UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Humangenetik
Leitung: Professor Dr. med. Christian Kubisch

Die postsynaptische Lokalisierung des Proteins IRSp53 in Abhängigkeit seiner funktionellen Domänen

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:
Cord-Christian Becker
aus Heidelberg

Hamburg
im Dezember 2014

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 04.03.2015

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:	**PD Dr. Hans-Jürgen Kreienkamp**
Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:	**PD Dr. Evita Mohr**
Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in:	**Prof. Dr. med. Markus Glatzel**

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS ..... **III**

ABBILDUNGSVERZEICHNIS ..... **III**

TABELLENVERZEICHNIS ..... **IV**

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS ..... **V**

I GRUNDLAGEN UND ZIELSETZUNG **2**

1.1 GRUNDLAGEN **2**

1.2 PATHOPHYSIOLOGISCHE ROLLE DER POSTSYNAPTISCHEN DICHTE **4**

1.3 IRSP53 ..... **5**

1.3.1 IRSp53 als Multi-Domänenprotein mit vielen Bindungspartnern **5**
1.3.2 IRSp53 in der Postsynaptischen Dichte **8**

1.4 LENTIVIREN **9**

1.5 ZIELSETZUNG **9**

II MATERIAL UND METHODEN **2**

2.1 MATERIAL **2**

2.1.1 Organismen: Bakterienstämme, humane Zelllinien und Primärkulturen **2**
2.1.2 Klonierungsvektoren und DNA-Sequenzen **11**
2.1.3 Antikörper **12**
2.1.4 Restriktionsenzyme **13**
2.1.5 Technische und digitale Arbeitsgrundlagen **13**

2.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN **14**

2.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR) **14**
2.2.2 DNA-Restriktionsverdau **14**
2.2.3 Auffüllreaktion **15**
2.2.4 Agarosegelelektrophorese **15**
2.2.5 DNA-Extraktion aus Agarose **16**
2.2.6 Ligation **16**
2.2.7 Transformation von Plasmid-DNA in E. coli **16**
2.2.8 Isolierung von DNA aus kompetenten E. coli-Baktieren **17**
2.2.9 Photospektrometrische Messung der DNA-Konzentration **17**
2.2.10 Sequenzierung von Plasmid-DNA **18**

2.3 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN **18**

2.3.1 Kultivieren von *Human Embryonic Kidney (HEK)-293*-Zelllinien **18**
2.3.2 Transfektion von *HEK-293-*, *HEK-293T-* und *HEK-293FT*-Zellen **19**
2.3.3 Virusproduktion und -verwendung **20**
2.3.4 Isolation von Hippocampus -und Cortexneuronen aus Rattenembryonen **22**

2.3.5 STIMULIERUNG UND BLOCKADE DER AKTIVITÄT VON NEURONENKULTUREN 23

2.4 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN 24

2.4.1 FIXIERUNG VON KULTIVIERTEN HIPPOCAMPUSNEURONEN 24
2.4.2 IMMUNZYTOCHEMIE HIPPOCAMPALER RATTENNEURONE 24
2.4.3 BIOCHEMISCHE POSTSYNAPTISCHE DICHTEN-AUFREINIGUNG (PSD-PRÄPARATION) AUS KULTIVIERTEN CORTEXNEURONEN AUS RATTENEMBRYONEN 25
2.4.4 ZELLLYSE 26
2.4.5 NATRIUM (SODIUM)-DODECYLSULFAT-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE) 26
2.4.6 PROTEINTRANSFER DURCH *WESTERN BLOT* UND IMMUNDETEKTION VON PROTEINEN 27

2.5 AUSWERTUNG 28

2.5.1 QUANTIFIZIERUNG DER POSTSYNAPTISCHEN ANREICHERUNG VON IRSP53 28
2.5.2 STATISTISCHE AUSWERTUNG 30

III ERGEBNISSE 32

3.1 ETABLIERUNG DES LENTIVIRALEN VEKTORSYSTEMS 32

3.1.1 KONSTRUKTE VON IRSP53 34
3.1.2 GENETISCHE VERÄNDERUNGEN DES VEKTORS FUW 34
3.1.3 PRODUKTION DER VIREN 35

3.2 PROTEINBIOCHEMISCHE LOKALISATIONSSTUDIEN ZU IRSP53 36

3.2.1 TRANSLOKATION VON IRSP53 IN DIE PSD 37
3.2.2 PSD-LOKALISIERUNG VON IRSP53 IN ABHÄNGIGKEIT DER FUNKTIONELLEN DOMÄNEN 39

3.3 IMMUNZYTOCHEMISCHE LOKALISATIONSSTUDIEN ZU IRSP53 43

IV DISKUSSION 46

4.1 TRANSLOKATION VON IRSP53 IN DIE POSTSYNAPTISCHE DICHTE 47

4.2 DISKUSSION DER LOKALISIERUNGSSTUDIEN ZU IRSP53 48

V ZUSAMMENFASSUNG/ABSTRACT 55

VI LITERATURVERZEICHNIS 57

VII DANKSAGUNG 62

VIII LEBENSLAUF 63

IX EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG 64

X ANHANG 65

Abbildungsverzeichnis

1.1 Übersicht über Synapsenregion und ausgewählte Proteine der Postsynaptischen Dichte (PSD) 2
1.2 Lokalisierung von IRSp53 im Mäusehirn 5
1.3 Domänenstruktur von IRSp53 6
2.1 PSD-Aufreinigung aus Neuronen und Vorbereitung der quantitativen Auswertung 28
2.2 Manuelle Bandenmarkierung eines *Western Blot* im Programm *ImageLab* 29
2.3 Ermittlung des Bandenintegrals zur Proteinbestimmung durch das Programm *ImageLab* 29
3.1 Schematische Darstellung der expimierten Konstrukte von IRSp53 33
3.2 Gelelektrophorese des FUW-Vektors nach Restriktionsverdau mit BglII 35
3.3 *Western Blots* von RIPA-Lysaten aus transfizierten und infizierten HEK-Zellen 36
3.4 *Western Blots* von Proteinproben aus PSD-Aufreinigungen 37
3.5 *Western Blots* von PSD-Aufreinigungen nach TTX-Blockade und NMDA-Stimulierung 38
3.6 *Western Blots* von PSD-Aufreinigungen nach Infektion von Neuronen mit Lentiviren 40
3.7 Relative Anreicherung der GFP-IRSp53-Fusionsproteine 41
3.8 Immunzytochemische Studie In Hippocampusneuronen zur Lokalisierung von GFP und GFP-IRSp53-Konstrukten 44
4.1 Schematische Darstellung der Aktivierung von IRSp53 durch Cdc42 und anschließende Lokalisierung in der PSD 52

Tabellenverzeichnis

1.1 Einbau von IRSp53 in die PSD nach Choi et al. (2005) und Hori et al. (2005) 8
2.1 Organismen: Bakterienstämme, humane Zelllinien und Primärkulturen 10
2.2 Übersicht über die Ausgangsvektoren 11
2.3 Übersicht über in der Arbeitsgruppe bereits vorhandene Konstrukte 11
2.4 Übersicht über die hergestellten lentiviralen Vektoren aus FUW 11
2.5 Übersicht über die ermittelten Sequenzen aus Kontrollesequenzierungen der erzeugten FUW-Vektoren 12
2.6 Übersicht Primärantikörper 12
2.7 Übersicht Sekundärantikörper 13
2.8 Verwendete Restriktionenzyme 13
2.9 Technische und digitale Arbeitsgrundlagen 13
2.10 PCR-Reaktionsansatz 14
2.11 Restriktionsenzym-Reaktionsansatz 15
2.12 Ligationsreaktionsansatz 16
2.13 Reaktionsansatz für DNA-Sequenzierung nach Didesoxy-kettenabbruchmethode 18
2.14 Zusammensetzung des Zellmediums bei Kultivierung von HEK-293 FT-Zellen zur Produktion von Lentiviren 19
2.15 Zusammensetzung des Zellmediums zur Primärkultivierung von Neuronen 23
2.16 Zusammensetzung der Puffer für die Aufreinigung der Postsynaptischen Dichte 26
2.17 Ermittlung der Anreicherung des exprimierten IRSp53-Proteins 30
3.1 Einfache Varianzanalyse der Rekrutierung von IRSp53 in die PSD 38
3.2 Einfache Varianzanalyse der proteinbiochemischen IRSp53-Lokalisationsstudien 41
10.1 Bezugsquellen des Materials für molekukarbiologische Arbeiten 65
10.2 Bezugsquellen des Materials für zellbiologische Arbeiten 65
10.3 Bezugsquellen des Materials für proteinbiochemische Arbeiten 66
10.4 Zusammensetzung von Puffern und Lösungen 66
10.5 Kontrolle der FUW-Sequenz 67

