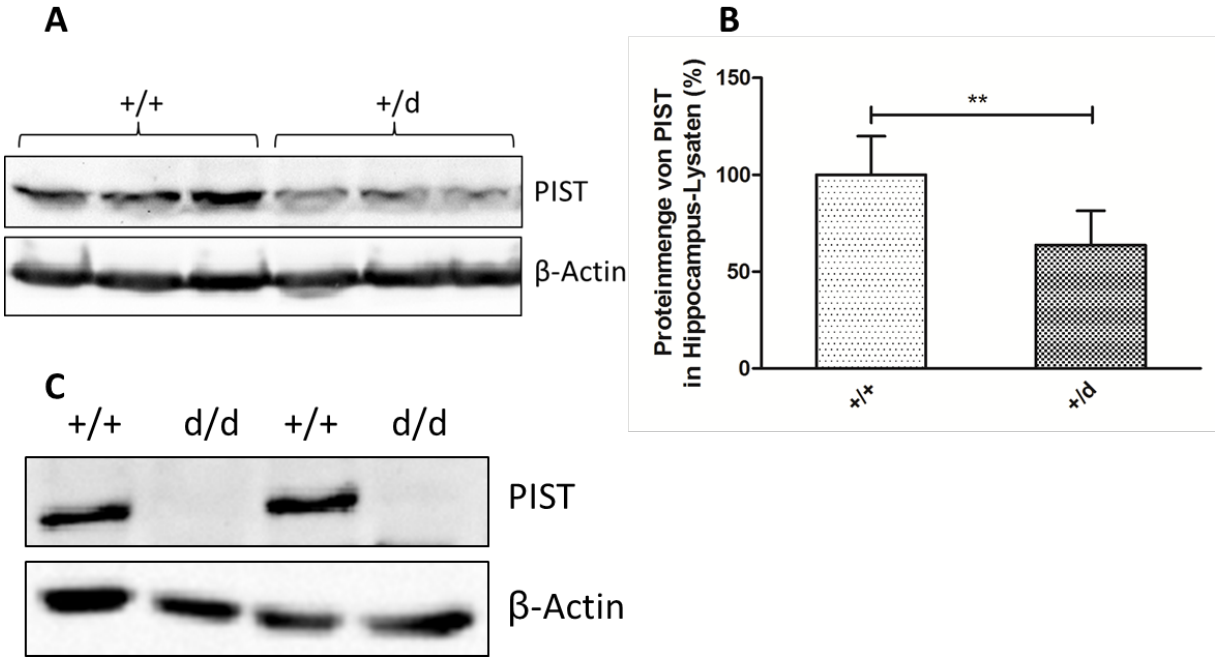

Abbildung 3.25 Die Proteinmenge von PIST ist im Hippocampus von heterozygoten Mäusen auf 62% reduziert. In *knockout*-Mäusen wurde kein PIST detektiert.

A Die Proteinmenge von PIST wurde in Hippocampus-Lysaten von Heterozygoten (+/d) und Wildtyptieren (+/+) durch *Western Blot* Analysen bestimmt. **B** Die Proteinmenge von PIST wurde auf das Haushaltsprotein β-Actin normiert. Die PIST-Proteinmenge war in heterozygoten Tieren im Vergleich zum Wildtyp auf 62% reduziert. **C** In Hippocampus-Lysaten von *knockout*-Mäusen (d/d) wurde kein PIST detektiert. (ungepaarter t-test, 2 Seiten; N=6; Signifikanzlevel: *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001)

Die Cortices wurden isoliert und für eine PSD-Präparation verwendet. Hierbei wurde die geringe Löslichkeit dieses Proteinnetzwerkes ausgenutzt, um es gezielt anzureichern. Postnukleäre Fraktionen wurden als Maß für die Gesamtproteinmenge verwendet. Proteinmengen in den Gesamt- und PSD-Proben wurden durch *Western Blot* analysiert und jeweils auf das Haushaltsprotein β-Actin normiert. Die Werte für die normierten Proteinmengen in Wildtyptieren wurden jeweils auf 100% gesetzt.

Die Relevanz von PIST für AMPA-Rezeptoren in der PSD wurde zuvor bereits beschrieben. AMPA-Rezeptoren wurden in den Proben der PSD-Präparation durch *Western Blot* Analysen detektiert. Hierbei wurde ein gegen die GluR1-Untereinheit gerichteter Antikörper eingesetzt. Die Menge dieser AMPA-Rezeptoruntereinheit war in Gesamtzellfraktionen heterozygoter Tieren leicht erhöht, der Unterschied war jedoch nicht signifikant (Abb. 3.26). In der PSD von PIST-heterozygoten Tieren war die Proteinmenge von AMPA-Rezeptoren hingegen signifikant erhöht.

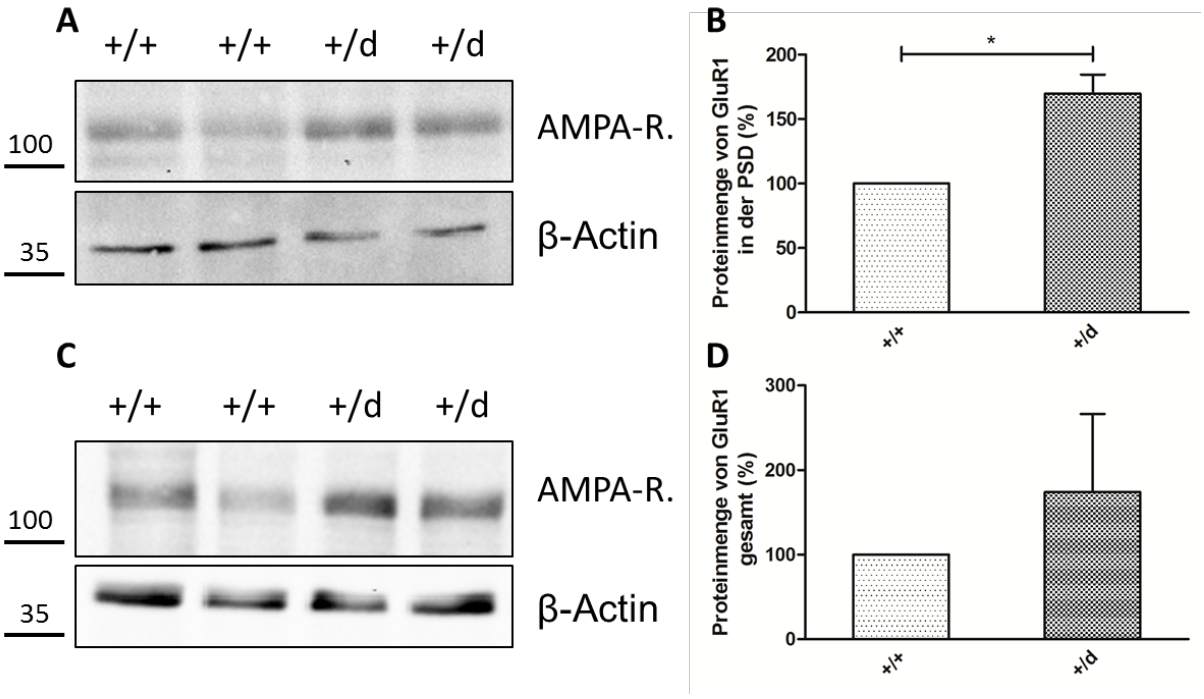

Abbildung 3.26 Die Proteinmenge von AMPA-Rezeptoren in der PSD vom Cortex PIST-heterozygoter Mäusen ist signifikant erhöht.

Die PSD wurde im Verhältnis zu postnukleären Zellfraktionen (gesamt) angereichert und beide Proben durch *Western Blot* analysiert. AMPA-Rezeptoren wurden durch einen Antikörper gegen die Untereinheit GluR1 detektiert und auf β-Actin normiert. **A, B** In der PSD war die Menge an AMPA-Rezeptoren in PIST-heterozygoten Mäusen signifikant erhöht. **C, D** Die Gesamtmenge der AMPA-Rezeptoren im Cortex war erhöht, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant**.** (ungepaarter t-test, 2 Seiten; N=9; Signifikanzlevel: *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001)

β1AR interagiert mit PIST und wie oben beschrieben wurden in dieser Arbeit verschiedene Untersuchungen zu der Wirkung von PIST auf Stabilität und subzelluläre Sortierung von β1AR durchgeführt. Nun wurde die zelluläre Menge von β1AR insgesamt und in der PSD von PIST-heterozygoten Mäusen durch *Western Blot* Analyse bestimmt (Abb. 3.27). Die gesamtzelluläre Proteinmenge war im Cortex von PIST-heterozygoten Mäusen nicht verändert. In der PSD von PIST-heterozygoten Mäusen war β1AR stärker angereichert als in Wildtypmäusen; dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

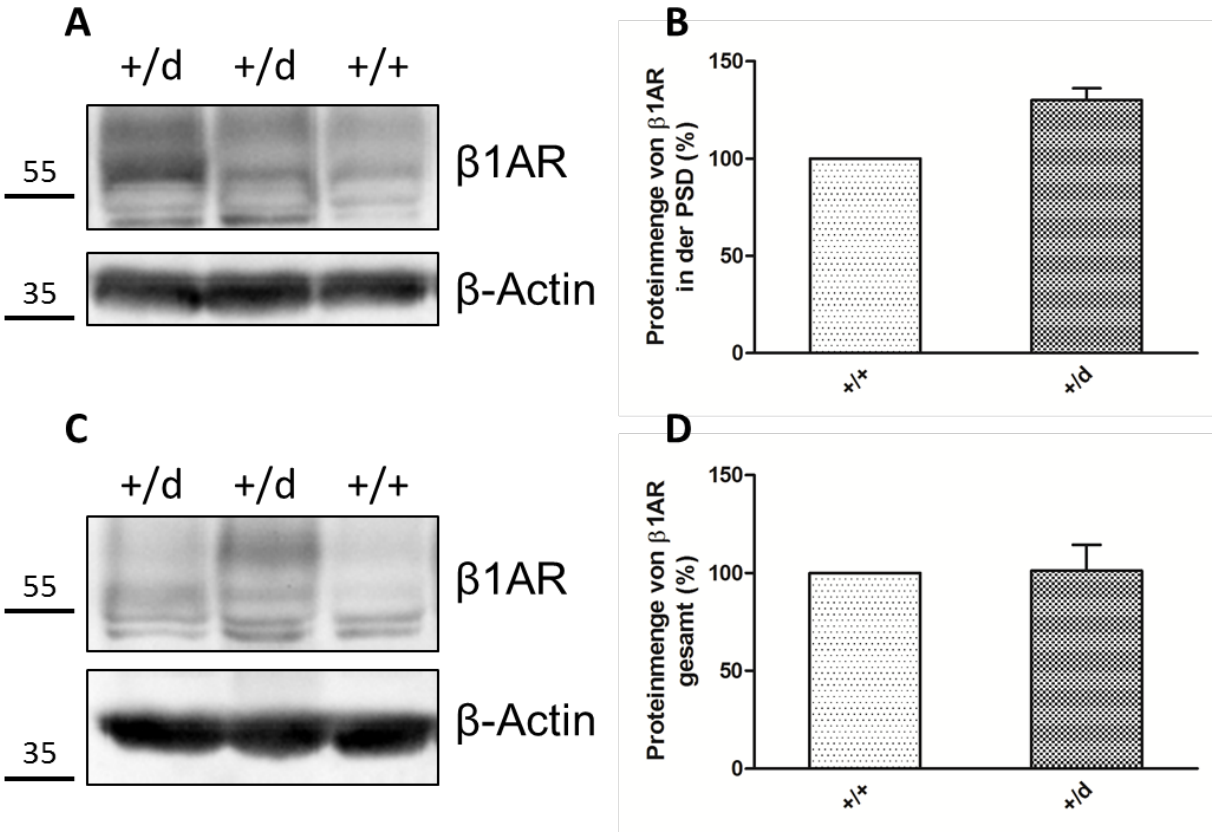

Abbildung 3.27 Die Menge von β1AR ist weder im gesamten Cortex, noch in der PSD von PIST-heterozygoten Mäusen signifikant verändert.

Die PSD von PIST-heterozygoten Mäusen wurde im Vergleich zur gesamtzellulären Proteinmenge angereichert und beide Proben durch *Western Blot* analysiert. Die Proteinmenge von β1AR wurde auf das Haushaltsprotein β-Actin normiert. **A, B** In der PSD von PIST-heterozygoten Mäusen war β1AR stärker angereichert; der Unterschied war aber nicht signifikant. **C, D** Die Gesamtproteinmenge von β1AR im Cortex von PIST-heterozygoten Mäusen war nicht verändert. (ungepaarter t-test, 2 Seiten; N=6)

Der metabotrope Glutamat-Rezeptor mGluR5 interagiert ebenfalls mit PIST. Die *Western Blot* Analyse des Cortexes von PIST-heterozygoten Mäusen zeigte, dass weder die Gesamtproteinmenge von mGluR5, noch die Menge in der postsynaptischen Dichte in PIST-heterozygoten Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen verändert war (Abb. 3.28).

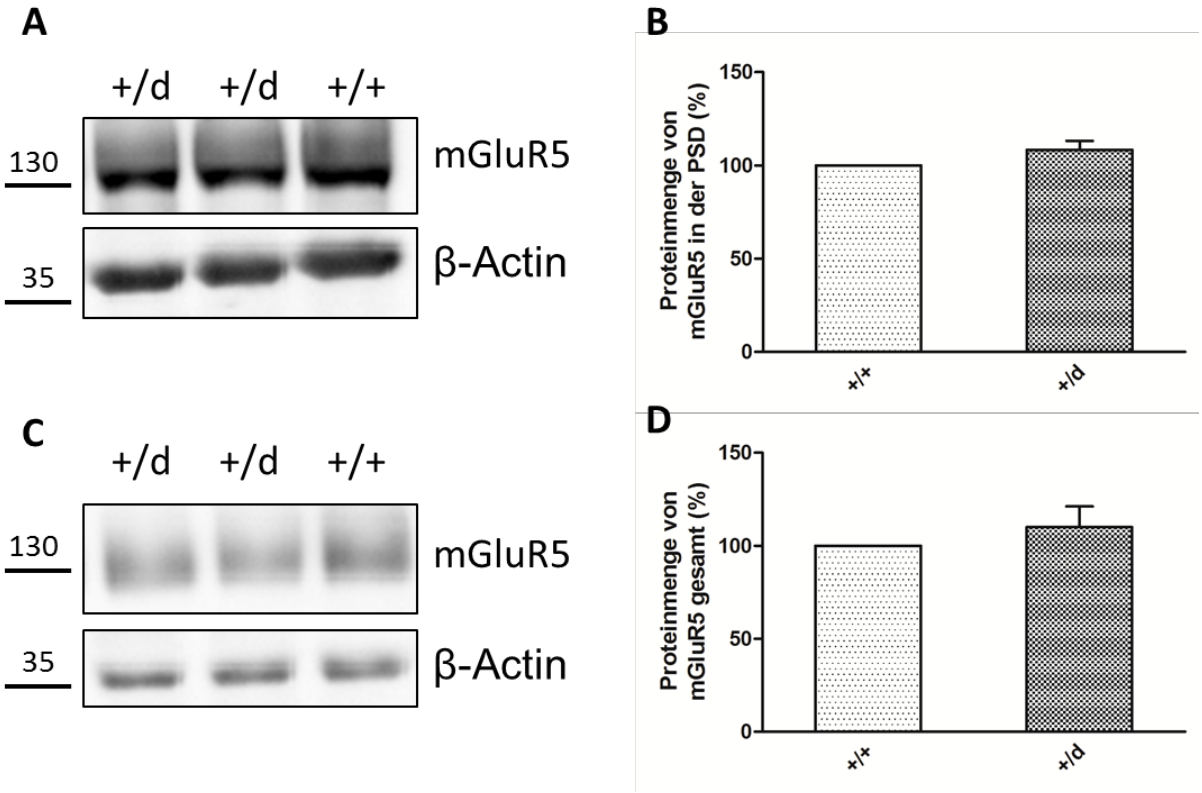

Abbildung 3.28 In heterozygoten Mäusen ist die PSD- und gesamte Proteinmenge von mGluR5 nicht verändert.

PSD- und Gesamtzelluläre Proben von PIST-heterozygoten Mäusen wurden durch *Western Blot* Analyse auf die Proteinmenge von mGluR5 getestet und auf β-Actin normiert. **A, B** Weder in der PSD **C, D** noch in der Gesamtzellfraktion wurde ein Unterschied in der Proteinmenge von mGluR5 von PIST-heterozygoten Mäusen zu Wildtyp-Mäusen festgestellt. (ungepaarter t-test, 2 Seiten; N=6)

Neuroligin1 ist ein Protein der PSD, das ebenfalls direkt mit PIST interagiert. Die Proteinmenge von Neuroligin1 wurde in der PSD und in der gesamten Zelle bestimmt (Abb. 3.29). Eine *Western Blot* Analyse zeigte, dass die Gesamtproteinmenge in PIST-heterozygoten Mäusen nicht verändert war. In der PSD war Neuroligin1 dagegen bei PIST-heterozygoten Mäusen signifikant stärker angereichert als in Wildtyp-Mäusen.

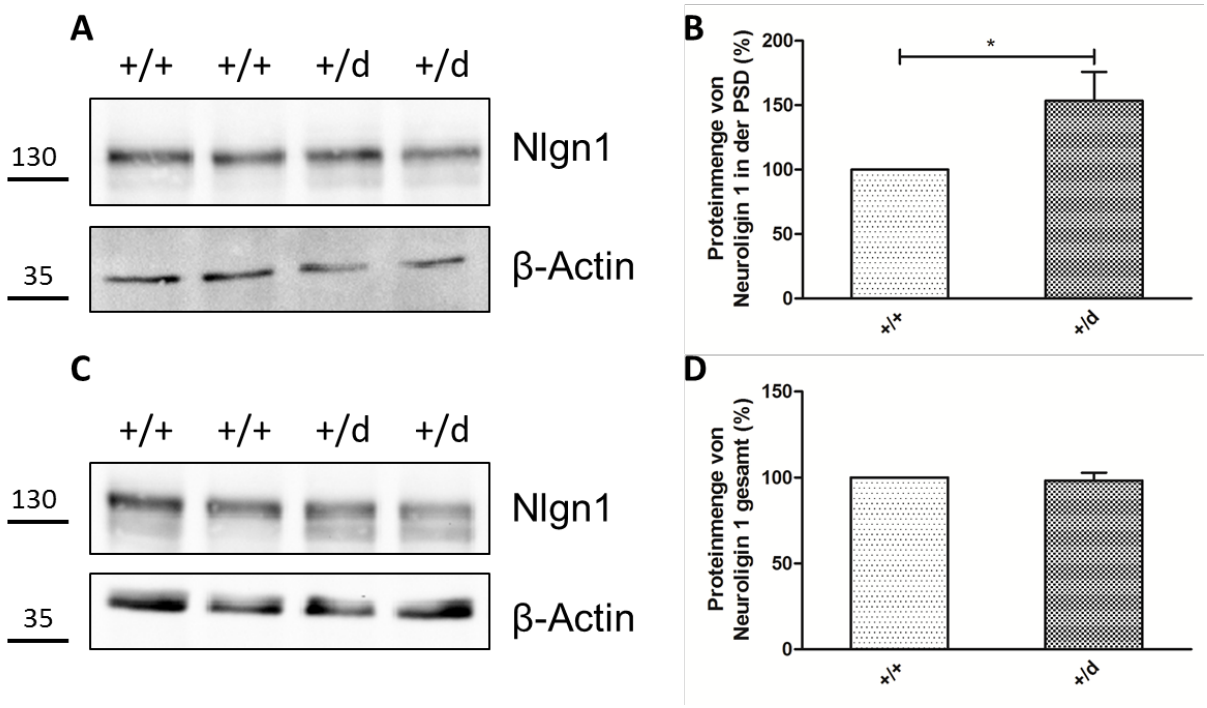

Abbildung 3.29 Neuroligin1 ist in PIST-heterozygoten Mäusen stärker in der PSD angereichert als in Wildtyp-Mäusen.