Abkürzungsverzeichnis

AMPA	*α-Amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-Isoxazolepropionate*
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BAI	Brain-specific angiogenesis inhibitor
BAIAP2	Brain-specific angiogenesis inhibitor-associated protein 2
BAR	*Bin/Amphiphysin/RVS*
bp	Basenpaare
CaM	Calmodulin
CaMKII	Calmodulin-Kinase II
Cdc42	*Cell devision cycle 42*
CMV	Zytomegalievirus
CRIB	*Cdc42/rac interacting binding*
ddNTP	Didesoxyribonuleotidtriphosphat
df	Freiheitsgrade
DMEM	*Dulbecco's modified eagle medium*
DNA / cDNA	(komplementäre) Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E. coli	Escherichia coli
Eps8	*Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8*
F-Actin	Filamentäres Aktin
F-Bar	*FCH – Bin/Amphiphysin/RVS*
FBS	Fetales bovines Serum
FUW	*Flap-Ubiquitin Promoter-Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element*
g	Erdbeschleunigung (g = 9,81 m/s^2)

GFP / eGFP	*(enhanced) Green fluorescent protein*
HBSS	*Hank's balanced salt solution*
HEK 293 (T)	*Human embryonic kidney cells (T-Antigen)*
HEK 293 FT	*Human embryonic kidney cells (fast growing, SV 40 large T antigen)*
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	*Horseradish Peroxidase*
I-BAR	*Inverse Bin/Amphiphysin/Rvs*
IMD	*IRS/MIM homology*-Domäne
ID	*Intellectual disability*
IRSp53	Insulinrezeptor-Substrat mit einer Größe von 53kDa
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KO	*Knockout*
L27	*Lin-2 – Lin-7 – domain*
LB	*Lysogeny broth*
LIN7	*Lin-7 – protein*
LTD	Langzeitdepression
LTP	Langzeitpotenzierung
LTR	*Long terminal repeats*
mDia	*Mouse Diaphanous-related formin-1*
mena	*Mammalian enabled*
mGluR	*Metabotropic Glutamate Receptor*
mRNA	*messenger RNA*
N-WASP	*Neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein*
NMDA	N-Methyl-D-Asparaginsäure
NSC34-Zellen	*Neuroblastoma motoneuron-enriched spinal cord 34 – cells*

OD	Optische Dichte
p.c.	*post conceptionem*
PBS-T	*Phosphate buffered saline – Tween 20*
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDZ	*Postsynaptic density protein 95, Discs large, Zonula occludens 1*
PDZ-BM	*Postsynaptic density protein 95, Discs large, Zonula occludens 1* – Bindemotiv
PIP_2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLL	Poly-L-Lysin
PM	Plasmamembran
PSD	Postsynaptische Dichte
PSD-95	*Postsynaptic density 95 protein*
Rac	*Ras-related C3 botulinum toxin substrate*
Rho	*Ras homologous member*
RIPA	*Radioimmuneprecipitation assay buffer*
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (*revolutions per minute*)
SAQ	Summe der Abweichungsquadrate
SDS-PAGE	Natriumdodekylsulfat–Polyakrylamidgelelektrophorese
SH3	*Src-homology* 3
Shank	*SH3 domain and ankyrin repeat domains protein*
TBS-T	*Tris-Buffered saline – Tween* 20
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Azetat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTX	Tetrodotoxin

UV	Ultraviolett
VASP	*Vasodilator-stimulated phosphoprotein*
VGLUT1	*Vesicular glutamate transport – 1*
VSVG	*Vesicular stomatitis virus – Glycoprotein*
WASP	*Wiskott-Aldrich syndrome protein*
WAVE2	*WASP family verproline-homologue protein 2*
WB	*Western Blot*
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

I GRUNDLAGEN UND ZIELSETZUNG

1.1 Grundlagen

Lernen ist ein essentieller Prozess des menschlichen Lebens. Lernvorgänge unterliegen dem, was uns als Menschen ausmacht wie unserer Kommunikation mittels Sprache oder koordinierten Bewegungsabläufen. Das Syndrom Demenz nimmt Menschen die Fähigkeit, eigenständig zu leben. Nach der *International Classification of Diseases* (ICD-10) der Weltgesundheitsorganisation (WHO) verlieren Betroffene Gedächtnis, Denken, Orientierung, Auffassung, Rechnen, Lernfähigkeit, Sprache, Sprechen und die Fähigkeit zur Entscheidung (WHO, 2012).

In Nervenzellen finden bei der intakten Gedächtnisbildung mehrere Prozesse statt – das Korrelat für diese kognitiven Funktionen, Lernen und Vergessen, ist synaptische Plastizität. Erstmals postuliert wurde sie 1949 vom kanadischen Psychologen Donald Hebb: *„When an axon of cell A is near enough to excite a cell B and repeatedly or persistently takes part in firing it, some growth process or metabolic change takes place in one or both cells such that A's efficiency, as one of the cells firing B, is increased."* (Hebbsche Lernregel; Hebb, 1949) – Wenn ein Axon von Zelle A [...] wiederholt eine Zelle B erregt und sie wiederholt oder dauerhaft befeuert, findet in einer der oder beiden Zellen ein Wachstumsprozess oder eine Stoffwechselveränderung statt, sodass sich die Effizienz von A als befeuernder Zelle von B steigert. Molekularbiologisch ist dies am besten beschrieben anhand von Langzeitpotenzierung (LTP) und Langzeitdepression (LTD; Bear & Abraham, 1996; Bliss & Lømo, 1973). LTP ist die verstärkte Antwort einer Nervenzelle auf ein wiederholt und stark erregendes Transmitter-Signal (Bliss and Lømo, 1973). Sie findet an der aktivierten Synapse statt.

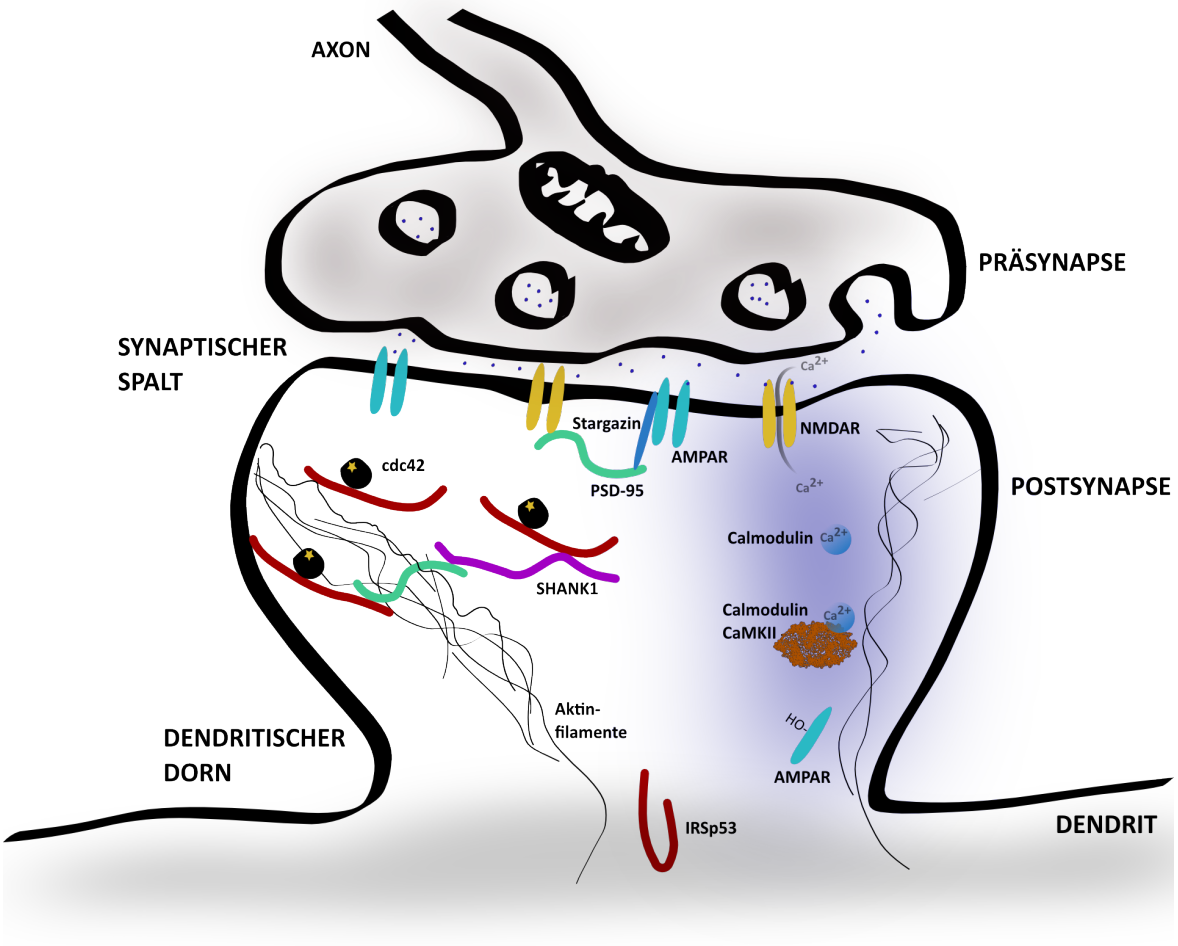

ABBILDUNG 1.1 ÜBERBLICK ÜBER SYNAPSENREGION UND AUSGEWÄHLTE PROTEINE DER POSTSYNAPTISCHEN DICHTE (PSD)

DARSTELLUNG EINER EXZITATORISCHEN SYNAPSE. DAS AXON DER VORGESCHALTETEN NERVENZELLE TRITT ÜBER DEN SYNAPTISCHEN SPALT MIT DEM DENDRITEN DER NACHGESCHALTETEN NERVENZELLE IN KONTAKT: ZUNÄCHST ERFOLGT DIE ERREGUNG DER NACHGESCHALTETEN NERVENZELLE DURCH AUSSCHÜTTUNG DES NEUTROTRANSMITTERS GLUTAMAT AUS DER PRÄSYNAPSE IN DEN SYNAPTISCHEN SPALT; DARAUFHIN BINDUNG DES GLUTAMAT AN IONOTROPE AMPA- UND NMDA-REZEPTOREN UND DEREN AKTIVIERUNG. HIERNACH (RECHTS IM BILD) EINSTROM VON CA^{2+}-IONEN, DIE NACH CAM-BINDUNG CAMKII AKTIVIEREN. CAMKII BEWIRKT VERMEHRTEN EINBAU VON AMPA-REZEPTOREN IN DER PSD-MEMBRAN UND GESTEIGERTE ANTWORT BEI ERNEUTER GLUTAMAT-STIMULATION (LTP); ZUDEM IM BILD: IRSP53 UND DIVERSE BINDEPARTNER; ABBILDUNG NACH Hassel & Dingledine, 2012.

Die Synapse ist ein spezialisierter Zwischenraum zwischen zwei Nervenzellen, über den diese miteinander in Kontakt treten. Sie ist aus einer vorgeschalteten Nervenzelle, einer nachgeschalteten Nervenzelle und dem dazwischen liegenden synaptischen Spalt aufgebaut. Hierein gibt die vorgeschaltete Nervenzelle (Präsynapse) einen chemischen Botenstoff ab; im Fall der exzitatorischen Synapsen im ZNS ist dies Glutamat. Glutamat diffundiert über den Spalt, der lediglich 15-20 nm beträgt, zur postsynaptischen Dichte (PSD) des nachgeschalteten Neurons (Palay, 1956). Die PSD ist ein Multi-Proteinkomplex und enthält als essentieller Bestandteil der neuronalen Signaltransduktion Glutamat-Rezeptoren und Proteine der postsynaptischen Signalübertragung, sowie Gerüstproteine

wie Mitglieder der PSD-95-, GKAP/SAPAP- und Shank-Familien (siehe Abbildung 1.1; Hassel & Dingledine, 2012). An der PSD aktiviert Glutamat membrangebundene Rezeptoren: die ionotropen AMPA (*α-Amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-Isoxazole-propionate*)– und NMDA (*N-Methyl-D-Aspartic Acid; NMDAR*)– Rezeptoren, sowie die metabotropen mGluR (*Metabotropic Glutamate Receptor*; Brady & Tai, 2012; Hassel & Dingledine, 2012).

LTP bedeutet Folgendes: Nach Aktivierung des AMPA-Rezeptors durch Glutamat strömen Na^{+}-Ionen in die PSD und depolarisieren die postsynaptische Membran. Dies stößt Mg^{2+}-Ionen aus den bis dahin blockierten NMDA-Rezeptoren. Bei Koinzidenz von Membrandepolarisation und Aktivierung des NMDAR durch einen besonders stark depolarisierenden Reiz ist der NMDA-Rezeptor durchlässig für den Einstrom extrazellulärer Ca^{2+}-Ionen. Die Ca^{2+}-Ionen initiieren infolgedessen diverse Signal-transduktionsprozesse. Der ankommende, chemische Stimulus des Neurotransmitters wird in der PSD in eine zellinterne Signalkaskade übersetzt (Hassel & Dingledine, 2012). Unter anderem findet über Calmodulin (CaM) und die Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMKII) intrazellulär eine Phosphorylierung von AMPA-Kanälen statt, sodass bis dahin nicht in der Synapse lokalisierte AMPA-Kanäle in die Membran eingebaut werden (schematisch in Abbildung 1.1; Xia & Storm, 2005). Bei erneuter Glutamat-Ausschüttung in den synaptischen Spalt führt nun dieselbe Anzahl an Glutamat-Molekülen zu einer gesteigerten Antwort des postsynaptischen Neurons (Bliss & Collingridge, 1993).

In Neuronen können zwischen den einzelnen Kompartimenten mit dem Nukleus als DNA-Träger und der Synapsenregion, in der Proteine zur korrekten Aufrechterhaltung der Zellfunktion benötigt werden, Abstände von über 1 m liegen. Teilweise beträgt der Zellkörper als Hautsyntheseort von Proteinen lediglich 0.1 % des gesamten Zellsomas (Morfini et al., 2012). Die Verbindung zwischen Synapse und Zellkern wird durch das Axon und die Dendriten hergestellt. Am Ende der Axone befindet sich die Präsynapse. Für Proteine gibt es vom Zellkern dorthin einen langsamen und einen schnellen Transport (Morfini et al., 2012). Der Transport vom Zellkern über den Dendriten zur postsynaptischen Dichte funktioniert dagegen folgendermaßen: Einerseits wird die mRNA selbst in die Dendriten transportiert (Martin & Zukin, 2006), sodass deren

Proteinbiosynthese direkt in der postsynaptischen Region stattfinden kann (Steward, 1995). Andererseits sind Rezeptoren über Gerüstproteine (z.B. GRIP) mit Motorproteinen (Kif5, Kif21 etc.) assoziiert. Es wird demnach angenommen, dass die Motorproteine über die Gerüstproteine ganze Vesikel mit den Rezeptoren (z.B. die AMPA- oder NMDA-Rezeptoren) in die PSD bewegen können (Setou et al., 2002). Für das Gerüstprotein PSD-95, das auch mit dem Insulinrezeptorsubstratprotein von 53kDa (IRSp53) eine Bindung eingeht, wird dementsprechend vermutet, dass es die PSD assoziiert an die zytoplasmatische Seite von Vesikeln erreicht (Chetkovich et al., 2002).

1.2 Pathophysiologische Rolle der Postsynaptischen Dichte

Inzwischen ist eine Vielzahl von neurologischen Erkrankungen bekannt, die mit Mutationen in Genen in Verbindung gebracht werden, deren Genprodukte an der Signaltransduktion und der LTP beteiligt und in der PSD zu finden sind. So führen Mutationen in den *SHANK2*- und *SHANK3*-Genen zu Intelligenzminderung (*Intellectual disability*; ID) oder Autismus (Chilian et al., 2013; Durand et al., 2007), und Mutationen in den für Untereinheiten der Glutamatrezeptoren kodierenden Genen zu Epilepsie oder ID (Endele et al., 2010). Ein wichtiger Bestandteil der PSD ist IRSp53. Das beim Menschen für IRSp53 kodierende BAIAP2 (*Brain-specific angiongenesis inhibitor 1-associated protein 2*)-Gen wurde in genetischen Assoziationsstudien mit neurologischen Entwicklungsstörungen in Zusammenhang gebracht. Für den Genlokus von BAIAP2 auf dem langen Arm des Chromosom 17 (17q25) fand sich bei Betroffenen des Gilles-de-la-Tourette-Syndrom ein Kopplungsungleichgewicht von Einzelnukleotidpolymorphismen (Paschou et al., 2004). Zusätzlich fanden Ribasés et al. in ihren Arbeiten einen Zusammenhang von BAIAP2 mit juvenilem Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätssyndrom (ADHS) und Erkrankungen des autistischen Spektrums (Ribasés et al., 2011; Ribasés et al., 2009). Beide neurologischen Entwicklungsstörungen haben eine hohe Vererbungsrate und es wird eine gemeinsame genetische Ursache vermutet (Rommelse et al., 2010). Zuletzt untersuchten Zhou et al. (2013) die PSDs verstorbener Alzheimer-Patienten. Mittels Kopplung von Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie konnte *post mortem* in den PSDs der Patienten ein signifikant vermindertes IRSp53-Level ermittelt werden. Trotz der anerkannten Hypothese, dass Amyloid-Plaques und τ-Fibrillen das neuropathologische

Korrelat der Alzheimer-Erkrankung darstellen, könnten Veränderungen in der synaptischen Signalübertragung, die durch eine Herunterregulierung von IRSp53 ausgelöst werden, die kognitiven Defizite der Patienten erklären (Zhou et al., 2013).