Die PSD von PIST-heterozygoten und Wildtyp-Mäusen wurde unter Ausnutzung derer geringeren Löslichkeit angereichert. Durch *Western Blot* Analyse wurde die Proteinmenge von Neuroligin1 in der gesamten Zelle und in der PSD erfasst. **A, B** In der PSD von PIST-heterozygoten Mäusen wurde signifikant mehr Neuroligin1 detektiert als bei Wildtyp-Mäusen. **C, D** Die gesamte Proteinmenge von Neuoligin1 war nicht verändert. (ungepaarter t-test, 2 Seiten; N=6; Signifikanzlevel: *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001)

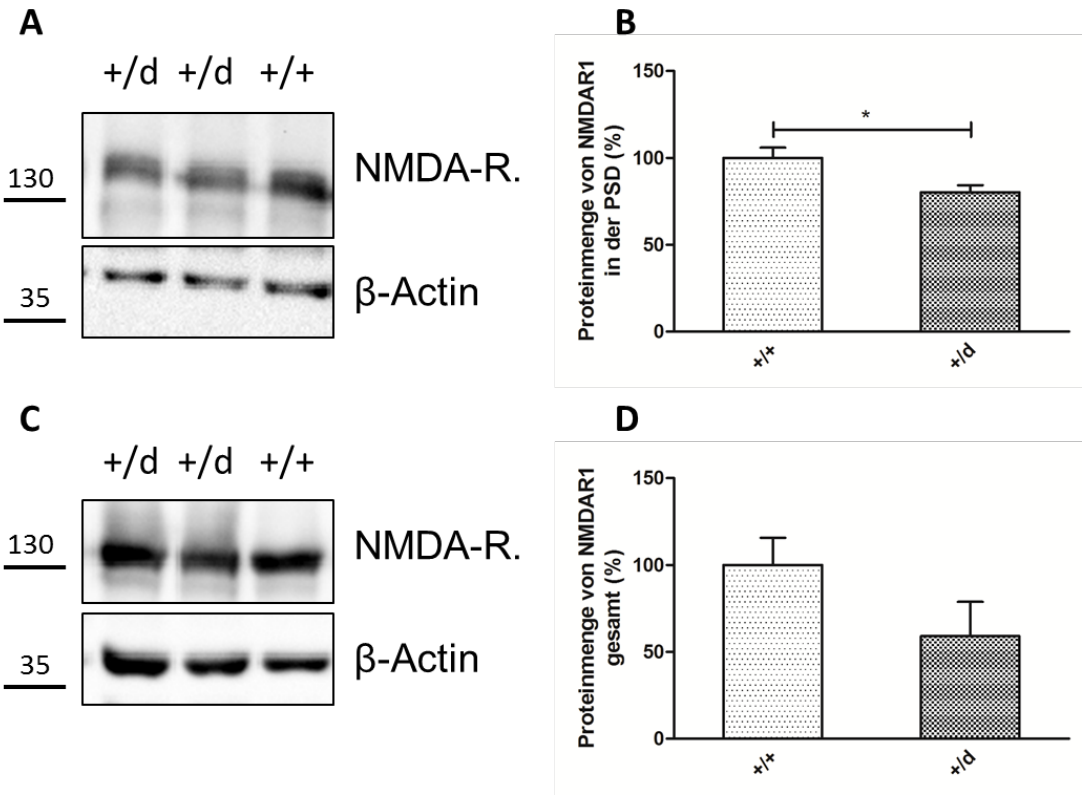

Abbildung 3.30 In der PSD von PIST-heterozygoten Mäusen sind signifikant weniger NMDA-Rezeptoren detektierbar als in Wildtyp-Mäusen.

Die PSD von PIST-heterozygoten und Wildtyp-Mäusen wurde angereichert. Gesamtprotein- und PSD-Proteinmengen von NMDA-Rezeptoren wurden durch *Western Blot* Analyse erfasst. **A, B** In der PSD von PIST-heterozygoten Mäusen wurde signifikant weniger NMDA-Rezeptor detektiert als in Wildtyp-Mäusen. **C, D** Die gesamte Proteinmenge von NMDA-Rezeptoren war in PIST-heterozygoten Mäusen reduziert; der Unterschied war jedoch nicht signifikant. (ungepaarter t-test, 2 Seiten; N=3; Signifikanzlevel: *$p \leq 0{,}05$; **$p \leq 0{,}01$; ***$p \leq 0{,}001$)

Weiterhin wurden die gesamte und die in der PSD lokalisierte Proteinmenge der NMDA-Rezeptoruntereinheit NMDAR1 in PIST-heterozygoten und in Wildtyp-Mäusen bestimmt (Abb. 3.30). Die gesamte Proteinmenge war reduziert, aber der Unterschied war nicht signifikant. In der PSD von PIST-heterozygoten Mäusen wurden signifikant weniger NMDA-Rezeptoren detektiert als in Wildtyp-Mäusen.

Zwei homozygote PIST-*knockout*-Mäuse wurden erhalten. Diese wurden ebenfalls für eine PSD-Präparation des Cortexes verwendet und die Proteinmenge von AMPA- und NMDA-Rezeptoren, Neuroligin1, mGluR5 und β1AR insgesamt und in der PSD durch *Western Blot* Analyse bestimmt (Abb. 3.31). Außerdem wurden Hippocampus-Lysate hergestellt und ebenfalls analysiert.

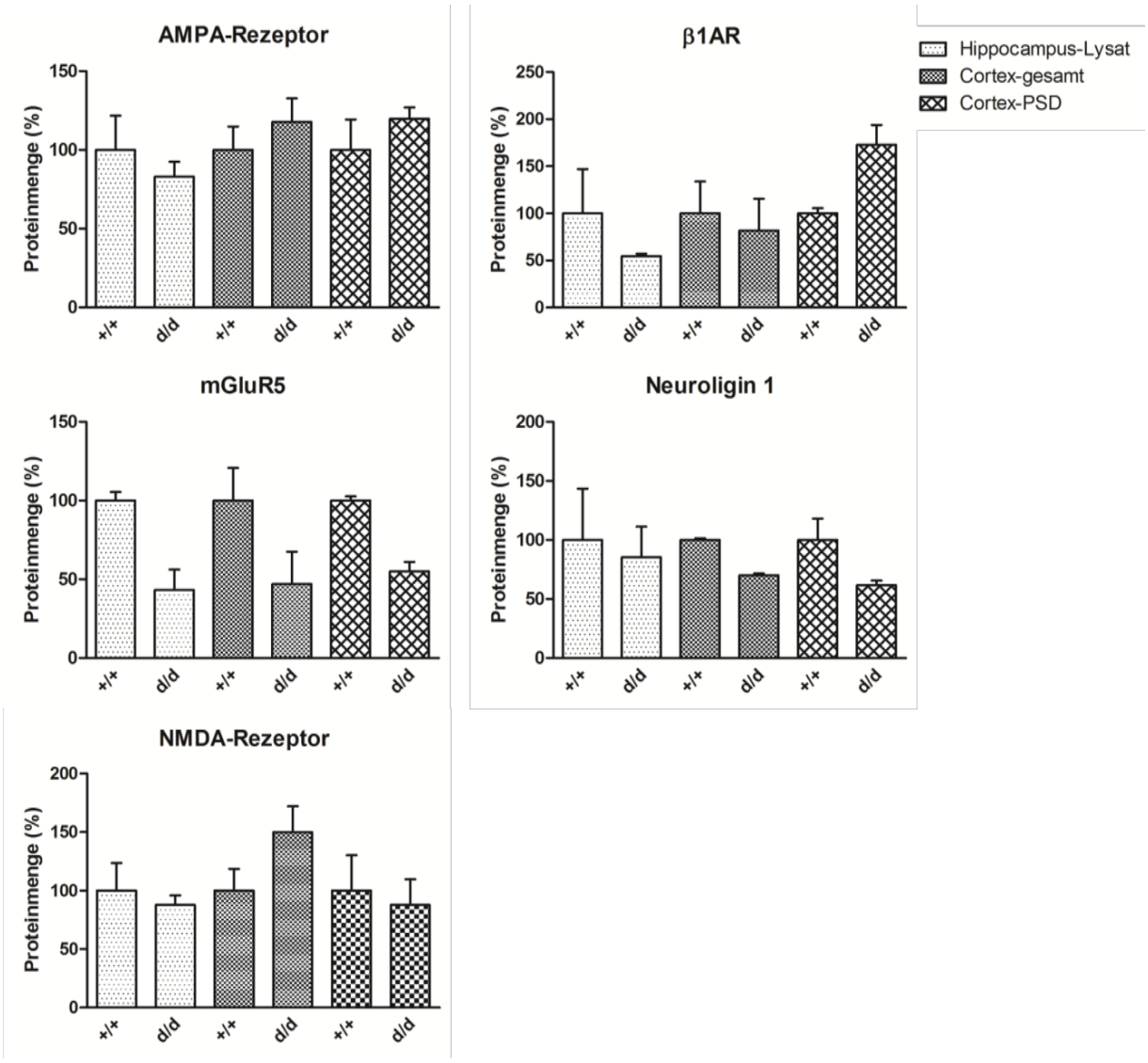

Abbildung 3.31 Die Proteinmenge verschiedener Interaktionspartner ist insgesamt und in der PSD von PIST-*knockout* Mäusen verändert.

Die Proteinmenge von AMPA-Rezeptoren (Untereinheit GluR1), β1AR, mGluR5, Neuroligin1 und NMDA-Rezeptoren (Untereinheit NMDAR1) wurde in Hippocampus-Lysaten und in der gesamten Zelle, sowie in der PSD vom Cortex von zwei PIST-*knockout* und zwei Wildtyp-Mäusen bestimmt und jeweils auf β-Actin normiert. Alle Proteinmengen waren im Hippocampus-Lysat von *knockout*-Mäusen mehr oder weniger deutlich reduziert. Die Mengen von Neuroligin1 und mGluR5 waren sowohl in Gesamtfraktionen, als auch in der PSD vom Cortex von *knockout*-Mäusen verringert. AMPA-Rezeptoren, sowie β1AR waren dagegen in der PSD von *knockout*-Mäusen verstärkt angereichert. Die Menge von NMDA-Rezeptoren war im Cortexgewebe von *knockout*-Mäusen deutlich erhöht, in der PSD dagegen kaum verändert. Die Durchführung von statistischen Tests war nicht möglich, da nur zwei *knockout*-Mäuse für diese Analyse zur Verfügung standen.

Dabei zeigte sich, dass alle diese Proteinmengen in den Hippocampus-Lysaten von PIST-*knockout*-Mäusen mehr oder weniger deutlich reduziert waren. In der Gesamtfraktion, wie auch in der PSD vom Cortex von *knockout*-Mäusen waren die Proteinmengen von Neuroligin1 und mGluR5 verringert. AMPA-Rezeptoren und β1AR wurden hingegen in der

PSD von *knockout*-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen verstärkt detektiert. NMDA-Rezeptoren waren im gesamten Cortex erhöht, in der PSD dagegen kaum verändert. Da nur zwei *knockout*-Mäuse analysiert werden konnten, war die Durchführung eines Signifikanztests mit diesen Daten nicht möglich.

Da mehrere Glutamatrezeptoren durch PIST beeinflusst werden, ist neben der Proteinmenge vor allem die Aktivität verschiedener Signalwege in PIST-reduzierten Mäusen interessant. Um zu prüfen, ob die Aktivität des ras/raf/MAPK-Signalweges verändert ist, wurden Hippocampus-Lysate von heterozygoten- und Wildtyp-Mäusen im *Western Blot* analysiert und die Menge der phosphorylierten Proteinkinase ERK in Relation zur Gesamtproteinmenge von ERK bestimmt (Abb. 3.32). Dabei zeigte sich, dass die Aktivität der Proteinkinase ERK in heterozygoten Mäusen deutlich reduziert ist.

Neben dem ras/raf/MAPK-Signalweg spielt der AKT-Signalweg eine wichtige Rolle in der zellulären Signaltransduktion. Die Aktivität dieses Signalweges wurde ebenfalls durch *Western Blot* Analyse von Hippocampus-Lysaten untersucht. Durch spezifische Antikörper wurde sowohl die Menge an phosphoryliertem- wie auch die gesamte Proteinmenge von AKT bestimmt. Der Quotient aus phosphoryliertem- zu Gesamt-AKT spiegelt die Aktivität des Signalweges wider (Abb. 3.33). Die Aktivität der Proteinkinase AKT war in PIST-heterozygoten Mäusen auf etwa 50% reduziert.

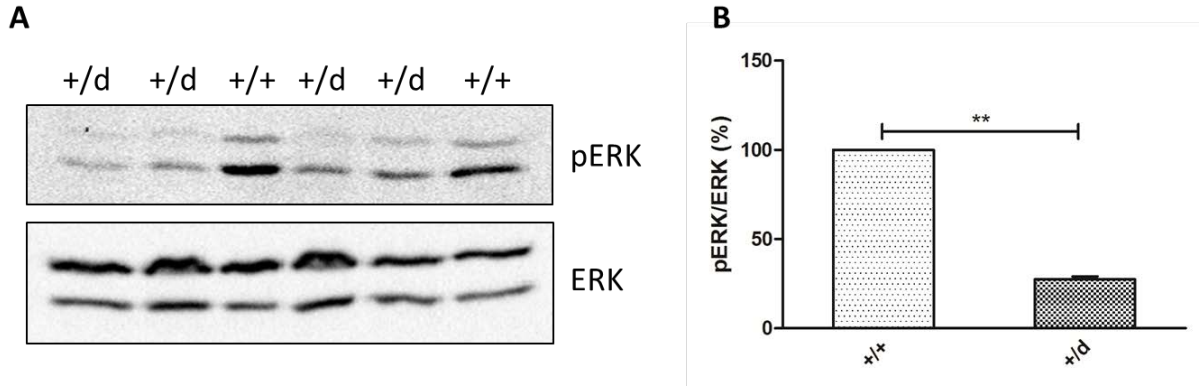

Abbildung 3.32 Der phosphorylierte Anteil der MAP-Kinase ERK ist im Hippocampus von PIST-heterozygoten Mäusen drastisch reduziert.

A Hippocampus-Lysate von PIST-heterozygoten und Wildtypmäusen wurden im *Western Blot* analysiert und **B** die Aktivität der MAP-Kinase ERK durch das Verhältnis der phosphorylierten zur gesamten Menge von ERK bestimmt. Die Aktivität von ERK war in PIST-heterozygoten Mäusen stark reduziert. (ungepaarter t-test, 2 Seiten; N=5; Signifikanzlevel: *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001)

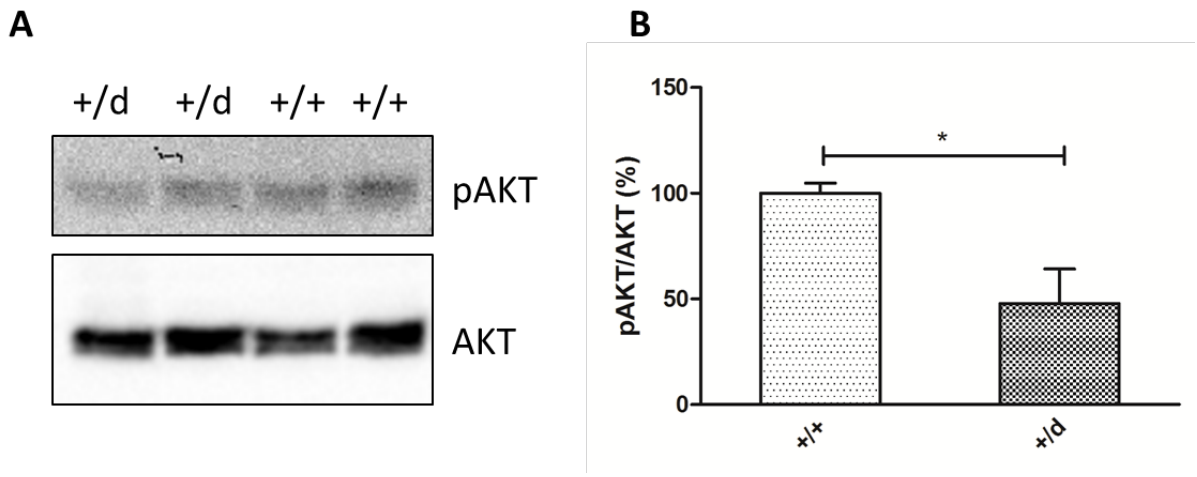

Abbildung 3.33 Die Aktivität der Proteinkinase AKT ist in PIST-heterozygoten Mäusen auf etwa 50% reduziert.

A Hippocampus-Lysate wurden durch *Western Blot* Analyse auf die phosphorylierte und die gesamte Proteinmenge der Kinase AKT getestet. **B** Der Quotient pAKT/AKT ist ein Maßstab für die Aktivität des AKT-Signalweges. Der phosphorylierte Anteil von AKT war in PIST-heterozygoten Mäusen signifikant reduziert. (ungepaarter t-test, 2 Seiten; N=3; Signifikanzlevel: *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001)

Die Aktivität dieser Signalwege wurde ebenso für die beiden untersuchten homozygoten *knockout*-Mäuse bestimmt (Abb. 3.34). Hierzu wurde analog zu den heterozygoten Mäusen durch *Western Blot* Analyse die Proteinmenge der phosphorylierten Proteine (pERK und pAKT) bestimmt und auf die Gesamtmengen dieser Proteine (ERK und AKT) normiert. Die Aktivität beider Proteinkinasen war in homozygoten *knockout*-Mäusen deutlich reduziert.

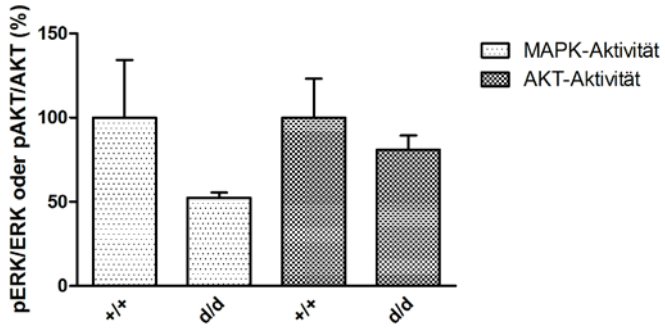

Abbildung 3.34 Die Aktivität der Proteinkinasen ERK und AKT ist in homozygoten PIST-*knockout*-Mäusen reduziert.