1.3 IRSp53

IRSp53 wurde entdeckt als ein Protein, das *in vitro* in Insulin-behandelten Zellen vom Insulin-Rezeptor an Tyrosin-Resten phosphoryliert wird (Yeh et al., 1996). BAIAP2, das humane IRSp53, erhielt seinen Namen durch seine Bindung an BAI1 (*brain-specific angiogenesis inhibitor 1*). Beim Menschen sind für BAIAP2/IRSp53 vier Isoformen bekannt (L, M, S and T), die in diversen Gewebearten exprimiert werden (Miyahara et al., 2003).

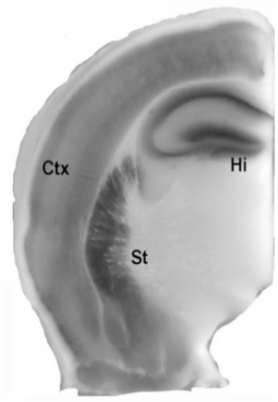

ABBILDUNG 1.2 LOKALISIERUNG VON IRSP53 IM MÄUSEHIRN

BLAUFÄRBUNG IRSP53-EXPRIMIERENDER HIRNREGIONEN DURCH β-GALAKTOSIDASE-AKTIVITÄT DES IRSP53-β-GAL-KONSTRUKTES: VERMEHRTE FÄRBUNG IN CTX = CORTEX, ST = STRIATUM UND HI = HIPPOCAMPUS; AUS SAWALLISCH ET AL. 2009

In PSDs von Rattenhirnen zeigen sich zwei Varianten des Proteins mit Molekulargewichten von 53kDa bzw. 58 kDa (Abbott et al., 1999). IRSp53 wird in vielen Geweben exprimiert; hohe Expressionsraten von IRSp53 lassen sich insbesondere im Gehirn (Cortex, Hippocampus, Striatum; Abbildung 1.2), in Drüsenepithelzellen (Thymus, Speicheldrüse, Hypophyse), oder in Keratinozyten finden (Bockmann et al., 2002; Sawallisch et al., 2009).

1.3.1 IRSp53 als Multi-Domänenprotein mit vielen Bindungspartnern

IRSp53 besitzt vier funktionelle Interaktionsmotive: IM-Domäne (*IRSp53 and Missing-In-Metastasis Homology – Domain; IMD*), CRIB (*Cdc42/Rac interactive binding*)-Motiv, eine SH3 (*SRC homology 3)-Domäne*, und ein PDZ (*Postsynaptic Density 95, Discs Large, Zonula Occludens 1*)-Bindemotiv (siehe Abbildung 1.3). Die IMD besitzt die Fähigkeit, die

Zellmembran zu binden und zu deformieren. Die Aminosäuren dieser Domäne bilden eine Struktur aus sechs Helices. Diese lagern sich zu Dimeren zusammen und geben der Domäne eine konvexe, zigarrenartige Form. Diese konvexe Form der Domäne wölbt die Zellmembran leicht nach außen, sodass Filopodien-artige Ausläufer entstehen (Mattila et al., 2007). Selbst die isoliert exprimierte IMD kann solche Filopodien bilden. Zusätzlich bindet die IMD Aktin-Filamente (F-Aktin), kann diese unter physiologischen Bedingungen allerdings nur begrenzt bündeln und querverbinden (Mattila et al., 2007). Daher wird vermutet, dass eher Eps8, ein Bindepartner der SH3-Domäne von IRSp53 oder LIN7, Bindepartner des PDZ-Bindemotivs, für die Fähigkeit von IRSp53, Aktinfilamente zu bündeln, zuständig ist (Scita et al., 2008). Zusätzlich bindet die IMD an die GTPase Rac (Suetsugu et al., 2006).

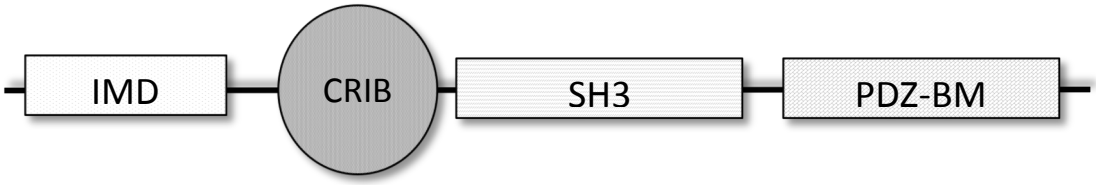

ABBILDUNG 1.3 DOMÄNENSTRUKTUR VON IRSP53

IMD = *IRSP53 AND MISSING-IN-METASTASIS HOMOLOGY*-DOMÄNE, CRIB = *CDC42/RAC INTERACTIVE BINDING MOTIF*, SH3 = *SRC HOMOLOGY 3*-DOMÄNE, PDZ-BM = *PSD-95/DISCS LARGE/ZONULA OCCLUDENS-1*-BINDEMOTIV

Das CRIB-Motiv dagegen besitzt die Möglichkeit, mit aktiviertem Cdc42 zu assoziieren (Krugmann et al., 2001). Folglich besitzt IRSp53 zwei Domänen, die unabhängig voneinander aktivierte GTPasen binden. Die SH3-Domäne bindet an Prolin-reiche Sequenzen von WAVE (*WASP-family verprolin-homologous protein*)2, Mena/VASP, Eps8, mDia, SHANK1-3 oder Synaptopodin (Bockmann et al., 2002; Krugmann et al., 2001; Soltau et al., 2002). Dementsprechend kann IRSp53 als Adapter von Proteinkomplexen an Aktinfilamente und Zellmembranen angesehen werden. Es besitzt die Fähigkeit, sowohl die Aktivität kleiner GTPasen (über IMD, CRIB) als auch Effektorproteine (über SH3) mit dem Aktinzytoskelett und der Plasmamembran zu koppeln (über IMD; Disanza et al., 2006). Möglicherweise stellt IRSp53 einen Teil einer gemeinsamen Endkette des Signalweges beider G-Proteine dar oder ist an zwei unterschiedlichen Signalwegen beteiligt (Scita et al., 2008). *In vivo* hatte die Cdc42-Bindung an IRSp53 eine stärkere Affinität der SH3-Domäne zu ihren Liganden zur Folge (Suetsugu et al., 2006). Zusätzlich konnte IRSp53 im Komplex mit Mena Filopodien nur Cdc42-abhängig ausbilden

(Krugmann et al., 2001). Geblockt wurde diese Filopodien-Bildung allerdings durch Koexpression N-terminaler Sequenzen von IRSp53. Krugmann et al. (2001) schlossen daraus, dass IRSp53 eine intramolekulare Bindung zwischen SH3-Domäne und N-terminalen Abschnitten besitzt, die durch Cdc42-Bindung geöffnet wird. Das PDZ-Bindemotiv von IRSp53 schließlich geht eine Bindung mit diversen PDZ-Domänen enthaltenden Proteinen ein, unter anderem mit der zweiten PDZ-Domäne diverser Mitglieder der PSD-95-Proteinfamilie (Choi et al., 2005; Soltau et al., 2004). PSD-95 wiederum verankert über dieselbe PDZ-Domäne Membranrezeptoren und Ionenkanäle wie den NMDA-Rezeptor in der PSD (Kornau et al., 1995).

Durch gezielte Mutationen in der Wildtyp-Sequenz von IRSp53 ist es möglich, einzelnen Domänen die Bindefähigkeit an ihre Bindepartner zu nehmen. Durch den Austausch von vier Lysinen gegen vier Glutamatreste (an den Stellen 142, 143, 146, 147) verliert die IM-Domäne die Fähigkeit, aktiviertes Rac, Phospholipide und Aktin zu binden (Mattila et al., 2007). Weiterhin konnten Krugmann et al. (2001) zeigen, dass der Austausch eines Isoleucin gegen ein Asparagin (Aminosäure 268) verhindert, dass aktiviertes Cdc42 (GTP-gebunden) an das CRIB-Motiv binden kann (Krugmann et al., 2001). Die SH3-Domäne verliert durch zwei Alanine anstelle von Tryptophan (427) und Prolin (429) die Fähigkeit zur Bindung an ihre Bindepartner (AG Kreienkamp). Das C-terminale PDZ-Bindemotiv schließlich, durch das IRSp53 Bindungen zu PSD-95 oder LIN7 eingeht, verliert durch ein Stoppcodon anstelle eines Valin seine Bindefähigkeit (521; Kornau et al., 1995).

Die genaue Funktion von IRSp53 im zentralen Nervensystem ist noch nicht geklärt. Unbestritten ist der Einfluss von IRSp53 auf die Zellmorphologie *in vitro* (Choi et al., 2005; Miki et al., 2000). In Kultur gebrachte Neuronen von Tieren mit IRSp53-*knockout* (Sawallisch et al., 2009) bzw. IRSp53-*knockdown*-Neuronen (Choi et al., 2005) wiesen *in vitro* signifikant weniger Primärdendriten auf. *In vivo*-Versuche an *KO*- und *WT*-Neuronen zeigten dagegen keinen Unterschied in der Morphologie dieser Zellen (Kim et al., 2009; Sawallisch et al., 2009). In elektrophysiologischen Tests zeigten sich IRSp53-defiziente Neurone mit veränderter LTP (Kim et al., 2009; Sawallisch et al., 2009), was die Lerndefizite IRSp53-defizienter Mäuse erklären könnte.

1.3.2 IRSp53 in der Postsynaptischen Dichte

Auf der Suche nach Funktion und Eigenschaften des Proteins IRSp53 in der postsynaptischen Dichte von Neuronen stellt sich zu Beginn die Frage: Wie und auf welchen Impuls hin erreicht das Protein die PSD? Untersuchungen zum Stimulus der Rekrutierung von IRSp53 in die PSD haben bislang widersprüchliche Ergebnisse erbracht. Bei manchen Arbeitsgruppen war IRSp53 ohne äußere Einflüsse in der PSD zu finden (Abbott et al., 1999; Bockmann et al., 2002; Soltau et al., 2002). Hori et al. (2005) berichten dagegen, dass es einer Stimulierung der Neuronen durch NMDA bedarf, damit IRSp53 in der PSD lokalisiert ist. Hori et al. (2005) zeigten zusätzlich, dass dafür ein intaktes PDZ-Bindemotiv vonnöten ist. Zum gleichen Ergebnis kamen Choi et al. (2005), deren IRSp53-Protein mit fehlendem C-Terminus ebenfalls nur schwach in der PSD lokalisiert war (siehe Tabelle 1.1). Dass die SH3-Domäne eine Rolle in der Verankerung von IRSp53 in der PSD spielt, liegt aufgrund der Bindung von IRSp53 zum PSD-Gerüstprotein SHANK1 nahe. Hier sind die Ergebnisse allerdings widersprüchlich. Bei Hori et al. (2005) war IRSp53 mit defekter SH3-Domäne bereits vor Stimulierung mit NMDA und damit dauerhaft in der PSD lokalisiert (siehe Tabelle 1.1), Choi et al. (2005) beobachteten bei defekter SH3-Domäne eine schwächer ausgeprägte Lokalisierung von IRSp53 in der PSD.

KONSTRUKT	**EINBAU IN DIE PSD**	
	NACH HORI ET AL. (2005)	**NACH CHOI ET AL. (2005)**
WT	Einbau erst nach Stimulierung mit NMDA	Einbau in die PSD
IMD + CRIB	Kein E. in die PSD	E. additiv abgeschwächt
IMD + CRIB + SH3	Kein E. in die PSD	E. abgeschwächt
ΔSH3 (Hori) bzw. SH3 mut (Choi)	E. bereits vor NMDA-Stimulierung	E. leicht abgeschwächt
IMD + PDZ-BM (ΔCRIB + ΔSH3)	E. bereits vor NMDA-Stimulierung	–
SH3 + PDZ-BM (ΔIMD + ΔCRIB)	Kein E. in die PSD	–

TABELLE 1.1 EINBAU VON IRSP53 IN DIE PSD NACH CHOI ET AL. (2005) UND HORI ET AL. (2005)

1.4 Lentiviren

Lentiviren sind eine Gattung aus der Familie der Retroviren. 1983 entdeckten Forscher um den Franzosen Luc Montagnier zunächst das Retrovirus *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) in Lymphknoten eines Patienten mit *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (AIDS; Barré-Sinoussi et al., 1983) – für diese Entdeckung erhielt Montagnier 2008 den *Nobelpreis für Physiologie oder Medizin*. Virologen versuchten in den Folgejahren Retroviren als eine neue Methode des Gentransfers zu nutzen. Als erstes gelang es 1989, heterologe Gene mittels HIV-1 zu übertragen (Terwilliger et al., 1989). 1991 folgte die Entwicklung eines defekten HIV-1, das nur erwünschte Gene und keine HIV-1-Gene mehr ins Genom der CD4-positiven Zielzellen einbrachte. Das stoppte die Synthese replikationskompetenter Viren (Poznansky et al., 1991). 1996 erfolgte schließlich erstmals der Gentransfer mithilfe eines retroviralen Vektors (ebenfalls basierend auf HIV) auf Neuronen, in dem das Gen für das HIV-Oberflächen-Protein (mit Tropismus für CD4-positive Zellen) gegen die DNA des VSV-Glykoprotein G, dem Oberflächenprotein des *Vesicular Stomatitis Virus*, augetauscht worden war (Naldini et al., 1996).

1.5 Zielsetzung

Wie beschrieben ist unklar, wie und auf welchen Impuls hin IRSp53 vom Zellkörper in die PSD gelangt. Ziel dieser Arbeit war, ein besseres Verständnis über die Mechanismen zu gewinnen, über die die Zielsteuerung von IRSp53 in die postsynaptische Dichte erfolgt. Dazu habe ich einerseits untersucht, ob für die Rekrutierung in die PSD eine Aktivierung der Neuronen mittels NMDA notwendig ist. Andererseits überprüfte ich die Relevanz der einzelnen Domänen von IRSp53 für die Lokalisation in der PSD. Dazu wurden Mutationen in die für IRSp53 kodierende cDNA eingefügt, sodass einzelnen Domänen des Proteins die Fähigkeit zur Bindung an ihre Bindepartner genommen wurde (siehe 1.3.1). Die mutierte DNA wurde mithilfe von lentiviralen Vektoren in kultivierte embryonale Rattenneuronen eingebracht. Anschließend habe ich die Anreicherung des exprimierten Proteins in der PSD durch eine proteinbiochemische Präparation quantifiziert. Unterstützt wurden diese Ergebnisse durch immunzytochemische Analysen.

II MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

Detaillierte Angaben über Bezugsquellen der verwendeten Materialen, sowie Konzentrationen und Zusammensetzung verwendeter Puffer finden sich im Anhang.

2.1.1 Organismen: Bakterienstämme, humane Zelllinien und Primärkulturen

ORGANISMUS	KOMMENTAR
BAKTERIENSTÄMME - **TOP10F' (*Invitrogen*)** - **TOP10 Gold-Zellen (*Invitrogen*)**	Bakterien zur Klonierung und Amplifikation von Plasmid-DNA (TOP10F') bzw. zur Klonierung der lentiviralen Vektoren (TOP10 Gold)
HUMANE ZELLLINIEN - **HEK-293 *(Invitrogen)*** - ***HEK-293 T/FT (Invitrogen)***	Eukaryotische Zellen für die Lentiviren-Produktion (*HEK-293 T/FT) bzw. zur Überprüfung der Lentiviren (HEK-293)*
PRIMÄRKULTUR-NEURONE - ***Rattus norvegicus;* Stamm *Wistar,* UKE-Tierhaltung)**	- Cortex-Neurone für biochemische Analysen (PSD-Präparation) - Hippocampus-Neurone für immunzytochemische Färbungen

TABELLE 2.1 ORGANISMEN: BAKTERIENSTÄMME, HUMANE ZELLLINIEN UND PRIMÄRKULTUREN

2.1.2 Klonierungsvektoren und DNA-Sequenzen

VEKTOR	PRODUKT	ANMERKUNG	BEZUGSQUELLE
pEGFP-C1	GFP	eGFP-*Tag*, CMV-Promoter, Kan.-Resistenz	Clontech
FUW	Einkloniertes Zielprotein	Aus HIV-Genom, humaner Polyubiquitin-Promoter-C, *Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element*	AG Sala (Mailand, Italien)
Delta 8.9	Lentivirus-proteine	HIV-1-Verpackungsvektor	AG Kornau (UKE)
VSV-G	VSV-Glykoproteine	Breiter Tropismus der Lentiviren	AG Sala (Mailand, Italien)