Die Aktivität der Proteinkinasen ERK und AKT wurde in Hippocampus-Lysaten von Wildtyp-, sowie den beiden homozygoten *knockout*-Mäusen durch *Western Blot* Analyse bestimmt. Hierzu wurden Antikörper eingesetzt, die jeweils nur die phosphorylierte Form oder alle Formen der Proteine ERK und AKT erkennen. Der Quotient der phosphorylierten- zur Gesamtmenge von ERK bzw. AKT wurde als Maß für die Aktivität der jeweiligen Kinase berechnet. Die Aktivität von ERK ist in PIST-*knockout*-Mäusen auf 52%, die Aktivität von AKT auf 81% reduziert.

PIST ist auch in vielen nicht-neuronalen Geweben exprimiert; ein weiteres Protein, das eine wichtige physiologische Funktion erfüllt und mit PIST interagiert, ist TUG. Dieses Protein kooperiert mit PIST, um den Glukosetransporter Glut4 am Golgi-Apparat von Adipocyten und Muskelzellen zu verankern. Die in der Literatur beschriebene Beobachtung, dass bei Verlust von PIST der Blutglukosespiegel von Mäusen durch verstärkten Transport von Glut4 zur Zelloberfläche reduziert ist (Löffler et al. 2013), wurde im Zuge dieser Arbeit ebenfalls geprüft. Hierzu wurden Mäuse für 5 Stunden ohne Nahrung gehalten, anschließend mit CO_2 betäubt und der Glukosegehalt im Blut bestimmt (Abb. 3.35). Dabei erwies sich, dass in PIST-heterozygoten, wie auch in PIST-defizienten Mäusen, der Blutglukosespiegel tatsächlich reduziert war.

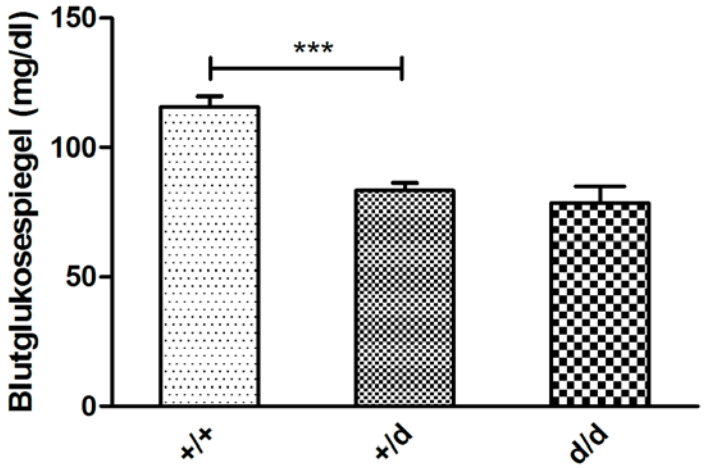

Abbildung 3.35 In PIST-heterozygoten und PIST-*knockout* Mäusen ist der Blutglukosespiegel reduziert.

Der Glukosespiegel im Blut von Wildtyp-, PIST-heterozygoten und PIST-*knockout* Mäusen wurde nach 5 Stunden Nahrungsentzug und unter Betäubung gemessen. Der Glukosegehalt im Blut von PIST-heterozygoten Mäusen war im Vergleich zu Wildtyp-Tieren signifikant reduziert. Der Blutglukosespiegel von PIST-knockout-Mäusen war auf etwa das gleiche Level reduziert wie in heterozygoten Tieren, ein statistischer Test war hier aufgrund von zu wenig analysierbaren Tieren nicht möglich. (ungepaarter t-test, 2 Seiten; N=7; Signifikanzlevel: *$p \leq 0{,}05$; **$p \leq 0{,}01$; ***$p \leq 0{,}001$)

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle des PDZ-Domänenproteins PIST bei der subzellulären Sortierung von Neurotransmitterrezeptoren untersucht. Hierbei wurde zum einen die Funktion von PIST für einen spezifischen Interaktionspartner am Beispiel des β1-adrenergen Rezeptors genauer analysiert, zum anderen wurde die Rolle von PIST im zentralen Nervensystem durch die Betrachtung verschiedener Interaktionspartner in PIST-reduzierten Systemen beleuchtet.

4.1. Die Rolle von PIST bei der subzellulären Sortierung des β1-adrenergen Rezeptors

Die Rolle von PIST bei der subzellulären Sortierung von Membranproteinen wurde anhand des β1-adrenergen Rezeptors untersucht. β1AR ist als Modellprotein besonders gut geeignet, da dieser Rezeptor in verschiedenen Organen wie Gehirn, Lunge, Leber und Herz exprimiert ist und hier wichtige physiologische Funktionen erfüllt (Jaber et al. 1996). In experimenteller Hinsicht ist ein Vorteil von β1AR die Vergleichsmöglichkeit mit β2AR. Dieser Rezeptor zeigt ein sehr ähnliches gewebespezifisches Expressionsmuster und ist durch den gleichen Agonisten, Isoproterenol, stimulierbar (Hanson und Linas 1995). Im Gegensatz zu β1AR interagiert er jedoch nicht mit PIST. Dies ermöglicht in den Experimenten β2AR als Negativkontrolle zu betrachten und so zu überprüfen, ob beobachtete Effekte auf β1AR spezifisch auf die Interaktion mit PIST zurückzuführen sind.

Um einen ersten Einblick in die Rolle von PIST bei der anterograden Sortierung von β1AR zu bekommen, wurde die Menge des Rezeptors an der Zelloberfläche unter verschiedenen Bedingungen ermittelt. Dabei zeigte sich, dass die Überexpression von PIST die Menge von β1AR an der Zelloberfläche signifikant verringert. Auf die Menge von β2AR an der Zelloberfläche hatte hingegen die Überexpression von PIST keinen Einfluss. Die gesamtzellulären Proteinmengen der Rezeptoren waren jeweils durch Überexpression der PDZ-Domänenproteine nicht signifikant verändert (Daten nicht gezeigt). Diese Daten bestätigen die Beobachtungen von He et al. (2004), die zeigten, dass β1AR durch PIST in der Zelle zurückgehalten wird. Dieser Effekt konnte im Rahmen dieser Arbeit auch dahingehend

bestätigt werden, dass die Menge von β1AR an der Zelloberfläche bei *knockdown* von PIST erhöht ist. Bei Koexpression waren PIST und β1AR in einem großen perinukleären Kompartiment kolokalisiert. Hierbei handelt es sich vermutlich um das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN), da in der Literatur und auch in dieser Arbeit PIST im Wesentlichen als dort lokalisiertes Protein bekannt ist und der Golgi-Apparat in HEK293-T Zellen perinukleär lokalisiert ist. Dies lässt vermuten, dass sich die Reduktion der β1AR-Menge an der Zelloberfläche bei Überexpression von PIST durch eine Retention des Rezeptors durch PIST am TGN erklären lässt.

Weiterhin wurde in Rahmen dieser Arbeit beobachtet, dass die Koexpression des PDZ-Domänenproteins PSD-95 den Effekt von PIST auf die Menge von β1AR an der Zelloberfläche aufhebt, so dass wieder die Kontroll-Proteinmenge von β1AR an der Zelloberfläche erreicht wird. Das überexprimierte PSD-95 war mit β1AR an der Plasmamembran und in kleinen intrazellulären Kompartimenten kolokalisiert. Für PSD-95 ist beschrieben, dass es mit Zielproteinen an der Zelloberfläche interagiert und diese hier z.B. in Signalkomplexen verankert (Kim et al. 1995). Dies lässt vermuten, dass PSD-95 daran beteiligt ist, den Rezeptor aus der Interaktion mit PIST am TGN zu lösen und zur Zelloberfläche zu transportieren. Ähnliche Regulationswege sind bereits für andere Membranproteine, abhängig von PDZ-Domänenproteinen, gezeigt worden (Bauch et al. 2014; Xu et al. 2010).

Warum aber werden Membranproteine durch einen Interaktionspartner am Golgi zurückgehalten, um anschließend durch einen weiteren aus dieser Interaktion gelöst zu werden? Eine mögliche Funktion von diesem Mechanismus ist, dass die Interaktion von β1AR mit PIST nötig ist, damit die Interaktion mit PSD-95 anschließend effektiv stattfinden kann. Diese Hypothese wurde überprüft, indem die Menge von β1AR, die mit PIST interagiert, gemessen wurde. Der Rezeptor interagiert sowohl mit PIST, als auch mit PSD-95 über seinen PDZ-Liganden (Hu et al. 2000; He et al. 2004). He et al. (2004) zeigten in einem zellfreien System mit aufgereinigten Proteinen, dass eine Kompetition von PSD-95 und PIST um den PDZ-Liganden des Rezeptors stattfindet. Hier wurde nun aber beobachtet, dass in einem zellulären System die Überexpression von PIST eine vermehrte Interaktion von β1AR mit PSD-95 bewirkt, während der *knockdown* von PIST zu reduzierter Interaktion des Rezeptors mit PSD-95 führte. PIST begünstigt also die Interaktion des Rezeptors mit PSD-95 oder vermittelt sie sogar direkt. Cuadra et al. (2004) haben publiziert, dass PIST mit PSD-95 auch direkt interagiert; eine Interaktion von PIST und PSD-95 wurde in diesem Projekt in

Koimmunpräzipitations-Experimenten jedoch nicht beobachtet (Daten nicht gezeigt). Ein wichtiger Aspekt bei diesem Experiment ist die Änderung der subzellulären Lokalisation von β1AR. Möglicherweise interagiert bei Überexpression von PIST gerade deshalb mehr PSD-95 mit dem Rezeptor, weil dieser verstärkt am TGN lokalisiert ist. PSD-95 wird durch die Golgi-lokalisierte Acetyltransferase DHHC2 palmitoyliert (Greaves et al. 2011; Ohno et al. 2006), ist also offenbar transient am Golgi lokalisiert. Daher könnte auch die Vermittlung der Interaktion des Rezeptors mit PSD-95 durch PIST dort stattfinden. Dies würde mit der beobachteten Lokalisation von PIST am TGN harmonieren. Möglicherweise trägt PIST hier zu einer Qualitätskontrolle der Zelle bei, indem es sicherstellt, dass nur Proteine, die mit dem Verankerungsprotein PSD-95 interagieren können, auch das TGN zur Zelloberfläche verlassen.

Ein entscheidender Faktor könnte hierbei die erfolgreiche posttranslationale Modifikation des Rezeptors sein. Für verschiedene Proteine ist bereits bekannt, dass die Rekrutierung in Proteinkomplexe über posttranslationale Modifikationen selektiert wird (Maltese 1990; Fogel et al. 2010). Für andere Proteine ist bereits bekannt, dass sie am TGN zurückgehalten werden, bis ihre Palmitoylierung als Signal für den anschließenden Transport zur Zelloberfläche dient (Sotgia et al. 2002). Unterstützt wird die Theorie, dass das Zurückhalten durch PIST am TGN wichtig für die Selektion zwischen verschiedenen Formen des Rezeptors ist, durch eine Beobachtung bei der Überexpression von PIST bei *Western Blot* Analysen. β1AR wurde hier stets als Doppelbande detektiert. Die untere dieser Banden war bei Überexpression von PIST reproduzierbar verstärkt. Worin der Unterschied zwischen beiden Banden bestand, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden, sollte aber Gegenstand weiterer Analysen sein.

Durch Stimulationsexperimente wurde geprüft, ob sich die molekularen Ergebnisse auch auf Ebene der Signalweiterleitung widerspiegeln. Tatsächlich war die Agonist-induzierte Aktivität des MAPK-Signalwegs nach Überexpression von PIST in gleicher Weise verringert wie die Menge von β1AR an der Zelloberfläche. Im Vergleichsexperiment wurde beobachtet, dass bei *knockdown* von PIST nicht nur die Menge von β1-adrenergen Rezeptoren an der Zelloberfläche erhöht ist, sondern auch die durch Agonisten induzierte Aktivität. Offenbar ist also nicht nur der generelle, sondern auch der funktionelle Anteil des Rezeptors an der Zelloberfläche bei *knockdown* von PIST erhöht. Dies ist nicht unbedingt ein Widerspruch zu der Theorie, dass die Zurückhaltung durch PIST eine Form der Qualitätskontrolle für die

Membranproteine ist. Neben dem durch PIST und PSD-95 vermittelten Transport findet auch ein von PDZ-Domänen unabhängiger Transport von β1AR zur Zelloberfläche statt. So wird auch eine Variante von β1AR ohne das PDZ-Bindemotiv zur Zelloberfläche transportiert, wenn auch weniger effektiv als die Wildtyp-Variante (Daten nicht gezeigt). Außerdem ist auch bei *knockdown* immer noch 30% der Proteinmenge von PIST vorhanden.

Neben dem anterograden Transport sind auch Funktionen von PIST im postendozytotischen Weg von Membranproteinen bekannt (z.B. Cheng et al. 2004). Bekannt ist bereits, dass das PDZ-Domänenprotein SNX27 das Recycling von β1AR und β2AR nach deren Internalisierung fördert (Temkin et al. 2011; Nakagawa und Asahi 2013). Um zu prüfen, welche Rolle PIST bei diesen Prozessen spielt, wurden Internalisierung und Recycling von β1AR nach Stimulation mit dem Agonisten Isoproterenol unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Als Vergleichsprotein wurde erneut β2AR herangezogen, der nicht mit PIST interagiert. Die Internalisierung der β-adrenergen Rezeptoren wurde durch Überexpression oder *knockdown* von PIST nicht signifikant beeinflusst. Die Menge an β1AR an der Zelloberfläche nach einer Recycling-Phase war jedoch bei Überexpression von PIST signifikant reduziert. Auf das Recycling von β2AR hatte PIST dagegen keinen Einfluss. Es scheint also, dass PIST das Recycling von β1AR hemmt. Dies wurde durch die Beobachtung bestätigt, dass bei *knockdown* von PIST signifikant mehr β1AR nach der Stimulierung und einer Recycling-Phase an der Zelloberfläche detektiert wurde.

Der Weg internalisierter Rezeptoren führt zunächst über frühe Endosomen, von wo sie über späte Endosomen zu Lysosomen transportiert werden können. Von den frühen Endosomen können sie jedoch auch über Recycling-Endosomen oder direkt zur Zelloberfläche recyceln. Es stellte sich also die Frage, wo in der Zelle PIST auf β1AR trifft und dessen Recycling beeinflusst. Geht man von einer Lokalisation von PIST am TGN aus, müsste entweder der internalisierte Rezeptor zum Golgi transportiert werden oder PIST müsste seine subzelluläre Lokalisation ändern. Tatsächlich wurde beobachtet, dass die Verteilung von endogenem PIST in mit Isoproterenol stimulierten β1AR-exprimierenden Zellen verändert ist. Statt wie in nicht-stimulierten Zellen in einem großen perinukleären Kompartiment, ist PIST nun breiter über die Zelle verteilt. Die quantitative Auswertung von Immuncytochemie-Aufnahmen zeigte, dass der Anteil der Fläche von HEK293-T Zellen, in denen PIST detektiert wird, nach Stimulierung von β1AR von 4% auf 40% anstieg.

Die Verwendung von subzellulären Markern ergab eine starke Kolokalisierung von PIST nach Stimulierung von β1AR mit CD63, welches ein Markerprotein für das späte Endosom ist (Metzelaar et al. 1991). Die quantitative Auswertung der Immuncytochemie-Bilder zeigte, dass diese Kolokalisierung von PIST mit CD63 spezifisch für den stimulierten β1AR ist, im Gegensatz zu nicht-stimuliertem β1AR oder stimuliertem β2AR. Es scheint also, dass bei Stimulierung von β1AR ein Signal in der Zelle dafür sorgt, dass PIST vom TGN zu den späten Endosomen umverteilt wird. Möglicherweise führt die Aktivierung der Proteinkinase A oder einer der im Signalweg nachgeschalteten Proteinkinase dazu, dass PIST oder einer seiner Interaktionspartner phosphoryliert und so die Umverteilung induziert wird.

Ein subzelluläres Kompartiment, das den Transport von Proteinen von Endosomen zum TGN vermittelt, ist das Retromer (Bonifacino und Rojas 2006). PIST war nach der Stimulierung mit SNX1, einem Protein des Retromers, ebenfalls kolokalisiert. Beide Proteine waren zu einem beträchtlichen Anteil auch mit endozytiertem β1AR kolokalisiert. Möglicherweise wird also der internalisierte Rezeptor unter Beteiligung von PIST zunächst in späten Endosomen stabilisiert und dann unter Beteiligung des Retromers zum TGN transportiert, wo sich der Zelle eine erneute Gelegenheit der Qualitätskontrolle bieten würde, bevor der Rezeptor schließlich erneut zu einem Bestimmungsort gebracht werden könnte. Dieses Modell ermöglicht eine Rolle von PIST im postendozytotischen Transport des Rezeptors ohne Beteiligung von Recycling Endosomen, wo PIST nicht detektiert wurde (Daten nicht gezeigt). Die Überexpression von PIST könnte diesen Weg als Alternative zum direkten, durch SNX27 vermittelten Recycling verstärken, wodurch sich die Reduktion an recyceltem Rezeptor erklären ließe. Bei *knockdown* von PIST würde entsprechend das direkte Recycling verstärkt werden und so zu der deutlich erhöhten Menge an recyceltem Rezeptor führen. Passend zu dem aufgestellten Modell wurde in Lebendzellmikroskopie-Aufnahmen beobachtet, dass β1AR nach der Internalisierung in PIST-überexprimierenden Zellen für ca. 20 Minuten sehr mobil ist, bevor der Rezeptor breit über die Zelle verteilt über mehr als 60 Minuten stationär verbleibt (Daten nicht gezeigt).

Weiterhin ist bereits bekannt, dass β1AR und β2AR nach der Endozytose verschiedene Transportwege durchlaufen und hierbei in verschiedene subzelluläre Kompartimente verteilt werden (Liang et al. 2004). Da PIST mit β1AR, aber nicht mit β2AR interagiert, könnte der Einfluss von PIST auf den postendozytotischen Weg eine Funktion bei dieser Selektion übernehmen. Für β2AR ist bekannt, dass die Interaktion des endozytierten Rezeptors mit

dem Retromer wichtig für das direkte Recycling zur Zelloberfläche ist und durch SNX27 vermittelt wird (Temkin et al. 2011). In dieser Publikation wurde vorgeschlagen, dass die Interaktion von β2AR mit dem Retromer in Endosomen verschiedene Transportwege zur Folge haben kann. Möglicherweise verankert SNX27 auch β1AR am Retromer. Die Interaktion mit PIST könnte einer der Faktoren sein, die über den folgenden Transportweg entscheidet. Neben der bereits beschriebenen erneuten Qualitätskontrolle könnte bei diesem Transportweg auch Endosomen-vermittelte Signaltransduktion eine Rolle spielen, die bereits für β2-adrenerge Rezeptoren bekannt ist (Irannejad et al. 2013).