TABELLE 2.2 ÜBERSICHT ÜBER AUSGANGSVEKTOREN: EGFP = ENHANCED GREEN FLUORESCENT PROTEIN, FUW = Flap-Ub Promoter-WER. VSV-G = Vesicular Stomatitis Virus-Glycoprotein (Cronin et al., 2006)

BEZEICHNUNG	INSERT	MUTATION	TAG
pEGFP-IRSp53 WT	IRSp53 (Maus)	keine	eGFP
pEGFP-IRSp53^{IMD}	IRSp53 (Maus)	K142E, K143E, K146E, K147E	eGFP
pEGFP-IRSp53^{CRIB}	IRSp53 (Maus)	I268N	eGFP
pEGFP-IRSp53^{SH3}	IRSp53 (Maus)	W427A, P429A	eGFP
pEGFP-IRSp53^{PDZ-BM}	IRSp53 (Maus)	V522G	eGFP

TABELLE 2.3 ÜBERSICHT ÜBER IN DER ARBEITSGRUPPE BEREITS VORHANDENE KONSTRUKTE, HERSTELLUNG DURCH HANS-HINRICH HÖNCK

BEZEICHNUNG	VIRALER VEKTOR	PRODUKT
FUW-GFP-IRSp53 WT	FUW	IRSp53 Wildtyp
FUW-GFP-IRSp53^{IMD}	FUW	IRSp53^{IMD}
FUW-GFP-IRSp53^{CRIB}	FUW	IRSp53^{CRIB}
FUW-GFP-IRSp53^{SH3}	FUW	IRSp53^{SH3}
FUW-GFP- IRSp53^{PDZ-BM}	FUW	IRSp53^{PDZ-BM}

TABELLE 2.4 ÜBERSICHT ÜBER DIE HERGESTELLTEN LENTIVIRALEN VEKTOREN AUS FUW

IRSp53^{IMD} 4KzuE										
IRSp53 WT	GAG	CTG	AAG	AAG	CTC	CGC	AAG	AAG	AGC	CAA
IRSp53^{IMD}	GAG	CTG	GAG	GAG	CTC	CGC	GAG	GAG	AGC	CAA
Aminosäuren WT	GLU	LEU	LYS	LYS	LEU	ARG	LYS	LYS	SER	GLN
Aminosäuren *IMD	GLU	LEU	GLU	GLU	LEU	ARG	GLU	GLU	SER	GLN
Veränderte AS	...	...	GLU	GLU	...	...	GLU	GLU	...	...

IRSp53^{CRIB} (p.I268N)					
IRSp53 WT	CTG	GTC	ATC	TCA	GAT
IRSp53^{CRIB}	CTG	GTC	AAC	TCA	GAT
Aminosäuren WT	LEU	VAL	ILE	SER	ASP
Aminosäuren *CRIB	LEU	VAL	ASN	SER	ASP
Veränderte AS	...	...	ASN	...	...

IRSp53^{SH3} (WP/AA)							
IRSp53 WT	CGG	GGC	TGG	TTC	CCC	TTC	TCC
IRSp53^{SH3}	CGG	GGC	GCG	TTC	GCC	TTC	TCC
Aminosäuren WT	ARG	GLY	TRP	PHE	PRO	PHE	SER
Aminosäuren *SH3	ARG	GLY	ALA	PHE	ALA	PHE	SER
Veränderte AS	...	...	ALA	...	ALA	...	...

IRSp53^{PDZ-BM} (V522G)			
IRSp53 WT	ACA	GTG	TGA
IRSp53^{PDZ-BM}	ACA	GGG	TGA
Aminosäuren WT	THR	VAL	STP
Aminosäuren *PDZ-BM	THR	GLY	STP
Veränderte AS	...	GLY	...

TABELLE 2.5 ÜBERSICHT ÜBER DIE ERMITTELTEN SEQUENZEN AUS KONTROLLSEQUENZIERUNGEN DER ERZEUGTEN FUW-VEKTOREN (WT UND MUTIERT; 5'-ENDE LINKS), **STP** = STOPP-CODON, **. . .** = UNVERÄNDERTE AMINOSÄUREN

2.1.3 Antikörper

ANTIGEN	HOST	VERDÜNNUNG	WB	IZC	HERSTELLER
Shank (PDZ)	rb	1:4000	*		AG Kreienkamp
IRSp53	rb	1:3000	*		AG Kreienkamp
GFP	rb	1:2000	*	*	Abcam
SHANK1/Prosap2	gp	1:2000		*	AG Kreienkamp

TABELLE 2.6 ÜBERSICHT PRIMÄRANTIKÖRPER: RB = KANINCHEN, GP = MEERSCHWEINCHEN, M = MAUS, WB = IMMUNDETEKTION IM WESTERNBLOT, IZC = IMMUNDETEKTION IN DER IMMUNZYTOCHEMIE

ANTIGEN	KONJUGAT	VERDÜNNUNG	WB	IZC	HERSTELLER
rb IgG	Meerrettichperoxidase	1:10.000	*		Dianova
rb	Alexa-Fluor 488	1:1000		*	Invitrogen
gp	Cy3	1:1000		*	Dianova

TABELLE 2.7 ÜBERSICHT SEKUNDÄRANTIKÖRPER: RB = KANINCHEN, GP = MEERSCHWEINCHEN, M = MAUS, WB = IMMUNDETEKTION IM WESTERNBLOT, IZC = IMMUNDETEKTION IN DER IMMUNZYTOCHEMIE

2.1.4 Restriktionsenzyme

ENZYM	ERKENNUNGSSEQUENZ	HERSTELLER
BglII	AGATCT	Fermentas
EcoRI	GAATTC	Fermentas
NheI	GCTAGC	Fermentas
XbaI	TCTAGA	Fermentas

TABELLE 2.8 VERWENDETE RESTRIKTIONSENZYME

2.1.5 Technische und digitale Arbeitsgrundlagen

VERWENDUNG	GERÄT / PROGRAMM	KOMMENTAR
ULTRAZENTRIFUGE	- Ultrazentrifuge (*Beckman Coulter*) mit Rotor *Beckman Coulter SW 28*	Aufkonzentrierung der Lentiviren (Biosafety Level S2)
MIKROSKOPIE	- Mikroskop *Leica DMIRE2 mit* Konfokalsystem *Leica TCS SL* - Objektiv *Leica HCX PL APO 63x Oil CS N.A. 1.32 - 0.6*	Mikroskopie und Bilderfassung von Epifluoreszenzbildern immunzytochemischer Färbungen
***WESTERN BLOT*-AUSWERTUNG**	- Dokumentationssystem *BioRad ChemiDoc XRS und* Software *Biorad Image Lab*	Lumineszenz-Ermittlung von *Western Blot*-Membranen und quantitative Auswertung
ANALYSE VON DNA-SEQUENZEN	- Programme *Textco Gene Construction Kit 2.5,* DNASTAR *EditSeq / SeqMan*	Auswertung nach DNA-Sequenzierung und Abgleich mit publizierten Sequenzen

TABELLE 2.9 TECHNISCHE UND DIGITALE ARBEITSGRUNDLAGEN

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Definierte Abschnitte von Nukleinsäuren wurden mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert (hier aus Plasmid-DNA). Dabei wurden die entsprechenden Abschnitte von *Primern* flankiert. In einem mehrstufigen Prozess wurde der *Template*-Strang durch eine hitzestabile Polymerase amplifiziert. Der Reaktionsansatz setzte sich aus folgenden Reagenzien zusammen.

REAGENZ	MENGE
Template-DNA	50 - 100 ng
Desoxynukleotide	Je 10 nmol
Primer	50 - 100 pmol
Taq-Polymerase	2,5 - 5 U
10x PCR-Puffer	5 µl
H_2O dest.	**auf 50 µl**

TABELLE 2.10 PCR-REAKTIONSANSATZ

Nach initialer Denaturierung (5 min, 94 °C) durchlief der PCR-Ansatz 25 Zyklen aus Denaturierung (30 s, 94 °C), Anlagerung der Primer (30 s, 55-60 °C) und Polymerisation (1 min / kB, 72°C). Die Anlagerungstemperatur wurde entsprechend der Schmelzpunkte der verwendeten Oligonukleotide, die Polymerisationsdauer entsprechend der Länge des Fragments variiert.

2.2.2 DNA-Restriktionsverdau

Bei einem Restriktionsverdau von DNA schneiden Restriktionsenzyme doppelsträngige DNA an definierten Abschnitten nach einem bestimmten Muster. Bedingung für die Erkennung des richtigen Basenabschnitts ist eine palindromische Basenfolge. Nach analytischem Verdau wurde die geschnittene DNA in einem Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel aufgetrennt und nach Ethidiumbromidfärbung unter ultraviolettem Licht sichtbar gemacht. Nach präparativem Verdau wurde die DNA im Agarosegel aufgetrennt

und das gewünschte DNA-Fragment aus dem Agarosegel extrahiert. Es kamen folgende DNA- und Enzym-Mengen zum Einsatz:

	ANALYT. VERDAU	PRÄPARATIVER VERDAU
DNA	1-2 µg	2-10 µg
Enzym	1 µl	5-10 µl
Puffer (*FastDigest Green Buffer*)	3 µl	5-10 µl
H_20	14-15 µl	5-30 µl
GESAMTVOLUMEN	**30 µl**	**50-100 µl**

TABELLE 2.11 RESTRIKTIONSENZYM-REAKTIONSANSATZ

Die cDNA der IRSp53-Konstrukte wurde mit *NheI* und *EcoRI* von pEGFP-C1 abgespalten, GFP mithilfe von *NheI* und *BglII*. Der FUW-Vektor hingegen wurde mit *XbaI* und *EcoRI* geschnitten. *NheI* schneidet die DNA so, dass der Überhang des DNA-Abschnitts (5'CTAG) kompatibel zu einem mit *XbaI* geschnitten Fragment ist.

2.2.3 Auffüllreaktion

Nicht immer lassen sich für den Verdau von DNA-Fragmenten verschiedener Plasmide Schnittenzyme finden, deren Restriktionsenden (*sticky ends*) zueinander passen. In diesem Fall wurden die überstehenden Enden durch das Klenow-Enzym, ein Proteinfragment der DNA-Polymerase I aus E. coli, zu glatten Enden (*blunt ends*) aufgefüllt (Aufbau am überstehenden 5'-Ende, Abbau der Einstrang-DNA am 3'-Ende). Hierzu wurde der DNA-Ansatz aus dem vorherigen Ligationsverdau mit T4-DNA-Ligase-Reaktionspuffer und dNTPs versetzt. Je 1 µg DNA wurde 1 IU Klenow-Fragment zum Reaktionsansatz gegeben. Nach 15-minütiger Inkubation bei 25 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von EDTA (auf 10 mM) und Erhitzen auf 75 °C (für 10 min) gestoppt.

2.2.4 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung zuvor geschnittener DNA-Fragmente erfolgte mithilfe der Gelelektrophorese in Agarose (1 % Agarose in TAE-Puffer mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid): Dabei werden die Fragmente entsprechend ihrer Größe im Gel aufgetrennt. Treibende Kraft ist ein elektrisches Spannungsfeld von 90-110 mV über dem Gel, in dem sich die

Nukleinsäuren wegen ihrer negativ geladenen Phosphate bewegen. Als DNA-Ladepuffer diente *FastDigest Green Buffer (Fermentas)*. Zur Größenorientierung wurden parallel zu den aufgetragenen Proben Fragmente bekannter Länge aufgetragen: *1 kb DNA Ladder (Invitrogen)*, *1 kb DNA Ladder (New England Biolabs)* und *GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas)*. Durch das Interkalieren des Ethidiumbromid im Agarosegel zwischen die Basen der DNA waren die DNA-Fragmente nach Anregung mit ultraviolettem (UV) Licht sichtbar und konnten analysiert werden.

2.2.5 DNA-Extraktion aus Agarose

Unter UV-Beleuchtung wurden die Gelabschnitte, in denen die Fragmente mit gewünschter Basenlänge zu liegen kamen, mit einem Skalpell ausgeschnitten. Mithilfe eines DNA-Gelextraktionskits (*Qiagen Qiaex II Gel Extraction Kit*) wurde die DNA nach Herstellerangaben aus dem Agarosegel extrahiert.

2.2.6 Ligation

Die Endstücke der zuvor extrahierten DNA-Fragmente (jeweils *sticky ends* oder *blunt ends* miteinander) wurden mithilfe der T4-DNA-Ligase bei 16 °C zwischen 12 und 16 h in einem Ligationsansatz miteinander verbunden.

Insert	3 µl (150 ng DNA)
Vektor	1,5 µl (150 ng DNA)
T4-DNA-Ligase	1 µl
T4-DNA-Ligase-Puffer (10x)	1 µl
H_20	13,5
GESAMTVOLUMEN	**20 µl**

TABELLE 2.12 LIGATIONSREAKTIONSANSATZ

2.2.7 Transformation von Plasmid-DNA in E. coli

Die Vermehrung von Plasmid-DNA erfolgte durch chemische Transformation in kompetente E. coli-Bakterien (TOP10F' und TOP10 Gold, *Invitrogen;* kompetent gemacht nach Chung et al., 1989 und bei -180 °C gelagert). Nach der Ligation von Insert und

Plasmid über Nacht wurden 10 µl aus dem Gesamtreaktionsvolumen der Ligation zu 20 µl KCM (5x) und 70 µl H_20 gegeben. Anschließend wurden E. coli-Bakterien auf Eis aufgetaut. 100 µl dieser Bakterien wurden mit der zuvor mit KCM vermengten DNA (in H_20) für 20 min auf Eis gestellt. Danach wurde das Bakterien-DNA-Gemisch 5 min auf 37 °C erhitzt (Hitzeschock), um die Bakterienmembran für die Aufnahme von DNA porös zu machen. Nach Zugabe von 300 µl vorgewärmten LB-Mediums (37°C) inkubierten die Bakterien 1-2 h bei 37 °C. Hiernach wurde das gesamte Volumen je nach Resistenzspektrum des Plasmids (als Antibiotikum 100 µg/ml *Ampicillin* oder 50 µg/ml *Kanamycin*) auf LB-Platten ausgebracht und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Bakterienkolonien mit entsprechendem Resistenzspektrum wurden am Folgetag gepickt und in LB-Medium im Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert. Für eine Mini-Präparation zur Analyse der Plasmid-DNA wurden 3 ml LB-Medium für mindestens 6 h geschüttelt; 100 ml Medium wurden für die Vermehrung von Plasmid-DNA im Schüttelinkubator über Nacht zwecks Midi-Präparation verwendet. Bei der Retransformation wurde 1µl Plasmid-DNA (1 µg/µl) in Bakterien retransformiert (bei 100 µl Gesamtvolumen). Auf LB-Platten wurden anders als bei der Transformation nur 100 µl der Bakteriensuspension aufgetragen.

2.2.8 Isolierung von DNA aus kompetenten E. coli-Baktieren

Unter Verwendung der Isolierungskits *NucleoBond XtraMini* und *NucleoBond XtraMidi* (beide *Macherey & Nagel*) wurde Plasmid-DNA gemäß den Herstellerangaben aus E. coli-Kulturen extrahiert.

2.2.9 Photospektrometrische Messung der DNA-Konzentration

Die Konzentration einer DNA-Probe wurde mittels Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm (maximale Absorption von Nukleinsäuren) im Photospektrometer (*Eppendorf BioPhotometer*) ermittelt (Lambert-Beersches Gesetz). Die Reinheit der Probe wurde durch den Quotienten der Extinktionen (=Absorption) E_{260}/E_{280} kontrolliert (Erwünscht: 1,8).

2.2.10 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach der Didesoxy-Kettenabbruchmethode mit einem Terminator-Kit (*ABI PRISM Big Dye*) und dem Sequenziergerät *ABI PRISM 3130 DNA Sequencer* (*Applied Biosystems*). Der in Tabelle 2.13 angegebene Reaktionsansatz durchlief im *Thermocycler* nach einminütiger Denaturierung bei 96 °C 25 Zyklen (5 s bei 96 °C, 5 s bei 50 °C , 3 min bei 60 °C). Nach der Sequenzierungs-Reaktion erfolgte eine Fällung der DNA mit 5 µl Natriumacetat (3 M) und 130 µl Ethanol (100 %) für 30 min bei 4 °C und 14000 U/min. Danach wurde das DNA-Pellet mit 250 µl Ethanol (70%) gewaschen, abermals zentrifugiert (10 min, 14000 U/min) und luftgetrocknet.