Nun stellte sich die Frage, welches Signal in der Zelle nach der Stimulierung von β1AR dazu führt, dass PIST umverteilt wird. β1AR ist ein an $G\alpha_s$-Proteine gekoppelter Rezeptor (Green et al. 1992). Deren Stimulierung führt zur Aktivierung der Adenylatcyclase, die ATP zu cAMP umsetzt, und damit zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration in der Zelle. Den zellulären Anstieg von cAMP kann man auch direkt durch Behandlung mit IBMX und Forskolin induzieren. Diese Stimulierung wurde bei HEK293-T Zellen durchgeführt und die PIST-Lokalisation detektiert. Dabei zeigte sich, dass dies zu der gleichen Umverteilung von PIST führt wie die spezifische Aktivierung von β1AR. Auch hier war PIST breit über die Zelle verteilt und mit SNX1 kolokalisiert. Die Detektion von Giantin bewies, dass der Golgi hierbei nicht verändert ist. Offenbar induziert also der cAMP-Anstieg in der Zelle die Umverteilung von PIST.

PIST interagiert also offenbar mit dem endozytierten β1AR und stabilisiert ihn in späten Endosomen, sodass sein Recycling verringert oder zumindest verzögert ist. Da viele Rezeptoren vom späten Endosom zum Lysosom transportiert werden, wo sie abgebaut werden, war es interessant, ob die Interaktion mit PIST einen Einfluss auf die Stabilität von β1AR nach seiner Internalisierung hat. Tatsächlich wurde beobachtet, dass die Überexpression von PIST den Abbau des internalisierten β1AR verlangsamte, so dass seine Halbwertszeit von 20 auf 53 Stunden erhöht wurde. Auf die Stabilität von β2AR hatte die Überexpression von PIST dagegen keinen Einfluss. Es ist bereits bekannt, dass β1AR im Gegensatz zu β2AR sehr stabil gegenüber lysosomalem Abbau nach der Internalisierung ist und dass dieser Unterschied auf die Interaktion der PDZ-Liganden der Rezeptoren zurückzuführen ist (Liang et al. 2003). Die Interaktion mit PIST könnte hierbei eine zentrale Rolle einnehmen.

PIST spielt also bei der Regulation von mehreren wichtigen Transportwegen von β1AR eine Rolle (Abb. 4.1). PIST hält den Rezeptor im anterograden Transportweg am TGN zurück, bis er durch PSD-95 aus der Interaktion gelöst wird. Hierbei fördert PIST die Interaktion des Rezeptors mit PSD-95. Die Interaktion mit PSD-95 führt zum anschließenden Transport des Rezeptors zur Zelloberfläche. Weiterhin stabilisiert PIST den endozytierten Rezeptor im späten Endosom. Hierbei führt der cAMP-Anstieg in der Zelle nach der Stimulierung von β1AR zu einer Umverteilung von PIST vom TGN zu späten Endosomen, wo PIST mit β1AR interagiert. Dies führt zu einer Hemmung sowohl des Recyclings, als auch des Abbaus des Rezeptors.

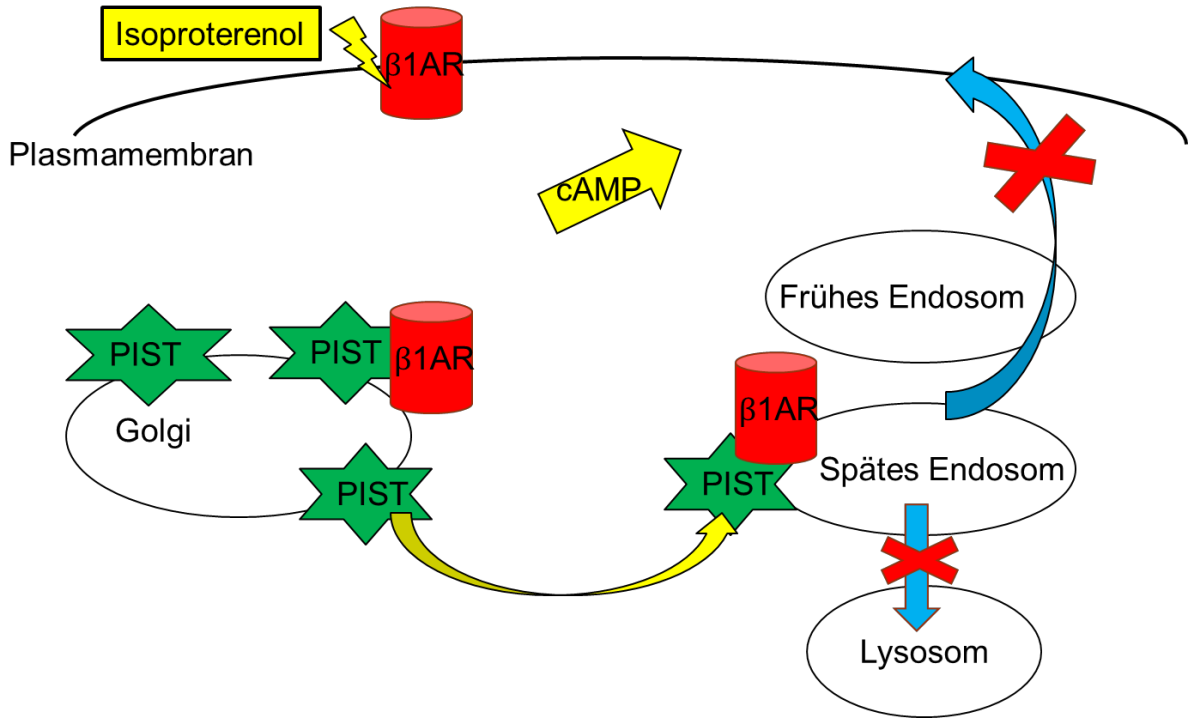

Abbildung 4.1 PIST stabilisiert den endozytierten β1AR im späten Endosom.

PIST hält den β1-adrenergen Rezeptor im anterograden Transport am TGN zurück. Weiterhin sorgt der cAMP-Anstieg in der Zelle nach der Stimulierung von β1AR zu einer Umsortierung von PIST vom TGN zu späten Endosomen, wo PIST auf den endozytierten Rezeptor trifft und diesen dort stabilisiert. Dies führt zu einer Reduktion von sowohl dem lysosomalem Abbau, als auch dem Recycling des Rezeptors.

4.2. Der Einfluss einer reduzierten PIST-Proteinmenge auf Interaktionspartner im zentralen Nervensystem

Verschiedene Informationen über die Rolle von PIST bei der subzellulären Sortierung eines spezifischen Interaktionspartners wurden nun bereits diskutiert. Einen weiteren Aspekt soll im Folgenden die Funktion von PIST im zentralen Nervensystem darstellen. Hier interagiert PIST mit einer Reihe von wichtigen Komponenten, wie Neurotransmitterrezeptoren oder Proteinen der postsynaptischen Dichte.

Durch Detektion von PIST in Neuronen aus Spinalganglien wurden Ergebnisse aus der Literatur bestätigt, nach denen PIST im Soma, sowie in Golgi-Ausläufern in trans-Golgi-Fraktionen enthalten sind (Chen et al. 2012). Im Gegensatz zu Cuadra et al. (2004) wurde hier jedoch kein PIST in Synapsen detektiert. Überexprimiertes PIST-GFP zeigte die gleiche subzelluläre Verteilung in Neuronen wie das endogene PIST.

Um mehr Informationen über die Rolle eines Proteins mit so vielen verschiedenen Interaktionspartnern und Funktionen wie PIST zu erhalten, ist die Analyse von *knockout*-Mäusen eine besonders wertvolle experimentelle Strategie. Sie ermöglicht, die Auswirkungen des Verlustes eines Proteins auf einen Organismus von der Embryonalentwicklung an zu analysieren. Es wurde bereits 2002 eine PIST-*knockout* Mauslinie erzeugt (Yao et al. 2002). In dieser Publikation wurde beschrieben, dass homozygote Tiere lebensfähig sind und dass männliche homozygote *knockout*-Mäuse infertil sind. Dies wurde dadurch erklärt, dass das Acrosom, ein Zellorganell, das essentiell bei der Reifung von Spermien ist, sich in PIST-defizienten Mäusen nicht erfolgreich ausbilden kann. Dieses Zellorganell bildet sich aus Fragmenten des trans-Golgis (Abou-Haila und Tulsiani 2000). In zwei weiteren Publikationen wurde beschrieben, dass sich die Flagellen der Spermien in männlichen PIST-*knockout*-Mäusen zunächst normal entwickeln, bis sie sich in der epididymalen Reifung um die Köpfe wickeln und dadurch deformieren. Weiterhin sind die Mitochondrien in den Spermien verändert (Suzuki-Toyota et al. 2004; Ito et al. 2004).

Leider war diese *knockout*-Mauslinie für dieses Projekt nicht verfügbar und so wurde im Rahmen dieser Arbeit eine neue PIST-*knockout-first* Mauslinie mithilfe von genetisch veränderten embryonalen Stammzellen Gopc$^{tm1a(EUCOMM)Wtsi}$ der Firma Eucomm generiert. Mäuse, die die *knockout-first* Kassette im PIST-Gen tragen, exprimieren statt PIST ein Ersatzgenprodukt aus den ersten zwei Exons von PIST und β-Galaktosidase. Das Ende des

zweiten Exons entspricht der Aminosäure 111. Diese liegt in der Mitte der ersten *Coiled-coil*-Domäne. Somit kann davon ausgegangen werden, dass keine funktionellen Proteindomänen in diesem Ersatzgenprodukt enthalten sind.

Von drei bezogenen Klonen führte nur einer zu der Etablierung einer neuen Mauslinie. Dass Embryonale Stammzellen, die einer homologen Rekombination unterzogen wurden, nicht als Mauslinie etabliert werden können, ist nicht ungewöhnlich. Meistens fand dann neben oder statt der gewünschten homologen Rekombination eine unspezifische statt, die zur Deletion eines lebenswichtigen Bereiches führte. Dies ist der Grund dafür, dass empfohlen wird, mehrere verschiedene Klone zu testen (www.eucomm.org). Die Linie GOPC-B04 konnte hingegen erfolgreich etabliert werden und wird nun Gegenstand der Diskussion sein.

Von den 144 Tieren aus 5 Generationen heterozygoter Verpaarungen waren 62% heterozygot für die *knockout-first* Kassette, 1% war homozygot und 36% waren Wildtyptiere. Die Verteilung der Genotypen führt nach den Mendelschen Regeln zu der Annahme, dass homozygote *knockout*-Tiere üblicherweise embryonal letal sind. Warum in der etablierten Mauslinie statt der erwarteten ca. 50 nur zwei homozygote *knockout*-Tiere erzeugt wurden, obwohl PIST-defiziente Tiere in der Literatur als lebensfähig beschrieben wurden, kann hier nicht abschließend geklärt werden. Die Möglichkeit, dass in dieser Linie neben der gewünschten noch eine ungewünschte genetische Veränderung stattgefunden hat, die bei Homozygotie zu embryonaler Lethalität führt, kann nicht ausgeschlossen werden. Die Wahrscheinlichkeit für diesen Fall ist jedoch äußerst gering. Bei der Bestimmung des Genotyps der Mäuse wurde eine PCR mit Primern durchgeführt, die innerhalb der Kassette, sowie den flankierenden Bereichen binden. Diese flankierenden Bereiche sind selbst Teil der durch homologe Rekombination eingebrachten genomischen Sequenz. Bei der Bestimmung des Genotyps wurde also auf die Insertion einer Kassette ins Mausgenom, unabhängig von deren Lokalisation, getestet. 21 als heterozygot bestimmte Mäuse wurden auf Proteinebene analysiert. Bei jeder davon wurde eine reduzierte Proteinmenge von PIST um ca. 40% nachgewiesen. Weiterhin waren die beiden erhaltenen *knockout*-Mäuse keine Geschwister und in den nachfolgenden Würfen dieser Elternpaare wurden wiederum keine homozygoten *knockout*-Tiere geboren. Die Wahrscheinlichkeit, dass bei ca. 50 Tieren nur zweimal die korrekte Insertion der Kassette, aber nicht eine zweite unerwünschte genetische Veränderung weitervererbt wurde, ist äußerst gering. Wesentlich wahrscheinlicher ist, dass der genetische Hintergrund dafür verantwortlich ist, dass homozygote *knockout*-Mäuse hier

in den meisten, aber nicht in allen Fällen und anders als in der Literatur beschrieben nicht lebensfähig waren.

Die Analyse der Lysate von verschiedenen Gehirnregionen ergab, dass die Proteinmenge von PIST in heterozygoten und *knockout*-Tieren verändert ist. In heterozygoten Tieren wurde eine auf 62% reduzierte PIST-Proteinmenge, in homozygoten *knockout*-Tieren wurde kein PIST detektiert. Diese Verhältnisse entsprechen in etwa den Erwartungen.

PIST interagiert mit Neurotransmitterrezeptoren, wie β1AR (He et al. 2004), mGluR5 (Cheng et al. 2010a) und NMDA-Rezeptoren (Cuadra et al. 2004). Außerdem interagiert PIST mit Neuroligin1 (Meyer et al. 2004), das in der PSD angereichert ist und die Synapse stabilisiert (Ichtchenko et al. 1995), sowie mit Stargazin, das für die Verankerung von AMPA-Rezeptoren in der postsynaptischen Membran essentiell ist (Cuadra et al. 2004; Chen et al. 2000). Die bisher diskutierten Ergebnisse belegen, dass PIST Rezeptoren intrazellulär zurückhält, sie vor lysosomalem Abbau schützt, und die Assoziation der Rezeptoren mit Gerüstproteinen fördern kann. Um für eine Reihe von postsynaptischen Rezeptoren zu untersuchen, wie diese Funktionen von PIST sich auf die jeweiligen Rezeptoren auswirken, wurden PSD-Präparationen vom Cortex von PIST-heterozygoten, PIST-*knockout* und Wildtyp-Tieren durchgeführt und analysiert. Die Proteinmenge verschiedener PIST-Interaktionspartner wurde in den Gesamtzellfraktionen, sowie in der angereicherten PSD bestimmt. Zum Vergleich wurde auch die Proteinmenge in kultivierten Cortexneuronen bei lentiviralem PIST-*knockdown* bestimmt. Die Kombination dieser Analysen gibt ein erstes interessantes Bild über die Auswirkungen des PIST-Verlustes. Der wichtigste Unterschied zwischen den gewählten Experimenten ist hier, dass sich die kultivierten Cortexneuronen zunächst unter normalen Bedingungen entwickeln und bei der Ausbildung der Synapsen nicht beeinflusst sind. Erst an DIV7 wird der PIST-*knockdown* induziert. Bei PIST-heterozygoten und *knockout*-Mäusen ist dagegen von Entwicklungsbeginn an die PIST-Proteinmenge reduziert und wirkt sich bereits auf die Ausbildung der neuronalen Netzwerke aus.

Für β1AR wurde bereits diskutiert, dass der lysosomale Abbau nach der Internalisierung durch PIST gehemmt wird. Es ist daher interessant zu ermitteln, wie sich der teilweise oder komplette Verlust von PIST auf die Proteinmenge von β1AR in den analysierten neuronalen Systemen auswirkt. Im Cortex heterozygoter Mäuse war die gesamte Proteinmenge von β1AR nicht verändert. In den beiden analysierten *knockout*-Mäusen war hingegen eine

deutliche Reduktion der Proteinmenge in Hippocampus-Lysat und auch in der Gesamtfraktion des Cortexes zu beobachten. Diese Beobachtung bestätigt eine stabilisierende Funktion von PIST für den stimulierten Rezeptor wie in 4.1 diskutiert. Vermutlich wirkt sich der Verlust der stabilisierenden Funktion von PIST hier nur bei vollständiger Deletion aus. Ein anderes Ergebnis wurde jedoch in infizierten Cortexkulturen beobachtet, in denen die PIST-Reduktion einen Anstieg der Rezeptormenge zur Folge hatte. Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied ist, dass β1AR in den Cortexkulturen vermutlich nicht stimuliert war, da im Gehirn die Noradrenergen Signalwege im Locus Caeruleus entspringen. Da dieser nicht Teil der Neuronenkultur war, ist β1AR hier vermutlich nicht stimuliert, im Gegensatz zu den analysierten Mäusen. Möglicherweise weist der Anstieg der Proteinmenge in kultivierten Cortexneuronen darauf hin, dass die subzelluläre Lokalisation von β1AR bei PIST-*knockdown* in einer Weise verändert ist, die zu einer Reduktion des Stimulations-unabhängigen Transports zum Lysosom führt. Eine weitere Möglichkeit ist, dass neben der Stabilität des Rezeptors auch die Protein-Biosynthese eine Rolle spielt. Es wurde bereits für verschiedene Rezeptoren gezeigt, dass ihre Translation stimulationsabhängig reguliert wird (Tsao et al. 2001). Die verschiedenen Faktoren, die bei Verlust von PIST vor oder nach der Ausbildung der neuronalen Netzwerke eine Rolle spielen, könnten also unterschiedlichen Einfluss auf die Protein-Biosynthese ausüben. Diese Fragestellung könnte durch quantitative *realtime* PCR aufgeklärt werden.

In der PSD von PIST-heterozygoten Mäusen wurde ein Anstieg der β1AR-Proteinmenge auf 130% verzeichnet. Dieser Unterschied war nicht signifikant, was experimentell vor allem auf Schwankungen innerhalb der einzelnen Experimente zurückzuführen ist. In jedem Experiment war jedoch die gleiche Tendenz zu beobachten. Bei der Analyse der beiden PIST-*knockout*-Mäuse wurde ein starker Anstieg von β1AR in der PSD auf 173% beobachtet. Der Mangel an weiteren analysierbaren Tieren machte hier die Durchführung von statistischen Tests unmöglich. Beide Beobachtungen bestätigen dennoch die oben diskutierte Idee, dass PIST den β1AR am TGN zurückhält. Die Reduktion von PIST in den analysierten Tieren könnte so dazu führen, dass mehr Rezeptoren das TGN zur PSD verlassen können.

Neuroligin1 ist in der PSD von exzitatorischen Synapsen angereichert (Chubykin et al. 2007). Bei der Analyse von kultivierten Cortexneuronen wurde ermittelt, dass die Proteinmenge von Neuroligin1 bei Reduktion der PIST-Proteinmenge nicht verändert ist. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass in PIST-heterozygoten Mäusen kein Unterschied in der gesamten

Proteinmenge von Neuroligin1 zu Wildtyp-Mäusen gefunden wurde. In PIST-*knockout*-Mäusen war die Proteinmenge hingegen im Lysat von Hippocampus-Geweben leicht, sowie in der Gesamtfraktion vom Cortexgewebe deutlich reduziert. Möglicherweise übernimmt PIST also auch für Neuroligin1 eine stabilisierende Funktion, wobei der Unterschied auch hier erst bei komplettem Verlust des Proteins detektierbar ist.

Bei der Analyse der PSD-Fraktionen wurde eine erstaunliche Beobachtung gemacht. Während in PIST-heterozygoten Mäusen signifikant mehr Neuroligin1 in der PSD detektiert wurde, war das Gegenteil für PIST-*knockout*-Mäuse der Fall. Hier wurde eine deutliche Reduktion von Neuroligin1 in den PSD-Fraktionen ermittelt. Diese Beobachtung kann mehrere Gründe haben. Zum einen spielt die Gesamt-Proteinmenge von Neuroligin1 eine Rolle. Möglicherweise führt in *knockout*-Mäusen die Reduktion der gesamten Proteinmenge von Neuroligin1 dazu, dass auch weniger in die PSD transportiert wird. Zum anderen ist es auch wahrscheinlich, dass die Synapsen in PIST-reduzierten Mäusen allgemein verändert sind, da Neuroligine eine wichtige Rolle in der Ausbildung der Synapsen einnehmen (Nam und Chen 2005). Scheiffele et al. (2000) haben gezeigt, dass sogar die Expression von Neuroligin in nicht-neuronalen Zellen die Ausbildung von Präsynapsen in umliegenden Neuronen induziert. Eine durch PIST-Reduktion vermittelte Fehlsortierung von Neuroligin1 kann also Auswirkungen auf die gesamte Synaptogenese haben, die auch bei der Diskussion der anderen Interaktionspartner beachtet werden muss.

PIST interagiert mit mGluR5 und inhibiert dessen durch Ubiquitinierung vermittelten lysosomalen Abbau (Cheng et al. 2010a). Hier wurde beobachtet, dass der *knockdown* von PIST in Cortexneuronen zu einer Reduktion der Proteinmenge des Rezeptors führt. Die reduzierte PIST-Menge könnte also zu einer verstärkten Ubiquitinierung und damit verstärktem Abbau des Rezeptors führen. In PIST-heterozygoten Mäusen ist die Proteinmenge von mGluR5 weder insgesamt, noch in der PSD verändert. In PIST-*knockout* Mäusen wurde hingegen eine starke Reduktion der Proteinmenge sowohl in Hippocampus-Lysaten, als auch in der Gesamt- und der PSD-Fraktion vom Cortex beobachtet. Diese Ergebnisse gehen mit dem bisherigen Modell konform. Ob die reduzierte Rezeptormenge in der PSD von PIST-*knockout* Mäusen durch die reduzierte Gesamtproteinmenge zu erklären ist oder hier zusätzlich ein Einfluss von PIST auf die subzelluläre Lokalisation von mGluR5 eine Rolle spielt, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden. Weitere Experimente zu diesem

Aspekt, beispielsweise Bestimmung der Zelloberflächenrezeptoren durch Biotinylierung oder Lebendzellmikroskopie, wären jedoch sehr interessant.

Neben den metabotropen könnten auch ionotrope Glutamatrezeptoren bei Reduktion der PIST-Proteinmenge beeinflusst sein. Daher soll nun die Situation der AMPA-Rezeptoren geklärt werden. In infizierten Cortexneuronen zeigte sich, dass die Proteinmengen von sowohl Stargazin, als auch AMPA-Rezeptoren bei *knockdown* von PIST erhöht sind. Möglicherweise reguliert PIST die zelluläre Menge beider Proteine gemeinsam, indem der Transport dieses Proteinkomplexes zum Lysosom reguliert wird. In der Gesamtfraktion vom Cortex PIST-heterozygoter Tieren wurde ebenfalls ein Anstieg der Proteinmenge von AMPA-Rezeptoren auf 173% ermittelt. Im Hippocampus-Lysat und der Gesamtfraktion des Cortex-Gewebes von PIST-*knockout*-Mäusen war die Menge an AMPA-Rezeptoren dagegen nur im Rahmen der Messgenauigkeiten verändert.

Eine ähnliche Situation zeigte sich für die Analyse der postsynaptischen Dichte. In PIST-heterozygoten Mäusen war die Menge an AMPA-Rezeptoren signifikant erhöht. Dieses Ergebnis stützt die Theorie, dass Stargazin durch PIST am TGN zurückgehalten wird. Die reduzierte Proteinmenge von PIST könnte dazu führen, dass mehr Stargazin das TGN verlassen und AMPA-Rezeptoren in der postsynaptischen Membran verankern könnte. In der PSD von PIST-*knockout*-Mäusen waren die AMPA-Rezeptoren dagegen nur im Rahmen der Messgenauigkeiten erhöht. Für die Verankerung der AMPA-Rezeptoren in die postsynaptische Membran ist neben einem PDZ-abhängigen auch ein PDZ-unabhängiger Transportweg beschrieben (Chen et al. 2000). PIST beeinflusst nach dem momentan angenommenen Modell nur den PDZ-abhängigen Weg. Möglicherweise lässt sich der Unterschied zwischen partiellem und komplettem Verlust von PIST in Mäusen durch sensitive Regulierung dieser beiden Transportwege erklären, die auch die Gesamtproteinmenge entsprechend beeinflussen könnten.

Nach Cuadra et al. (2004) interagiert PIST weiterhin direkt mit NMDA-Rezeptoren. Über die Funktion dieser Interaktion ist im Gegensatz zu den meisten anderen Interaktionspartnern nichts bekannt. In kultivierten Cortexneuronen ist die Proteinmenge von NMDA-Rezeptoren bei PIST-*knockdown* signifikant erhöht. In den Gesamtfraktionen vom Cortex PIST-heterozygoter Mäusen wurden hingegen weniger NMDA-Rezeptoren detektiert, auch wenn der Unterschied nicht signifikant war. In Hippocampus-Lysaten von PIST-*knockout* Mäusen

war die Proteinmenge der Rezeptoren nur im Rahmen der Messgenauigkeit verändert und in der Gesamtfraktion vom Cortex war die Proteinmenge ebenfalls erhöht. Möglicherweise beeinflusst also PIST auch den lysosomalen Abbau von NMDA-Rezeptoren über eng regulierte Transportwege.

Die Proteinmenge von NMDA-Rezeptoren in der PSD war in PIST-heterozygoten Mäusen signifikant reduziert, während in der PSD von PIST-*knockout* Mäusen die Proteinmenge wiederum nicht deutlich verändert war. Dies spricht dafür, dass diese Rezeptoren anders als bekannte Beispiele wie SSTR5, β1AR oder Stargazin nicht durch PIST intrazellulär zurückgehalten werden (Bauch et al. 2014; He et al. 2004; Cuadra et al. 2004). Klar ist hier jedoch, dass weitere Analysen nötig sind um die Funktion von PIST bei der subzellulären Sortierung von NMDA-Rezeptoren zu verstehen.

Neben dem unmittelbaren Einfluss von PIST auf AMPA- und NMDA-Rezeptoren könnte die Zusammensetzung der Glutamatrezeptoren auch über die veränderte Proteinmenge und Lokalisation von Neuroligin beeinflusst werden. So ist bekannt, dass die Überexpression von Neuroligin1 zu einem erhöhten NMDA/AMPA-Rezeptor-Verhältnis führt (Chubykin et al. 2007). In PIST-heterozygoten Mäusen wurde hier nun beobachtet, dass die Menge an NMDA-Rezeptoren reduziert und die Menge an AMPA-Rezeptoren erhöht ist. Beide Faktoren könnten also nicht nur einzeln direkt durch PIST, sondern auch durch eine voneinander abhängige Regulation verändert sein. Elektrophysiologische Untersuchungen haben die molekularen Verhältnisse bisher bestätigt. In Kooperation mit Prof. Dr. Alexander Dityatev und Dr. Inseon Song (DZNE, Magdeburg) wurde begonnen, elektrophysiologische Experimente mit PIST-heterozygoten Mäusen durchzuführen. Erste Ergebnisse der Kooperationspartner zeigten hierbei unter anderem, dass das Verhältnis der Aktivität von NMDA- zu AMPA-Rezeptoren in heterozygoten Mäusen reduziert ist. Diese Beobachtung spiegelt die beschriebenen Ergebnisse auf molekularer Ebene wieder.

Aus den vorgestellten Analysen wird klar, dass der partielle oder komplette Verlust von PIST keinen generellen Effekt auf alle Interaktionspartner hat, sondern dass die Situation für jedes der Proteine einzeln zu betrachten ist. Ein Grund hierfür ist sicherlich, dass alle diese Proteine jeweils mit einer Reihe anderer PDZ-Domänenproteine interagieren. Somit verändert jede Manipulation der Proteinmenge eines der Mitspieler ein ganzes Netzwerk an

Interaktionspartnern. Außerdem gibt es für jedes der Proteine auch Regulationswege, die unabhängig von PDZ-Domänenproteinen und ebenfalls streng reguliert sind.

Alle betrachteten Glutamatrezeptoren aktivieren sowohl den MAPK-, als auch den AKT-Signalweg. Daher ist es interessant herauszufinden, wie sich die Aktivität dieser Signalwege in den verschiedenen Systemen bei Reduktion von PIST verhält. Tatsächlich war die Aktivität beider Signalwege sowohl in PIST-heterozygoten und PIST-*knockout*-Mäusen, als auch in kultivierten Cortexneuronen bei PIST-*knockdown* deutlich reduziert. Diese Beobachtung bestätigt, dass PIST von essentieller Bedeutung für die korrekte Proteinzusammensetzung der Postsynapse ist. Angesichts der Tatsache, dass beispielsweise AMPA-Rezeptoren in der PSD von heterozygoten Mäusen sogar verstärkt detektiert wurden und die Menge an mGluR5 hier nicht verändert war, lässt sich dieses Ergebnis aber vermutlich nicht nur durch molekulare Betrachtungen der Menge an Rezeptoren erklären. Eine wichtige Rolle könnte hier der Einbau der Glutamatrezeptoren in Signalkomplexen einnehmen. Es ist bekannt, dass durch PDZ-Domänen vermittelte Interaktionen essentiell für die Verankerung von Glutamatrezeptoren in Signalkomplexen sind. In diesen Signalkomplexen sind unter anderem auch Proteine der zellulären Signaltransduktionswege enthalten, wie ERK oder PKA (Westphal et al. 1999; Hardingham et al. 2001). Die starke Reduktion der Aktivität der Proteinkinasen ERK und AKT bei reduzierter PIST-Proteinmenge weist darauf hin, dass PIST bei der Bildung dieser Signalkomplexe eine wesentliche Funktion einnimmt. Eine weitere mögliche Erklärung für die reduzierte Signaltransduktion liegt in einer Fehlsortierung von Neuroliginen. Diese Proteine sind essentiell für die korrekte Ausbildung von Synapsen und interagieren mit PIST. Würden beispielsweise durch eine Fehlsortierung von Neuroligin postsynaptische Strukturen ohne präsynaptischen *Input* entstehen, so würde dies ebenfalls eine reduzierte Aktivität der MAPK- und AKT-Signalwege erklären. Weiterhin ist bekannt, dass ein Komplex aus Neuroligin und PSD-95 an der Postsynapse die Ausschüttung von Neurotransmittern an der Präsynapse reguliert (Futai et al. 2007). Dieser Komplex könnte durch die Reduktion von PIST ebenfalls beeinflusst sein und so einen weiteren Einfluss auf die Aktivität der Signalwege darstellen.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist, dass die Aktivität von Signalwegen wiederum die Proteinzusammensetzung der PSD und auch die Stabilität der PSD-Proteine beeinflusst (Ehlers 2003; Crump et al. 2001). So steuert gerade die Aktivität des MAPK-Weges die Verfügbarkeit von AMPA-Rezeptoren an der Membran. Bei einer bestimmten Form von

Langzeitdepression wird durch Aktivierung des mGluR5 die MAPK aktiviert; dies führt zur Endozytose von AMPA-Rezeptoren und damit einer Verringerung der Effizienz der Synapse (Gallagher et al. 2004). Dieser Punkt kann wiederum eine Erklärung für die veränderte Proteinmenge einiger PSD-Proteine und Neurotransmitterrezeptoren bei den analysierten Mäusen sein.

Schließlich wurde eine bekannte Funktion von PIST bei der Regulation des Blutglukosespiegels überprüft. PIST ist dafür verantwortlich, in Adipozyten bei Insulinstimulierung die Spaltung des Proteins TUG zu induzieren, was zu einem Transport des Glucosetransporters Glut4 an die Zelloberfläche führt (Bogan et al. 2012). Dieser Regulationsprozess ist wichtig für die effiziente Aufnahme von Glukose nach Insulin-Ausschüttung. In Mäusen, die das Spaltungsprodukt von TUG im Fettgewebe überexprimieren, wurde nach fünfstündigem Fasten ein reduzierter Blutglukosespiegel, sowie ein verstärkter Abbau von PIST beobachtet (Löffler et al. 2013). Es wurde angenommen, dass PIST normalerweise gemeinsam mit TUG Glut4-haltige Vesikel am Golgi zurückhält und dass die Reduktion von PIST dafür sorgt, dass verstärkt Glut4 den Golgi zur Zelloberfläche verlässt. Dadurch steigt die Glukoseaufnahme in die Adipozyten und der Blutglukosespiegel sinkt. In der vorliegenden Arbeit konnte diese Theorie bestätigt werden, da der gleiche Effekt bei Reduktion der PIST-Proteinmenge beobachtet wurde, ohne dass hier, wie in der beschriebenen Publikation, die Proteinmenge von TUG beeinflusst wurde.

Zu beachten ist bei den analysierten Mäusen nach dem *knockout-first* Prinzip, dass die für die homologe Rekombination verwendete Selektionskassette mit dem Gen für Neomycin noch im Genom enthalten ist und den beobachteten Phänotyp beeinflussen könnte. Um diese zu entfernen, werden heterozygote *knockout*-Tiere mit Mäusen verpaart, die ubiquitär das Protein Cre exprimieren. Dieses Protein führt dazu, dass die genomische Sequenz zwischen 2 LoxP-Stellen herausgeschnitten wird. In diesem Fall bedeutet dies, dass die Selektionskassette, sowie das dritte Exon von PIST entfernt werden. Somit wird eine konventionelle *knockout*-Linie erzeugt. Die Etablierung einer solchen Linie wurde im Rahmen des Projektes begonnen.

Eine weitere Limitierung der etablierten Linie ist, dass homozygote *knockout*-Tiere in den meisten Fällen nicht lebensfähig waren. Indem heterozygote *knockout-first*-Tiere mit Mäusen verpaart werden, die das Protein Flp exprimieren, werden die Selektionselemente

sowie das *exon trap*-Modul, bestehend aus Spleiß Akzeptor, lacZ-Gen und Polyadenylierungssequenz, aus der Kassette entfernt. Diese Mäuse sollten ein funktionelles PIST-Gen besitzen. Werden diese Mäuse dann wiederum mit Mäusen verpaart, die entwicklungs- oder gewebeabhängig das Protein Cre exprimieren, entstehen Nachkommen, denen das PIST-Protein nur während eines bestimmten Entwicklungsabschnitts oder nur in einem spezifischen Gewebe fehlt. Möglicherweise wären hier mehr homozygote PIST-*knockout* Tiere lebensfähig, was für die Analyse der Auswirkungen von PIST-Defizienz große Vorteile hätte. Für PIST wären hierbei verschiedene potenzielle Mauslinien sehr interessant. Die Interaktion mit den PSD-Proteinen β1AR, Stargazin, Neuroligin1 und -2 und mGluR5, sowie die hier vorgestellten Ergebnisse beweisen, dass die Analyse von konditionellen *knockout*-Tieren, denen PIST spezifisch im Gehirn fehlt, interessante Erkenntnisse liefern könnten. Eine Alternative wäre ein konditionaler *knockout*, der erst nach der Embryonalentwicklung eintritt. Möglicherweise würden aus einer dieser beiden Methoden lebensfähige homozygote *knockout*-Tiere entstehen, deren Analyse wertvolle weitere Daten für das Verständnis der Funktion von PIST liefern könnten.

4.3. Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue Aspekte für die Rolle von PIST bei der subzellulären Sortierung von β1AR und verschiedenen Interaktionspartnern im zentralen Nervensystem beleuchtet. Es wurde beobachtet, dass die Interaktion mit PIST am TGN ein zentraler Sortierungspunkt von β1AR ist und die Interaktion mit PSD-95 verstärkt; aber die Funktion dieses Regulationsprozesses konnte nicht abschließend geklärt werden. Möglicherweise ist die Retention des Rezeptors essentiell für seine posttranslationale Modifikation, wie Glykosylierung oder Palmitoylierung. Entsprechend könnte diese Modifikation den erwähnten Unterschied zwischen zwei Banden in *Western Blot* Analysen ausmachen, in denen der Rezeptor detektiert wurde. Beide Theorien sollten durch geeignete Experimente überprüft werden.

Ein Modell für die Funktion von PIST bei der postendozytotischen Sortierung von β1AR wurde ebenfalls aufgestellt. Hier wäre interessant zu klären, ob die Stabilisierung von β1AR in späten Endosomen einen Beitrag zur zellulären Signaltransduktion leistet und ob bei der vorgestellten Umverteilung von PIST innerhalb der Zelle die Interaktion mit Syntaxin6 eine Rolle spielt. Syntaxin6, ein Q-Snare Protein, interagiert mit PIST über die zweite *Coiled-coil*-

Domäne (Charest et al. 2001) und mit EEA1, das in frühen Endosomen lokalisiert ist (Simonsen et al. 1999). Möglicherweise spielt diese Interaktion eine Rolle bei der Umverteilung von PIST, auch wenn PIST in späten, nicht in frühen Endosomen detektiert wurde. Allerdings wurde die Lokalisation von PIST nur für den Zeitpunkt von 20 Minuten nach der Stimulierung von β1AR untersucht, ist also nur eine Momentaufnahme. Zudem sind die Übergänge zwischen frühen und späten Endosomen transient.

Die gewonnenen Erkenntnisse zur Regulation von β1AR durch PIST findet momentan Anwendung in einer Kooperation mit Prof. Arne Hansen und Prof. Thomas Eschenhagen, UKE. Hier soll die physiologische Auswirkung eines PIST-*knockdown*s in EHT-Systemen (*engineered heart tissue*) auf die Isoproterenol-induzierte Kontraktion von Herzmuskelgeweben analysiert werden.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war die Etablierung und Analyse einer PIST-*knockout-first* Linie, die einen ersten Einblick in die physiologischen Veränderungen bei PIST-Reduktion im zentralen Nervensystem verschafft. Im Rahmen dieser Arbeit wurde bewiesen, dass die Proteinzusammensetzung der Postsynapse in PIST-heterozygoten und in PIST-*knockout*-Mäusen deutlich verändert ist. Außerdem ist die Aktivität der MAPK- und AKT-Signalwege im zentralen Nervensystem stark reduziert. Die wichtige Funktion von Neuroligin in der Synaptogenese lässt vermuten, dass die Synapsenbildung in PIST-reduzierten Mäusen ebenfalls verändert ist. Durch eine Kooperation mit der Firma Evotec soll die Menge und Morphologie der Synapsen in PIST-reduzierten Tieren ermittelt und so weitere Erkenntnisse über die Funktion von PIST gesammelt werden.

Die Lokalisation von PIST im TGN von Golgi-Ausläufern von Dendriten lässt vermuten, dass ein Teil der Sortierung von Membranproteinen hier vermittelt wird. Die Golgi-Ausläufer in Dendriten sind wichtig für die Regulation von Proteinkomplexen an der Postsynapse (Horton und Ehlers 2003). Ob PIST hier ähnliche Funktionen übernimmt wie im TGN im Zellkörper oder ob hier spezialisierte Prozesse ablaufen, ist eine interessante Fragestellung für weitere Untersuchungen. Hierbei ist auch die Beteiligung von Motorproteinen ein möglicher Faktor. Verschiedene PDZ-Domänenproteine interagieren beispielsweise mit dem Motorprotein KIF1B, dessen Mutation zu neuropathologischen Erkrankungen führen kann (Mok et al. 2002; Zhao et al. 2001). Dieser Aspekt ist für PIST noch völlig unklar.

Die Auswirkungen der Veränderungen im zentralen Nervensystem bei reduzierter PIST-Proteinmenge sollten in Zukunft auch durch Verhaltensexperimente analysiert werden. Hierfür bieten sich zunächst generelle Verhaltensexperimente, wie die Analyse von Angstverhalten und Erinnerungsvermögen durch *fear conditioning* und *Morris water maze*-Experimente an. Laut der Datenbank *Decipher* ist bei Patienten, denen die PIST-kodierende genomische Region fehlt, häufig Autismus und mentale Retardierung diagnostiziert. Diese Aspekte könnten beispielsweise durch Ultraschall-Kommunikationstests überprüft werden.

Zusammengenommen konnte diese Arbeit einen weiteren Beitrag zum Verständnis der Funktion von durch PDZ-Domänen vermittelten Interaktionen an subzellulären Membranen leisten. Verschiedene interessante Aspekte wurden hierbei aufgezeigt, werden jedoch weitere Forschung benötigen um die hierbei ablaufenden Prozesse vollständig aufzuklären.

Literaturverzeichnis

Abou-Haila, A.; Tulsiani, D. R. (2000): **Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function**. *Arch. Biochem. Biophys.* 379 (2), S. 173–182.

Achour, Lamia; Labbé-Jullié, Catherine; Scott, Mark G H; Marullo, Stefano (2008): **An escort for GPCRs: implications for regulation of receptor density at the cell surface**. *Trends Pharmacol. Sci.* 29 (10), S. 528–535.

Aoki, C.; Joh, T. H.; Pickel, V. M. (1987): **Ultrastructural localization of beta-adrenergic receptor-like immunoreactivity in the cortex and neostriatum of rat brain**. *Brain Res.* 437 (2), S. 264–282.

Appenzeller-Herzog, Christian; Hauri, Hans-Peter (2006): **The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function**. *J. Cell. Sci.* 119 (Pt 11), S. 2173–2183.

Araç, Demet; Boucard, Antony A.; Ozkan, Engin; Strop, Pavel; Newell, Evan; Südhof, Thomas C.; Brunger, Axel T. (2007): **Structures of neuroligin-1 and the neuroligin-1/neurexin-1 beta complex reveal specific protein-protein and protein-Ca2+ interactions**. *Neuron* 56 (6), S. 992–1003.

Ardura, Juan A.; Friedman, Peter A. (2011): **Regulation of G protein-coupled receptor function by Na+/H+ exchange regulatory factors**. *Pharmacol. Rev.* 63 (4), S. 882–900.

Bai, T. R.; Mak, J. C.; Barnes, P. J. (1992): **A comparison of beta-adrenergic receptors and in vitro relaxant responses to isoproterenol in asthmatic airway smooth muscle**. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 6 (6), S. 647–651.

Bauch, Carola; Koliwer, Judith; Buck, Friedrich; Hönck, Hans-Hinrich; Kreienkamp, Hans-Jürgen (2014): **Subcellular sorting of the G-protein coupled mouse somatostatin receptor 5 by a network of PDZ-domain containing proteins**. *PLoS ONE* 9 (2), S. e88529.

Bergbrede, Tim; Chuky, Nam; Schoebel, Stefan; Blankenfeldt, Wulf; Geyer, Matthias; Fuchs, Evelyn et al. (2009): **Biophysical analysis of the interaction of Rab6a GTPase with its effector domains**. *J. Biol. Chem.* 284 (5), S. 2628–2635.

Bhalla, Akhil; Vetanovetz, Christopher P.; Morel, Etienne; Chamoun, Zeina; Di Paolo, Gilbert; Small, Scott A. (2012): **The location and trafficking routes of the neuronal retromer and its role in amyloid precursor protein transport**. *Neurobiol. Dis.* 47 (1), S. 126–134.

Bitner-Glindzicz, M.; Lindley, K. J.; Rutland, P.; Blaydon, D.; Smith, V. V.; Milla, P. J. et al. (2000): **A recessive contiguous gene deletion causing infantile hyperinsulinism, enteropathy and deafness identifies the Usher type 1C gene**. *Nat. Genet.* 26 (1), S. 56–60.

Bjerggaard, Christian; Fog, Jacob U.; Hastrup, Hanne; Madsen, Kenneth; Loland, Claus J.; Javitch, Jonathan A.; Gether, Ulrik (2004): **Surface targeting of the dopamine transporter involves discrete epitopes in the distal C terminus but does not require canonical PDZ domain interactions**. *J. Neurosci.* 24 (31), S. 7024–7036.

Boeckers, T. M.; Kreutz, M. R.; Winter, C.; Zuschratter, W.; Smalla, K. H.; Sanmarti-Vila, L. et al. (1999): **Proline-rich synapse-associated protein-1/cortactin binding protein 1 (ProSAP1/CortBP1) is a PDZ-domain protein highly enriched in the postsynaptic density**. *J. Neurosci.* 19 (15), S. 6506–6518.

Bogan, Jonathan S.; Rubin, Bradley R.; Yu, Chenfei; Löffler, Michael G.; Orme, Charisse M.; Belman, Jonathan P. et al. (2012): **Endoproteolytic cleavage of TUG protein regulates GLUT4 glucose transporter translocation**. *J. Biol. Chem.* 287 (28), S. 23932–23947.

Bonifacino, Juan S.; Glick, Benjamin S. (2004): **The mechanisms of vesicle budding and fusion**. *Cell* 116 (2), S. 153–166.

Bonifacino, Juan S.; Rojas, Raul (2006): **Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network**. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7 (8), S. 568–579.

Brummelkamp, Thijn R.; Bernards, René; Agami, Reuven (2002): **A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells**. *Science* 296 (5567), S. 550–553.

Cai, Lei; Loo, Li Shen; Atlashkin, Vadim; Hanson, Brendon J.; Hong, Wanjin (2011): **Deficiency of sorting nexin 27 (SNX27) leads to growth retardation and elevated levels of N-methyl-D-aspartate receptor 2C (NR2C)**. *Mol. Cell. Biol.* 31 (8), S. 1734–1747.

Cash, R.; Raisman, R.; Lanfumey, L.; Ploska, A.; Agid, Y. (1986): **Cellular localization of adrenergic receptors in rat and human brain**. *Brain Res.* 370 (1), S. 127–135.

Charest, A.; Lane, K.; McMahon, K.; Housman, D. E. (2001): **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 (31), S. 29456–29465.

Chen, Annie; Gössling, Enno K.; Witkowski, Leora; Bhindi, Amar; Bauch, Carola; Roussy, Geneviève et al. (2012): **Regional and subcellular distribution of the receptor-targeting protein PIST in the rat central nervous system**. *J. Comp. Neurol.* 520 (5), S. 889–913.

Chen, H. J.; Rojas-Soto, M.; Oguni, A.; Kennedy, M. B. (1998): **A synaptic Ras-GTPase activating protein (p135 SynGAP) inhibited by CaM kinase II**. *Neuron* 20 (5), S. 895–904.

Chen, L.; Chetkovich, D. M.; Petralia, R. S.; Sweeney, N. T.; Kawasaki, Y.; Wenthold, R. J. et al. (2000): **Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms**. *Nature* 408 (6815), S. 936–943.

Cheng, Jie; Moyer, Bryan D.; Milewski, Michal; Loffing, Johannes; Ikeda, Masahiro; Mickle, John E. et al. (2002): **A Golgi-associated PDZ domain protein modulates cystic fibrosis transmembrane regulator plasma membrane expression**. *J. Biol. Chem.* 277 (5), S. 3520–3529.

Cheng, Jie; Wang, Hua; Guggino, William B. (2004): **Modulation of mature cystic fibrosis transmembrane regulator protein by the PDZ domain protein CAL**. *J. Biol. Chem.* 279 (3), S. 1892–1898.

Cheng, Jie; Wang, Hua; Guggino, William B. (2005): **Regulation of cystic fibrosis transmembrane regulator trafficking and protein expression by a Rho family small GTPase TC10**. *J. Biol. Chem.* 280 (5), S. 3731–3739.

Cheng, Shan; Zhang, Jiuqin; Zhu, Ping; Ma, Yanmei; Xiong, Ying; Sun, Licui et al. (2010a): **The PDZ domain protein CAL interacts with mGluR5a and modulates receptor expression**. *J. Neurochem.* 112 (3), S. 588–598.

Cheng, Zhijie; Garvin, Denise; Paguio, Aileen; Stecha, Pete; Wood, Keith; Fan, Frank (2010b): **Luciferase Reporter Assay System for Deciphering GPCR Pathways**. *Curr Chem Genomics* 4, S. 84–91.

Chih, Ben; Afridi, Shehla Khan; Clark, Lorraine; Scheiffele, Peter (2004): **Disorder-associated mutations lead to functional inactivation of neuroligins**. *Hum. Mol. Genet.* 13 (14), S. 1471–1477.

Cho, K. O.; Hunt, C. A.; Kennedy, M. B. (1992): **The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the Drosophila discs-large tumor suppressor protein**. *Neuron* 9 (5), S. 929–942.

Chubykin, Alexander A.; Atasoy, Deniz; Etherton, Mark R.; Brose, Nils; Kavalali, Ege T.; Gibson, Jay R.; Südhof, Thomas C. (2007): **Activity-dependent validation of excitatory versus inhibitory synapses by neuroligin-1 versus neuroligin-2**. *Neuron* 54 (6), S. 919–931.

Coligan, John E.; Bierer, Barbara E.; Margulies, David H.; Shevach, Ethan M.; Strober, Warren (2001): **Current Protocols in Immunology**. Hoboken, NJ, USA*:* John Wiley & Sons, Inc.

Collins, Brett M.; Norwood, Suzanne J.; Kerr, Markus C.; Mahony, Donna; Seaman, Matthew N J; Teasdale, Rohan D.; Owen, David J. (2008): **Structure of Vps26B and mapping of its interaction with the retromer protein complex**. *Traffic* 9 (3), S. 366–379.

Conn, P. J.; Pin, J. P. (1997): **Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors**. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37, S. 205–237.

Crump, F. T.; Dillman, K. S.; Craig, A. M. (2001): **cAMP-dependent protein kinase mediates activity-regulated synaptic targeting of NMDA receptors**. *J. Neurosci.* 21 (14), S. 5079–5088.

Cuadra, Adolfo E.; Kuo, Sheng-Han; Kawasaki, Yoshimi; Bredt, David S.; Chetkovich, Dane M. (2004): **AMPA receptor synaptic targeting regulated by stargazin interactions with the Golgi-resident PDZ protein nPIST**. *J. Neurosci.* 24 (34), S. 7491–7502.

Davis, C. G.; Lehrman, M. A.; Russell, D. W.; Anderson, R. G.; Brown, M. S.; Goldstein, J. L. (1986): **The J.D. mutation in familial hypercholesterolemia: amino acid substitution in cytoplasmic domain impedes internalization of LDL receptors**. *Cell* 45 (1), S. 15–24.

Devic, E.; Xiang, Y.; Gould, D.; Kobilka, B. (2001): **Beta-adrenergic receptor subtype-specific signaling in cardiac myocytes from beta(1) and beta(2) adrenoceptor knockout mice**. *Mol. Pharmacol.* 60 (3), S. 577–583.

DeWire, Scott M.; Ahn, Seungkirl; Lefkowitz, Robert J.; Shenoy, Sudha K. (2007): **Beta-arrestins and cell signaling**. *Annu. Rev. Physiol.* 69, S. 483–510.

Doczi, Megan A.; Damon, Deborah H.; Morielli, Anthony D. (2011): **A C-terminal PDZ binding domain modulates the function and localization of Kv1.3 channels**. *Exp. Cell Res.* 317 (16), S. 2333–2341.

Dong, Chunmin; Zhou, Fuguo; Fugetta, Erin K.; Filipeanu, Catalin M.; Wu, Guangyu (2008): **Endoplasmic reticulum export of adrenergic and angiotensin II receptors is differentially regulated by Sar1 GTPase**. *Cell. Signal.* 20 (6), S. 1035–1043.

Doyle, D. A.; Lee, A.; Lewis, J.; Kim, E.; Sheng, M.; MacKinnon, R. (1996): **Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ**. *Cell* 85 (7), S. 1067–1076.

Dresbach, Thomas; Neeb, Antje; Meyer, Guido; Gundelfinger, Eckart D.; Brose, Nils (2004): **Synaptic targeting of neuroligin is independent of neurexin and SAP90/PSD95 binding**. *Mol. Cell. Neurosci.* 27 (3), S. 227–235.

Ehlers, Michael D. (2003): **Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system**. *Nat. Neurosci.* 6 (3), S. 231–242.

Fogel, Adam I.; Li, Yue; Giza, Joanna; Wang, Qing; Lam, Tukiet T.; Modis, Yorgo; Biederer, Thomas (2010): **N-glycosylation at the SynCAM (synaptic cell adhesion molecule) immunoglobulin interface modulates synaptic adhesion**. *J. Biol. Chem.* 285 (45), S. 34864–34874.

Futai, Kensuke; Kim, Myung Jong; Hashikawa, Tsutomu; Scheiffele, Peter; Sheng, Morgan; Hayashi, Yasunori (2007): **Retrograde modulation of presynaptic release probability through signaling mediated by PSD-95-neuroligin**. *Nat. Neurosci.* 10 (2), S. 186–195.

Galandrin, Ségolène; Bouvier, Michel (2006): **Distinct signaling profiles of beta1 and beta2 adrenergic receptor ligands toward adenylyl cyclase and mitogen-activated protein kinase reveals the pluridimensionality of efficacy**. *Mol. Pharmacol.* 70 (5), S. 1575–1584.

Gallagher, Sean M.; Daly, Christine A.; Bear, Mark F.; Huber, Kimberly M. (2004): **Extracellular signal-regulated protein kinase activation is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression in hippocampal area CA1**. *J. Neurosci.* 24 (20), S. 4859–4864.

Gentzsch, Martina; Cui, Liying; Mengos, April; Chang, Xiu-Bao; Chen, Jey-Hsin; Riordan, John R. (2003): **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 (8), S. 6440–6449.

Greaves, Jennifer; Carmichael, Juliet A.; Chamberlain, Luke H. (2011): **The palmitoyl transferase DHHC2 targets a dynamic membrane cycling pathway: regulation by a C-terminal domain**. *Mol. Biol. Cell* 22 (11), S. 1887–1895.

Green, S. A.; Holt, B. D.; Liggett, S. B. (1992): **Beta 1- and beta 2-adrenergic receptors display subtype-selective coupling to Gs**. *Mol. Pharmacol.* 41 (5), S. 889–893.

Griffin, Courtney T.; Trejo, JoAnn; Magnuson, Terry (2005): **Genetic evidence for a mammalian retromer complex containing sorting nexins 1 and 2**. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (42), S. 15173–15177.

Hall, R. A.; Premont, R. T.; Chow, C. W.; Blitzer, J. T.; Pitcher, J. A.; Claing, A. et al. (1998): **The beta2-adrenergic receptor interacts with the Na+/H+-exchanger regulatory factor to control Na+/H+ exchange**. *Nature* 392 (6676), S. 626–630.

Hanson, A. S.; Linas, S. L. (1995): **Beta-adrenergic receptor function in rat proximal tubule epithelial cells in culture**. *Am. J. Physiol.* 268 (4 Pt 2), S. F553-60.

Hardingham, G. E.; Arnold, F. J.; Bading, H. (2001): **A calcium microdomain near NMDA receptors: on switch for ERK-dependent synapse-to-nucleus communication**. *Nat. Neurosci.* 4 (6), S. 565–566.

Harris, B. Z.; Lim, W. A. (2001): **Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly**. *J. Cell. Sci.* 114 (Pt 18), S. 3219–3231.

Harris, K. M.; Stevens, J. K. (1989): **Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics**. *J. Neurosci.* 9 (8), S. 2982–2997.

Hashimoto, K.; Fukaya, M.; Qiao, X.; Sakimura, K.; Watanabe, M.; Kano, M. (1999): **Impairment of AMPA receptor function in cerebellar granule cells of ataxic mutant mouse stargazer**. *J. Neurosci.* 19 (14), S. 6027–6036.

Hassel, Burkhard; Schreff, Matthias; Stube, Eva-Maria; Blaich, Uta; Schumacher, Stefan (2003): **CALEB/NGC interacts with the Golgi-associated protein PIST**. *J. Biol. Chem.* 278 (41), S. 40136–40143.

He, Junqi; Bellini, Michele; Xu, Jianguo; Castleberry, Amanda M.; Hall, Randy A. (2004): **Interaction with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-associated ligand (CAL) inhibits beta1-adrenergic receptor surface expression**. *J. Biol. Chem.* 279 (48), S. 50190–50196.

Hebert, Daniel N.; Molinari, Maurizio (2007): **In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases**. *Physiol. Rev.* 87 (4), S. 1377–1408.

Hicks, Stuart W.; Machamer, Carolyn E. (2005): **Isoform-specific interaction of golgin-160 with the Golgi-associated protein PIST**. *J. Biol. Chem.* 280 (32), S. 28944–28951.

Hirao, K.; Hata, Y.; Ide, N.; Takeuchi, M.; Irie, M.; Yao, I. et al. (1998): **A novel multiple PDZ domain-containing molecule interacting with N-methyl-D-aspartate receptors and neuronal cell adhesion proteins**. *J. Biol. Chem.* 273 (33), S. 21105–21110.

Hopkins, W. F.; Johnston, D. (1988): **Noradrenergic enhancement of long-term potentiation at mossy fiber synapses in the hippocampus**. *J. Neurophysiol.* 59 (2), S. 667–687.

Horton, April C.; Ehlers, Michael D. (2003): **Dual modes of endoplasmic reticulum-to-Golgi transport in dendrites revealed by live-cell imaging**. *J. Neurosci.* 23 (15), S. 6188–6199.

Hou, Lingfei; Klann, Eric (2004): **Activation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression**. *J. Neurosci.* 24 (28), S. 6352–6361.

Hu, L. A.; Tang, Y.; Miller, W. E.; Cong, M.; Lau, A. G.; Lefkowitz, R. J.; Hall, R. A. (2000): **beta 1-adrenergic receptor association with PSD-95. Inhibition of receptor internalization and facilitation of beta 1-adrenergic receptor interaction with N-methyl-D-aspartate receptors**. *J. Biol. Chem.* 275 (49), S. 38659–38666.

Huber, K. M.; Roder, J. C.; Bear, M. F. (2001): **Chemical induction of mGluR5- and protein synthesis--dependent long-term depression in hippocampal area CA1**. *J. Neurophysiol.* 86 (1), S. 321–325.

Ichtchenko, K.; Hata, Y.; Nguyen, T.; Ullrich, B.; Missler, M.; Moomaw, C.; Südhof, T. C. (1995): **Neuroligin 1: a splice site-specific ligand for beta-neurexins**. *Cell* 81 (3), S. 435–443.

Ichtchenko, K.; Nguyen, T.; Südhof, T. C. (1996): **Structures, alternative splicing, and neurexin binding of multiple neuroligins**. *J. Biol. Chem.* 271 (5), S. 2676–2682.

Imamura, Fumiaki; Maeda, Shoji; Doi, Tomoko; Fujiyoshi, Yoshinori (2002): **Ligand binding of the second PDZ domain regulates clustering of PSD-95 with the Kv1.4 potassium channel**. *J. Biol. Chem.* 277 (5), S. 3640–3646.

Irannejad, Roshanak; Tomshine, Jin C.; Tomshine, Jon R.; Chevalier, Michael; Mahoney, Jacob P.; Steyaert, Jan et al. (2013): **Conformational biosensors reveal GPCR signalling from endosomes**. *Nature* 495 (7442), S. 534–538.

Irie, M.; Hata, Y.; Takeuchi, M.; Ichtchenko, K.; Toyoda, A.; Hirao, K. et al. (1997): **Binding of neuroligins to PSD-95**. *Science* 277 (5331), S. 1511–1515.

Ito, Chizuru; Suzuki-Toyota, Fumie; Maekawa, Mamiko; Toyama, Yoshiro; Yao, Ryoji; Noda, Tetsuo; Toshimori, Kiyotaka (2004): **Failure to assemble the peri-nuclear structures in GOPC deficient spermatids as found in round-headed spermatozoa**. *Arch. Histol. Cytol.* 67 (4), S. 349–360.

Ito, Hidenori; Iwamoto, Ikuko; Mizutani, Kosuke; Morishita, Rika; Deguchi, Takashi; Nozawa, Yoshinori et al. (2006a): **Possible interaction of a Rho effector, Rhotekin, with a PDZ-protein, PIST, at synapses of hippocampal neurons**. *Neurosci. Res.* 56 (2), S. 165–171.

Ito, Hidenori; Iwamoto, Ikuko; Morishita, Rika; Nozawa, Yoshinori; Asano, Tomiko; Nagata, Koh-Ichi (2006b): **Identification of a PDZ protein, PIST, as a binding partner for Rho effector Rhotekin: biochemical and cell-biological characterization of Rhotekin-PIST interaction**. *Biochem. J.* 397 (3), S. 389–398.

Jaber, M.; Koch, W. J.; Rockman, H.; Smith, B.; Bond, R. A.; Sulik, K. K. et al. (1996): **Essential role of beta-adrenergic receptor kinase 1 in cardiac development and function**. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (23), S. 12974–12979.

Jamain, Stéphane; Betancur, Catalina; Giros, Bruno; Leboyer, Marion; Bourgeron, Thomas (2003a): **La génétique de l'autisme**. *Med Sci (Paris)* 19 (11), S. 1081–1090.

Jamain, Stéphane; Quach, Hélène; Betancur, Catalina; Råstam, Maria; Colineaux, Catherine; Gillberg, I. Carina et al. (2003b): **Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism**. *Nat. Genet.* 34 (1), S. 27–29.

Jeleń, Filip; Oleksy, Arkadiusz; Smietana, Katarzyna; Otlewski, Jacek (2003): **PDZ domains - common players in the cell signaling**. *Acta Biochim. Pol.* 50 (4), S. 985–1017.

Jia, Z.; Lu, Y. M.; Agopyan, N.; Roder, J. (2001): **Gene targeting reveals a role for the glutamate receptors mGluR5 and GluR2 in learning and memory**. *Physiol. Behav.* 73 (5), S. 793–802.

Karthikeyan, S.; Leung, T.; Birrane, G.; Webster, G.; Ladias, J. A. (2001): **Crystal structure of the PDZ1 domain of human Na(+)/H(+) exchanger regulatory factor provides insights into the mechanism of carboxyl-terminal leucine recognition by class I PDZ domains**. *J. Mol. Biol.* 308 (5), S. 963–973.

Kennedy, M. B. (1995): **Origin of PDZ (DHR, GLGF) domains**. *Trends Biochem. Sci.* 20 (9), S. 350.

Kessels, Helmut W.; Malinow, Roberto (2009): **Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior**. *Neuron* 61 (3), S. 340–350.

Kim, E.; Niethammer, M.; Rothschild, A.; Jan, Y. N.; Sheng, M. (1995): **Clustering of Shaker-type K+ channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases**. *Nature* 378 (6552), S. 85–88.

Kirchhausen, T. (1999): **Adaptors for clathrin-mediated traffic**. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, S. 705–732.

Komiyama, Noboru H.; Watabe, Ayako M.; Carlisle, Holly J.; Porter, Karen; Charlesworth, Paul; Monti, Jennifer et al. (2002): **SynGAP regulates ERK/MAPK signaling, synaptic plasticity, and learning in the complex with postsynaptic density 95 and NMDA receptor**. *J. Neurosci.* 22 (22), S. 9721–9732.

Kornau, H. C.; Schenker, L. T.; Kennedy, M. B.; Seeburg, P. H. (1995): **Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95**. *Science* 269 (5231), S. 1737–1740.

Kotowski, Sarah J.; Hopf, F. Woodward; Seif, Taban; Bonci, Antonello; Zastrow, Mark von (2011): **Endocytosis promotes rapid dopaminergic signaling**. *Neuron* 71 (2), S. 278–290.

Lauffer, Benjamin E L; Melero, Cristina; Temkin, Paul; Lei, Cai; Hong, Wanjin; Kortemme, Tanja; Zastrow, Mark von (2010): **SNX27 mediates PDZ-directed sorting from endosomes to the plasma membrane**. *J. Cell Biol.* 190 (4), S. 565–574.

Letourneur, F.; Klausner, R. D. (1992): **A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains**. *Cell* 69 (7), S. 1143–1157.

Letts, V. A.; Felix, R.; Biddlecome, G. H.; Arikkath, J.; Mahaffey, C. L.; Valenzuela, A. et al. (1998): **The mouse stargazer gene encodes a neuronal Ca2+-channel gamma subunit**. *Nat. Genet.* 19 (4), S. 340–347.

Li, Xiang; Zhang, Jiahai; Cao, Zanxia; Wu, Jihui; Shi, Yunyu (2006): **Solution structure of GOPC PDZ domain and its interaction with the C-terminal motif of neuroligin**. *Protein Sci.* 15 (9), S. 2149–2158.

Liang, Wei; Austin, Steven; Hoang, Quang; Fishman, Peter H. (2003): **Resistance of the human beta 1-adrenergic receptor to agonist-mediated down-regulation. Role of the C terminus in determining beta-subtype degradation**. *J. Biol. Chem.* 278 (41), S. 39773–39781.

Liang, Wei; Curran, Patricia K.; Hoang, Quang; Moreland, R. Travis; Fishman, Peter H. (2004): **Differences in endosomal targeting of human (beta)1- and (beta)2-adrenergic receptors following clathrin-mediated endocytosis**. *J. Cell. Sci.* 117 (Pt 5), S. 723–734.

Linstedt, A. D.; Hauri, H. P. (1993): **Giantin, a novel conserved Golgi membrane protein containing a cytoplasmic domain of at least 350 kDa**. *Mol. Biol. Cell* 4 (7), S. 679–693.

Löffler, Michael G.; Birkenfeld, Andreas L.; Philbrick, Katerina M.; Belman, Jonathan P.; Habtemichael, Estifanos N.; Booth, Carmen J. et al. (2013): **Enhanced fasting glucose turnover in mice with disrupted action of TUG protein in skeletal muscle**. *J. Biol. Chem.* 288 (28), S. 20135–20150.

Loo, Li Shen; Tang, Ning; Al-Haddawi, Muthafar; Dawe, Gavin Stewart; Hong, Wanjin (2014): **A role for sorting nexin 27 in AMPA receptor trafficking**. *Nat Commun* 5, S. 3176.

Maltese, W. A. (1990): **Posttranslational modification of proteins by isoprenoids in mammalian cells**. *FASEB J.* 4 (15), S. 3319–3328.

Mao, Limin; Wang, John Q. (2003): **Group I metabotropic glutamate receptor-mediated calcium signalling and immediate early gene expression in cultured rat striatal neurons**. *Eur. J. Neurosci.* 17 (4), S. 741–750.

Marchese, A.; Benovic, J. L. (2001): **Agonist-promoted ubiquitination of the G protein-coupled receptor CXCR4 mediates lysosomal sorting**. *J. Biol. Chem.* 276 (49), S. 45509–45512.

Mehvar, R.; Brocks, D. R. (2001): **Stereospecific pharmacokinetics and pharmacodynamics of beta-adrenergic blockers in humans**. *J Pharm Pharm Sci* 4 (2), S. 185–200.

Merianda, Tanuja T.; Lin, Andrew C.; Lam, Joyce S.Y.; Vuppalanchi, Deepika; Willis, Dianna E.; Karin, Norman et al. (2009): **A functional equivalent of endoplasmic reticulum and Golgi in axons for secretion of locally synthesized proteins**. *Mol Cell Neurosci* 40 (2), S. 128–142.

Metzelaar, M. J.; Wijngaard, P. L.; Peters, P. J.; Sixma, J. J.; Nieuwenhuis, H. K.; Clevers, H. C. (1991): **CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells**. *J. Biol. Chem.* 266 (5), S. 3239–3245.

Meyer, Guido; Varoqueaux, Frederique; Neeb, Antje; Oschlies, Melanie; Brose, Nils (2004): **The complexity of PDZ domain-mediated interactions at glutamatergic synapses: a case study on neuroligin**. *Neuropharmacology* 47 (5), S. 724–733.

Migaud, M.; Charlesworth, P.; Dempster, M.; Webster, L. C.; Watabe, A. M.; Makhinson, M. et al. (1998): **Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein**. *Nature* 396 (6710), S. 433–439.

Mok, Hyejung; Shin, Hyewon; Kim, Seho; Lee, Jae-Ran; Yoon, Jiyoung; Kim, Eunjoon (2002): **Association of the kinesin superfamily motor protein KIF1Balpha with postsynaptic density-95 (PSD-95), synapse-associated protein-97, and synaptic scaffolding molecule PSD-95/discs large/zona occludens-1 proteins**. *J. Neurosci.* 22 (13), S. 5253–5258.

Mu, F. T.; Callaghan, J. M.; Steele-Mortimer, O.; Stenmark, H.; Parton, R. G.; Campbell, P. L. et al. (1995): **EEA1, an early endosome-associated protein. EEA1 is a conserved alpha-helical peripheral membrane protein flanked by cysteine "fingers" and contains a calmodulin-binding IQ motif**. *J. Biol. Chem.* 270 (22), S. 13503–13511.

Murphy, Jane E.; Padilla, Benjamin E.; Hasdemir, Burcu; Cottrell, Graeme S.; Bunnett, Nigel W. (2009): **Endosomes: a legitimate platform for the signaling train**. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106 (42), S. 17615–17622.

Nagura, Hitoshi; Ishikawa, Yasuyuki; Kobayashi, Katsunori; Takao, Keizo; Tanaka, Tomo; Nishikawa, Kouki et al. (2012): **Impaired synaptic clustering of postsynaptic density proteins and altered signal transmission in hippocampal neurons, and disrupted learning behavior in PDZ1 and PDZ2 ligand binding-deficient PSD-95 knockin mice**. *Mol Brain* 5, S. 43.

Naisbitt, S.; Kim, E.; Tu, J. C.; Xiao, B.; Sala, C.; Valtschanoff, J. et al. (1999): **Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin**. *Neuron* 23 (3), S. 569–582.

Nakagawa, Takatoshi; Asahi, Michio (2013): **β1-adrenergic receptor recycles via a membranous organelle, recycling endosome, by binding with sorting nexin27**. *J. Membr. Biol.* 246 (7), S. 571–579.

Nakanishi, Shigetada (1994): **Metabotropic glutamate receptors: Synaptic transmission, modulation, and plasticity**. *Neuron* 13 (5), S. 1031–1037.

Nam, Christine I.; Chen, Lu (2005): **Postsynaptic assembly induced by neurexin-neuroligin interaction and neurotransmitter**. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (17), S. 6137–6142.

Neudauer, C. L.; Joberty, G.; Macara, I. G. (2001): **PIST: a novel PDZ/coiled-coil domain binding partner for the rho-family GTPase TC10**. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280 (2), S. 541–547.

Neudauer, C. L.; Joberty, G.; Tatsis, N.; Macara, I. G. (1998): **Distinct cellular effects and interactions of the Rho-family GTPase TC10**. *Curr. Biol.* 8 (21), S. 1151–1160.

Niswender, Colleen M.; Jones, Carrie K.; Conn, P. Jeffrey (2005): **New therapeutic frontiers for metabotropic glutamate receptors**. *Curr Top Med Chem* 5 (9), S. 847–857.

Ohno, Yusuke; Kihara, Akio; Sano, Takamitsu; Igarashi, Yasuyuki (2006): **Intracellular localization and tissue-specific distribution of human and yeast DHHC cysteine-rich domain-containing proteins**. *Biochim. Biophys. Acta* 1761 (4), S. 474–483.

Pak, Youngshil; Pham, Nam; Rotin, Daniela (2002): **Direct binding of the beta1 adrenergic receptor to the cyclic AMP-dependent guanine nucleotide exchange factor CNrasGEF leads to Ras activation**. *Mol. Cell. Biol.* 22 (22), S. 7942–7952.

Palade, G. (1975): **Intracellular aspects of the process of protein synthesis**. *Science* 189 (4200), S. 347–358.

Perkinton, M. S.; Sihra, T. S.; Williams, R. J. (1999): **Ca(2+)-permeable AMPA receptors induce phosphorylation of cAMP response element-binding protein through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent stimulation of the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in neurons**. *J. Neurosci.* 19 (14), S. 5861–5874.

Pierce, Kristen L.; Premont, Richard T.; Lefkowitz, Robert J. (2002): **Seven-transmembrane receptors**. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3 (9), S. 639–650.

Reid, T.; Furuyashiki, T.; Ishizaki, T.; Watanabe, G.; Watanabe, N.; Fujisawa, K. et al. (1996): **Rhotekin, a new putative target for Rho bearing homology to a serine/threonine kinase, PKN, and rhophilin in the rho-binding domain**. *J. Biol. Chem.* 271 (23), S. 13556–13560.

Rybin, V. O.; Xu, X.; Lisanti, M. P.; Steinberg, S. F. (2000): **Differential targeting of beta -adrenergic receptor subtypes and adenylyl cyclase to cardiomyocyte caveolae. A mechanism to functionally regulate the cAMP signaling pathway**. *J. Biol. Chem.* 275 (52), S. 41447–41457.

Salmon, Patrick; Trono, Didier (2007): **Production and titration of lentiviral vectors**. *Curr Protoc Hum Genet* Chapter 12, S. Unit 12.10.

Saltiel, Alan R.; Pessin, Jeffrey E. (2002): **Insulin signaling pathways in time and space**. *Trends Cell Biol.* 12 (2), S. 65–71.

Sattler, R.; Xiong, Z.; Lu, W. Y.; Hafner, M.; MacDonald, J. F.; Tymianski, M. (1999): **Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein**. *Science* 284 (5421), S. 1845–1848.

Schapitz, Inga U.; Behrend, Bardo; Pechmann, Yvonne; Lappe-Siefke, Corinna; Kneussel, Silas J.; Wallace, Karen E. et al. (2010): **Neuroligin 1 is dynamically exchanged at postsynaptic sites**. *J. Neurosci.* 30 (38), S. 12733–12744.

Scheiffele, P.; Fan, J.; Choih, J.; Fetter, R.; Serafini, T. (2000): **Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons**. *Cell* 101 (6), S. 657–669.

Schnell, Eric; Sizemore, Max; Karimzadegan, Siavash; Chen, Lu; Bredt, David S.; Nicoll, Roger A. (2002): **Direct interactions between PSD-95 and stargazin control synaptic AMPA receptor number**. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (21), S. 13902–13907.

Schumacher, S.; Volkmer, H.; Buck, F.; Otto, A.; Tarnók, A.; Roth, S.; Rathjen, F. G. (1997): **Chicken acidic leucine-rich EGF-like domain containing brain protein (CALEB), a neural member of the EGF family of differentiation factors, is implicated in neurite formation**. *J. Cell Biol.* 136 (4), S. 895–906.

Seaman, M. N.; Marcusson, E. G.; Cereghino, J. L.; Emr, S. D. (1997): **Endosome to Golgi retrieval of the vacuolar protein sorting receptor, Vps10p, requires the function of the VPS29, VPS30, and VPS35 gene products**. *J. Cell Biol.* 137 (1), S. 79–92.

Seaman, M. N.; McCaffery, J. M.; Emr, S. D. (1998): **A membrane coat complex essential for endosome-to-Golgi retrograde transport in yeast**. *J. Cell Biol.* 142 (3), S. 665–681.

Shenoy, S. K.; McDonald, P. H.; Kohout, T. A.; Lefkowitz, R. J. (2001): **Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin**. *Science* 294 (5545), S. 1307–1313.

Shenoy, Sudha K.; Lefkowitz, Robert J. (2005): **Seven-transmembrane receptor signaling through beta-arrestin**. *Sci. STKE* 2005 (308), S. cm10.

Siemens, Jan; Kazmierczak, Piotr; Reynolds, Anna; Sticker, Melanie; Littlewood-Evans, Amanda; Müller, Ulrich (2002): **The Usher syndrome proteins cadherin 23 and harmonin form a complex by means of PDZ-domain interactions**. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (23), S. 14946–14951.

Siemens, Jan; Lillo, Concepcion; Dumont, Rachel A.; Reynolds, Anna; Williams, David S.; Gillespie, Peter G.; Müller, Ulrich (2004): **Cadherin 23 is a component of the tip link in hair-cell stereocilia**. *Nature* 428 (6986), S. 950–955.

Simonsen, A.; Gaullier, J. M.; D'Arrigo, A.; Stenmark, H. (1999): **The Rab5 effector EEA1 interacts directly with syntaxin-6**. *J. Biol. Chem.* 274 (41), S. 28857–28860.

Song, J. Y.; Ichtchenko, K.; Südhof, T. C.; Brose, N. (1999): **Neuroligin 1 is a postsynaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses**. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (3), S. 1100–1105.

Songyang, Z.; Fanning, A. S.; Fu, C.; Xu, J.; Marfatia, S. M.; Chishti, A. H. et al. (1997): **Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains**. *Science* 275 (5296), S. 73–77.

Sotgia, Federica; Razani, Babak; Bonuccelli, Gloria; Schubert, William; Battista, Michela; Lee, Hyangkyu et al. (2002): **Intracellular retention of glycosylphosphatidyl inositol-linked proteins in caveolin-deficient cells**. *Mol. Cell. Biol.* 22 (11), S. 3905–3926.

Steinberg, Florian; Gallon, Matthew; Winfield, Mark; Thomas, Elaine C.; Bell, Amanda J.; Heesom, Kate J. et al. (2013): **A global analysis of SNX27-retromer assembly and cargo specificity reveals a function in glucose and metal ion transport**. *Nat. Cell Biol.* 15 (5), S. 461–471.

Suzuki-Toyota, Fumie; Ito, Chizuru; Toyama, Yoshiro; Maekawa, Mamiko; Yao, Ryoji; Noda, Tetsuo; Toshimori, Kiyotaka (2004): **The coiled tail of the round-headed spermatozoa appears during epididymal passage in GOPC-deficient mice**. *Arch. Histol. Cytol.* 67 (4), S. 361–371.

Temkin, Paul; Lauffer, Ben; Jäger, Stefanie; Cimermancic, Peter; Krogan, Nevan J.; Zastrow, Mark von (2011): **SNX27 mediates retromer tubule entry and endosome-to-plasma membrane trafficking of signalling receptors**. *Nat. Cell Biol.* 13 (6), S. 715–721.

Thandi, Sukhwinder; Blank, Jonathan L.; Challiss, R A John (2002): **Group-I metabotropic glutamate receptors, mGlu1a and mGlu5a, couple to extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation via distinct, but overlapping, signalling pathways**. *J. Neurochem.* 83 (5), S. 1139–1153.

Tochio, H.; Zhang, Q.; Mandal, P.; Li, M.; Zhang, M. (1999): **Solution structure of the extended neuronal nitric oxide synthase PDZ domain complexed with an associated peptide**. *Nat. Struct. Biol.* 6 (5), S. 417–421.

Tohgo, Akira; Choy, Eric W.; Gesty-Palmer, Diane; Pierce, Kristen L.; Laporte, Stephane; Oakley, Robert H. et al. (2003): **The stability of the G protein-coupled receptor-beta-arrestin interaction determines the mechanism and functional consequence of ERK activation**. *J. Biol. Chem.* 278 (8), S. 6258–6267.

Tsao, P.; Cao, T.; Zastrow, M. von (2001): **Role of endocytosis in mediating downregulation of G-protein-coupled receptors**. *Trends Pharmacol. Sci.* 22 (2), S. 91–96.

Tsunoda, S.; Sierralta, J.; Zuker, C. S. (1998): **Specificity in signaling pathways: assembly into multimolecular signaling complexes**. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8 (4), S. 419–422.

Valdes, Julie L.; Tang, Jingrong; McDermott, Mark I.; Kuo, Jean-Cheng; Zimmerman, Seth P.; Wincovitch, Stephen M. et al. (2011): **Sorting nexin 27 protein regulates trafficking of a p21-activated kinase (PAK) interacting exchange factor (β-Pix)-G protein-coupled receptor kinase interacting protein (GIT) complex via a PDZ domain interaction**. *J. Biol. Chem.* 286 (45), S. 39403–39416.

Varoqueaux, Frédérique; Aramuni, Gayane; Rawson, Randi L.; Mohrmann, Ralf; Missler, Markus; Gottmann, Kurt et al. (2006): **Neuroligins determine synapse maturation and function**. *Neuron* 51 (6), S. 741–754.

Varoqueaux, Frédérique; Jamain, Stéphane; Brose, Nils (2004): **Neuroligin 2 is exclusively localized to inhibitory synapses**. *Eur. J. Cell Biol.* 83 (9), S. 449–456.

Waeber, C.; Rigo, M.; Chinaglia, G.; Probst, A.; Palacios, J. M. (1991): **Beta-adrenergic receptor subtypes in the basal ganglia of patients with Huntington's chorea and Parkinson's disease**. *Synapse* 8 (4), S. 270–280.

Wang, Xin; Zhao, Yingjun; Zhang, Xiaofei; Badie, Hedieh; Zhou, Ying; Mu, Yangling et al. (2013): **Loss of sorting nexin 27 contributes to excitatory synaptic dysfunction by modulating glutamate receptor recycling in Down's syndrome**. *Nat. Med.* 19 (4), S. 473–480.

Wente, Wolf; Stroh, Thomas; Beaudet, Alain; Richter, Dietmar; Kreienkamp, Hans-Jürgen (2005): **Interactions with PDZ domain proteins PIST/GOPC and PDZK1 regulate intracellular sorting of the somatostatin receptor subtype 5**. *J. Biol. Chem.* 280 (37), S. 32419–32425.

Westphal, R. S.; Tavalin, S. J.; Lin, J. W.; Alto, N. M.; Fraser, I. D.; Langeberg, L. K. et al. (1999): **Regulation of NMDA receptors by an associated phosphatase-kinase signaling complex**. *Science* 285 (5424), S. 93–96.

Williams, M. A.; Fukuda, M. (1990): **Accumulation of membrane glycoproteins in lysosomes requires a tyrosine residue at a particular position in the cytoplasmic tail**. *J. Cell Biol.* 111 (3), S. 955–966.

Winchester, B. G. (2001): **Lysosomal membrane proteins**. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 5 Suppl A, S. 11–19.

Winder, D. G.; Martin, K. C.; Muzzio, I. A.; Rohrer, D.; Chruscinski, A.; Kobilka, B.; Kandel, E. R. (1999): **ERK plays a regulatory role in induction of LTP by theta frequency stimulation and its modulation by beta-adrenergic receptors**. *Neuron* 24 (3), S. 715–726.

Xilouri, Maria; Papazafiri, Panagiota (2008): **Induction of Akt by endogenous neurosteroids and calcium sequestration in P19 derived neurons**. *Neurotox Res* 13 (3-4), S. 209–219.

Xu, J.; Paquet, M.; Lau, A. G.; Wood, J. D.; Ross, C. A.; Hall, R. A. (2001): **beta 1-adrenergic receptor association with the synaptic scaffolding protein membrane-associated guanylate kinase inverted-2 (MAGI-2). Differential regulation of receptor internalization by MAGI-2 and PSD-95**. *J. Biol. Chem.* 276 (44), S. 41310–41317.

Xu, Zhigang; Oshima, Kazuo; Heller, Stefan (2010): **PIST regulates the intracellular trafficking and plasma membrane expression of cadherin 23**. *BMC Cell Biol.* 11, S. 80.

Xu, Zhigang; Peng, Anthony W.; Oshima, Kazuo; Heller, Stefan (2008): **MAGI-1, a candidate stereociliary scaffolding protein, associates with the tip-link component cadherin 23**. *J. Neurosci.* 28 (44), S. 11269–11276.

Yao, R.; Maeda, T.; Takada, S.; Noda, T. (2001): **Identification of a PDZ domain containing Golgi protein, GOPC, as an interaction partner of frizzled**. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286 (4), S. 771–778.

Yao, Ryoji; Ito, Chizuru; Natsume, Yasuko; Sugitani, Yoshinobu; Yamanaka, Hitomi; Kuretake, Shoji et al. (2002): **Lack of acrosome formation in mice lacking a Golgi protein, GOPC**. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (17), S. 11211–11216.

Yue, Zhenyu; Horton, Antony; Bravin, Monica; DeJager, Philip L.; Selimi, Fekrije; Heintz, Nathaniel (2002): **A novel protein complex linking the delta 2 glutamate receptor and autophagy: implications for neurodegeneration in lurcher mice**. *Neuron* 35 (5), S. 921–933.

Zhang, Jiuqin; Cheng, Shan; Xiong, Ying; Ma, Yanmei; Luo, Dali; Jeromin, Andreas et al. (2008): **A novel association of mGluR1a with the PDZ scaffold protein CAL modulates receptor activity**. *FEBS Lett.* 582 (30), S. 4117–4124.

Zhang, Mingjie; Wang, Wenning (2003): **Organization of signaling complexes by PDZ-domain scaffold proteins**. *Acc. Chem. Res.* 36 (7), S. 530–538.

Zhao, C.; Takita, J.; Tanaka, Y.; Setou, M.; Nakagawa, T.; Takeda, S. et al. (2001): **Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta**. *Cell* 105 (5), S. 587–597.

Abbildungen

Abbildung 1.1 Transportwege von Membranproteinen zwischen subzellulären Kompartimenten und beteiligte Transportproteine. (aus: Bonifacino und Glick 2004) 5

Abbildung 1.2 Die Faltung der PDZ-Domänen von PSD-95 (A) und PIST (B). (modifiziert aus: Jeleń et al. 2003; Li et al. 2006) 8

Abbildung 1.3 Die Postsynaptische Dichte. (PSD; aus: Zhang und Wang 2003) 9

Abbildung 1.4 Die Domänenstruktur und Interaktionspartner von PIST. 10

Abbildung 1.5 Die entwicklungsabhängige Expression verschiedener Isoformen von PIST im Gehirn von Ratten. (aus: Ito et al. 2006a) 12

Abbildung 1.6 Signalwege G—Protein gekoppelter Rezeptoren. (modifiziert nach: Cheng et al. 2010b) 14

Abbildung 2.1 Schema der Internalisierungs- und Recyclingexperimente 38

Abbildung 3.1 PIST hemmt den Transport des β1ARs, aber nicht des β2ARs an die Zelloberfläche. Die Koexpression von PSD-95 hebt diesen Effekt auf. 43

Abbildung 3.2 Bei *knockdown* von PIST ist die Proteinmenge von β1AR an der Zelloberfläche signifikant erhöht. 44

Abbildung 3.3 β1AR ist bei jeweiliger Koexpression mit PIST und PSD-95, jedoch nicht mit SNX27 kolokalisiert. 45

Abbildung 3.4 Die Überexpression von PIST führt zur Reduktion der Agonist-induzierten Aktivität von β1AR. 46

Abbildung 3.5 Die Reduktion der Proteinmenge von PIST erhöht die Agonist-induzierte Aktivität von β1AR. 47

Abbildung 3.6 PIST verstärkt die Interaktion von β1AR mit PSD-95. 48

Abbildung 3.7 Die Reduktion der Proteinmenge von PIST durch siRNA führt zu einer verringerten Interaktion von β1AR mit PSD-95. 49

Abbildung 3.8 PIST hemmt das Recycling des β1AR. 51

Abbildung 3.9 Bei *knockdown* von PIST ist die Internalisierung von β1AR nicht signifikant beeinflusst; das Recycling ist dagegen signifikant gesteigert. 52

Abbildung 3.10 Die Verteilung von PIST in β1AR-überexprimierenden HEK293-T Zellen wird durch Stimulierung mit Isoproterenol verändert. 53

Abbildung 3.11 Der internalisierte β1AR und PIST kolokalisieren nicht im frühen Endosom. 54

Abbildung 3.12 PIST ist in β1AR-überexprimierenden Zellen nach Stimulierung durch Isoproterenol mit CD63, einem Markerprotein für das späte Endosom, kolokalisiert. 55

Abbildung 3.13 PIST und β1AR sind nach Stimulierung des Rezeptors nur zu einem geringen Anteil im Lysosom detektierbar. 56

Abbildung 3.14 Nach Stimulierung von β1AR ist PIST mit dem internalisierten Rezeptor und dem Retromer-Protein SNX1 kolokalisiert. 58

Abbildung 3.15 Nach Stimulierung von HEK293-T Zellen mit IBMX und Forskolin ist PIST breiter über die Zelle verteilt und mit SNX1 kolokalisiert. 59

Abbildung 3.16 Bei Überexpression von PIST wird der Abbau des β1AR verzögert. 60

Abbildung 3.17 In Spinalganglion-Neuronen wird PIST sowohl im Soma als auch in Dendriten von Giantin umrahmt. 61

Abbildung 3.18 In infizierten Hippocampus-Neuronen ist PIST-GFP in einer perinukleären Struktur, sowie den Dendriten lokalisiert. 62

Abbildung 3.19 Durch lentivirale Infektion von Cortex-Neuronen wurde die PIST-Expression effizient mittels RNA-Interferenz herunterreguliert. 64

Abbildung 3.20 Der *knockdown* von PIST in Cortexneuronen beeinflusst die Proteinmenge von verschiedenen Interaktionspartnern. 65

Abbildung 3.21 Die Aktivität der MAP-Kinase ERK und der AKT-Kinase sind bei *knockdown* von PIST reduziert. 66

Abbildung 3.22 Der PIST-*knockout targeting* Vektor. 67

Abbildung 3.23 Der Genotyp von Mäusen der PIST-*knockout*-Linien wurde durch PCR mit genomischer Maus-DNA als Template bestimmt. 67

Abbildung 3.24 Die Mauslinie PIST *knockout*-B04 bestand zu 62% aus PIST-heterozygoten, zu 37% aus Wildtyp- und zu 1% aus *knockout*-Tieren. 68

Abbildung 3.25 Die Proteinmenge von PIST ist im Hippocampus von heterozygoten Mäusen auf 62% reduziert. In *knockout*-Mäusen wurde kein PIST detektiert. 69

Abbildung 3.26 Die Proteinmenge von AMPA-Rezeptoren in der PSD vom Cortex PIST-heterozygoter Mäusen ist signifikant erhöht. 70

Abbildung 3.27 Die Menge von β1AR ist weder im gesamten Cortex, noch in der PSD von PIST-heterozygoten Mäusen signifikant verändert. 71

Abbildung 3.28 In heterozygoten Mäusen ist die PSD- und gesamte Proteinmenge von mGluR5 nicht verändert. 72

Abbildung 3.29 Neuroligin1 ist in PIST-heterozygoten Mäusen stärker in der PSD angereichert als in Wildtyp-Mäusen. 73

Abbildung 3.30 In der PSD von PIST-heterozygoten Mäusen sind signifikant weniger NMDA-Rezeptoren detektierbar als in Wildtyp-Mäusen. 74

Abbildung 3.31 Die Proteinmenge verschiedener Interaktionspartner ist insgesamt und in der PSD von PIST-*knockout* Mäusen verändert. 75

Abbildung 3.32 Der phosphorylierte Anteil der MAP-Kinase ERK ist im Hippocampus von PIST-heterozygoten Mäusen drastisch reduziert. 76

Abbildung 3.33 Die Aktivität der Proteinkinase AKT ist in PIST-heterozygoten Mäusen auf etwa 50% reduziert. 77

Abbildung 3.34 Die Aktivität der Proteinkinasen ERK und AKT ist in homozygoten PIST-*knockout*-Mäusen reduziert. 77

Abbildung 3.35 In PIST-heterozygoten und PIST-*knockout* Mäusen ist der Blutglukosespiegel reduziert. 78

Abbildung 4.1 PIST stabilisiert den endozytierten β1AR im späten Endosom. 85

Tabellen

Tabelle 2.1 Generierte Vektoren 25

Tabelle 2.2 Zur Verfügung gestellte Vektoren 25

Tabelle 2.3 Primärantikörper 26

Tabelle 2.4 Sekundärantikörper 27

Tabelle 2.5 DNA-Sequenzierung 30

Tabelle 2.6 Transfektionsansatz für Turbofect-Transfektion 33

Tabelle 2.7 SDS-PAGE 37

Tabelle 2.8 Genotypisierungs-PCR 40

Abkürzungen

°C	° Celsius
AKT	Proteinkinase B
AMPAR	α-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropionsäure
ATP	Adenosintriphosphat
β1AR	β1 adrenerger Rezeptor
β2AR	β2 adrenerger Rezeptor
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CC	Coiled-coil
CD	cluster of differentiation
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
COP	coat protein complex
DAPI	4',6'-Diamidin-2-Phenylindol
DIV	days in vitro
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
E.Coli	*Escherichia Coli*
EEA	early endosome antigen
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERGIC	ER-Golgi-Intermediärkompartiment
ERK	extracellular-signal regulated Kinase
FBS	fetales Kälberserum
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
h	Stunde
HBSS	Hank's balanced salt solution
HEK	human embryonic kidney
HRP	Meerrettichperoxidase
IP	Immunpräzipitation
LAMP	lysosome-associated membrane protein

LTD	Langzeitdepression
LTP	Langzeitpotenzierung
MAP	Mitogen-activated protein
MEM	Minimal Essential Medium
mGluR5	metabotroper Glutamatrezeptor 5
mRNA	messenger RNA
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDZ	PSD95/Disc large/ZO-1
PIST	protein interacting specifically with TC10
PM	Plasmamembran
PSD	Postsynaptische Dichte
R.	Rezeptor
RFP	Rot Fluoreszierendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	silencing RNA
SNX	Sorting Nexin
SSTR5	Somatostatinrezeptor 5
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
Tm	Schmelztemperatur
TUG	tether containing a UBX domain for Glut4

Danksagung

Mein erster und größter Dank gilt PD Dr. Hans-Jürgen Kreienkamp für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe diese Arbeit durchzuführen und für die Betreuung. Deine stetige Bereitschaft über das Projekt zu diskutieren und deine Anleitung zu selbstständiger wissenschaftlicher Arbeit haben mir ermöglicht mich in den drei Jahren ständig weiterzuentwickeln und das Projekt immer gut vorangebracht.

Bei Prof. Dr. Matthias Kneussel möchte ich mich für die Kobetreuung der Doktorarbeit und viele produktive Diskussionen bedanken, sowie für die Bereitschaft, das Zweitgutachten zu übernehmen.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Kreienkamp, Kindler, Kutsche und Rosenberger des Instituts für Humangenetik für die tolle Arbeitsatmosphäre, viel Spaß bei und neben der Arbeit und den Input bei unseren Seminaren bedanken. Vor allem die Zusammenarbeit mit Victoria Martens und Kristina Brand und unsere gegenseitige Unterstützung in wissenschaftlicher wie moralischer Hinsicht haben einen großen Teil dazu beigetragen, dass ich an meine Zeit als Doktorandin sehr gerne zurückdenken werde.

Während meines Auslandsaufenthalts in der Arbeitsgruppe von Zastrow an der UCSF, San Francisco, sind ein Teil der Daten und viele neue Ideen entstanden. Hierfür möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Mark von Zastrow, Dr. Minjong Park und dem GRK1459 für die Finanzierung bedanken.

Victoria Martens und Uwe Kny haben mir durch das kritische Korrekturlesen der Arbeit sehr geholfen.

Ich bin glücklich, dass ich Freunde habe, die immer für mich da sind und mich in jeglicher Hinsicht unterstützen. Mit euch macht das Leben einfach richtig viel Spaß.

Meine Familie gibt mir einen großen Rückhalt, der mir ermöglicht, mein Leben so zu leben wie ich es für richtig halte. Danke, dass ihr immer an mich glaubt, mir mit Rat und Tat helft und für mich da seid.

Wissenschaftlicher Werdegang

10/2005 bis 09/2008 Universität Potsdam
Studiengang: Biowissenschaften, Schwerpunkt Biochemie
Abschluss: Bachelor of Science, Note: 1,6

10/2008 bis 03/2011 Universität Potsdam
Studiengang: Biochemistry
Abschluss: Master of Science, Note: 1,1

seit 05/2011 UKE Hamburg
Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Mitglied des GRK1459 "Sorting and Interactions between Proteins of Subcellular Compartments", gefördert durch die DFG

04/2013 bis 06/2013 UCSF, San Francisco
Auslandsaufenthalt in der Arbeitsgruppe Mark von Zastrow, Department of Psychiatry

Veröffentlichungen

Bauch C, **Koliwer J**, Buck F, Hönck HH, Kreienkamp HJ; **Subcellular sorting of the G-protein coupled mouse somatostatin receptor 5 by a network of PDZ-domain containing proteins.** *PLoS One*, 2014

Koliwer J, Park M, von Zastrow M, Kreienkamp HJ; **PIST/GOPC stabilizes the β1-adrenergic receptor in intracellular compartments after internalization.** *eingereicht bei JBC,* 18.08.2014, JBC/2014/605725

Posterpräsentationen

32nd Blankenese Conference, Hamburg 05/2012

2nd International Symposium on Protein Trafficking in Health and Disease, Hamburg 09/2012

2nd UKE Microscopy Symposium, Hamburg 04/2014

34th Blankenese Conference, Hamburg 05/2014

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Judith Koliwer

Judith Koliwer