REAGENZ	MENGE
Plasmid-DNA	500 ng
Primer	1µl (10 mM)
BigDye • **Polymerase *AmplitaqFS*** • **dNTPs** • **ddNTPs (fluorophormarkiert)**	1 µl
Sequenzierungspuffer (4x)	2,5 µl
H_2O	**ad 10 ml**

TABELLE 2.13 REAKTIONSANSATZ FÜR DNA-SEQUENZIERUNG NACH DIDESOXY-KETTENABBRUCHMETHODE

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Kultivieren von *Human Embryonic Kidney (HEK)-293*-Zelllinien

HEK-293-Zellen sind eine Zelllinie, die durch genetische Transformation (nach Exposition gegenüber DNA von *Adenovirus Typ 5*) die Eigenschaft erhalten hat, sich wie Krebszellen ungebremst zu teilen. Darüber hinaus besitzen Zellen der Linie *HEK-293T* das *SV40 large T antigen* (aus dem Polyomavirus *Simian-Virus 40*), das ihnen die Fähigkeit gibt, nicht nur die eigene genetische Information, sondern auch episomale, das heißt extrachromosomale, DNA-Plasmide zu replizieren. Eine besondere Linie der *HEK-293-T*-sind *HEK-293FT-Zellen* aus dem lentiviralen *ViraPower*™-Expressionssystem (*Invitrogen*). Gemäß den Herstellerangaben ermöglichen Zellklone der *HEK-293FT*-Linie besonders

hohe Virustiter. *HEK-293*- und *HEK-293T*-Zellen wurden in DMEM (*Dulbecco's modified eagle medium*; mit 10 % *Fetal Bovine Serum,* FB*S*) kultiviert. Zum Schutz vor Kontamination mit fremden Mikroorganismen wurden dem Medium 100 µg/ml *Penicillin* und *Streptomycin* (P/S) zugegeben. Um sicherzustellen, dass Kulturschalen der *HEK-293T*-Zelllinien frei von *HEK-293*-Zellen sind, wurde das Medium der *HEK-293T*-Zellen zusätzlich mit *Geneticin* (*G418*; Endkonzentration = 500 µg/ml) versetzt. Anschließend wurden die Zellen in *Geneticin*-freier Umgebung weitergezüchtet. Entsprechend den Angaben des Herstellers *Invitrogen* brauchen *HEK-293FT*-Zellen für eine optimale Virusproduktion besondere DMEM-Bedingungen (FT-DMEM). Dazu wird das Medium mit folgenden Substanzen versetzt:

SUBSTANZ	MENGE
FBS	50 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml
L-Glutamin	5 ml
Nicht essentielle Aminosäuren (NEAA)	5 ml
Natriumpyruvat	500 µl
Geneticin (G418)	500 µl

TABELLE 2.14 ZUSAMMENSETZUNG DES ZELLMEDIUMS BEI KULTIVIERUNG VON HEK-293 FT-ZELLEN ZUR PRODUKTION VON LENTIVIREN

Wenn die HEK-Zellen in den Kulturschalen eine Dichte von 60 % erreicht hatten, wurden sie auf neue Schalen umgesetzt. Zunächst wurden sie hierfür mit Versene-Puffer gewaschen, für 5-10 min mit 500 µl Trypsinlösung von der Kulturschale gelöst und anschließend mit 10 ml Komplettmedium von der Kulturschale entnommen. Nach kurzer Zentrifugation (1000 rpm, 5 min) wurde das Zellpellet wiederum in frischem Medium aufgenommen und auf neue Kulturschalen ausgebracht.

2.3.2 Transfektion von *HEK-293*-, *HEK-293T*- und *HEK-293FT*-Zellen

HEK-Zellen wurden ab einer Zelldichte auf den Kulturschalen von 60 % transfiziert. Dabei wurde die Plasmid-DNA auf zwei verschiedene Weisen in die Zellen eingebracht (siehe

unten). Zur Produktion von Lentiviren in *HEK-293T*- und *HEK-293FT*-Zellen wurde *Turbofect* (*Invitrogen*) für die Transfektion verwendet.

Um Plasmid-DNA mittels Kalziumphosphat-Methode in HEK-Zellen zu transfizieren, wurden 10-20 µg DNA mit H_2O und $CaCl_2$ versetzt (Endkonzentration 250 mM). Anschließend wurden dem Reaktionsansatz unter Rütteln auf dem Vortexer langsam 500 µl 2x BBS zugeben, damit sich Kalziumphosphat-Kristalle in optimaler Größe bilden konnten. Daraufhin wurde der Transfektionsmix bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert und mit der nun an Kalziumphosphatkristalle gebundenen DNA auf das Zellmedium gegeben. Nach ca. drei Stunden wurde das Zellmedium mit den lichtmikroskopisch sichtbaren Kristallen abgenommen und durch frisches DMEM ersetzt. Gemäß den Protokollen des Herstellers wurde Plasmid-DNA mittels *Turbofect* transfiziert. 15-20 µg DNA wurden mit 1 ml reinen DMEMs vermischt und nach Zugabe von 20 µl *Turbofect* und 20-minütiger Inkubation auf die Zellen in 10 cm-durchmessenden Schalen gegeben. Im Anschluss hieran wurden die transfizierten Zellen mindestens 6h im Inkubator bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und frisches zugegeben.

2.3.3 Virusproduktion und -verwendung

Lentiviren integrieren ihre DNA mithilfe verschiedener Hilfsproteine in das Genom infizierter Zielzellen. Die übertragene DNA bleibt über Monate hinweg stabil in das Zielgenom integriert (Cockrell and Kafri, 2007). Es ist möglich, die Nachteile bisheriger Vektorsysteme wie der transienten Transfektionsmethoden (*Turbofect*, Kalziumphosphat-Methode) zu umgehen. Diese sind bei Primärneuronen zytotoxisch und ineffizient. Der in Kapitel 1.4 erwähnte breite Tropismus der hier verwendeten Lentiviren gelingt durch die Verwendung von VSV-Glykoprotein G als Oberflächenprotein der Viren (Naldini et al., 1996). Die Synthese replikationskompetenter Viren wird verhindert durch das Entfernen eines 133bp großen DNA-Abschnitts in der U3 Region der 3'LTR (*Long Terminal Repeats*), inklusive TATA-Box. Dadurch werden keine Gene des ursprünglichen lentiviralen Genoms übertragen und die Lentiviren inaktivieren sich nach Infektion der Zielzellen selbst (Poznansky et al., 1991). Die Produktion von Lentiviren erfolgte in einem mehrstufigen Prozess. Zunächst wurden lentivirale Plasmide in HEK-Zellen transfiziert, wonach die Zellen als Wirte mit der Virusproduktion in das Zellmedium begannen. Anschließend

wurde das Zellmedium steril filtriert, um es von abgelösten HEK-Zellen zu befreien, und die Viren durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert. Im letzten Schritt wurden die Lentiviren in HBSS aufgenommen und Zielzellen infiziert.

TRANSFEKTION UND ZELLMEDIUMABNAHME

Für die *Turbofect*-Transfektion der Virusplasmide in HEK-Zellen wurden folgende DNA-Plasmidmengen pro Kulturschale und 10 ml Medium eingesetzt: 5 µg VSV-g, 7,5 µg Δ8.9 und 2 µg des jeweiligen FUW-Plasmids. Nach sechsstündiger Inkubation des Transfektionsansatzes wurde das Medium gegen frisches DMEM ausgetauscht. Zwei bis vier Mal in Folge, je nach Vitalitätszustand der Zellen, wurde hiernach das Medium abgenommen und steril filtriert (Porengröße = 0,44µm). Bei Bedarf wurde das Filtrat direkt ultrazentrifugiert, ansonsten bis zur Zentrifugation in der Kühltruhe (-80 °C) zwischengelagert.

ULTRAZENTRIFUGATION

Die *Beckman Coulter*-Ultrazentrifuge wurde so eingestellt, dass sie das filtrierte Zellmedium (37,5ml je Zentrifugationstube) im *Beckman Coulter*-Rotor *SW28* bei einer Temperatur von 4°C für 2 h mit 20.000 rpm (je nach Höhe des Röhrchens zwischen 44436 g und 95389 g) zentrifugierte. Nach Abnahme des Überstandes wurde das konzentrierte Virenpellet in 600 µl HBSS resuspendiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend lagerte die Virensuspension entweder bei 4°C für kurzfristig anstehende Infektionen oder wurde längerfristig bei -80°C weggefroren.

INFEKTION

Am 15. Tag nach Präparation und Kultivierung wurden die embryonalen Rattenneuronen mit Lentiviren infiziert. Sowohl bei Hippocampus- als auch bei Cortexneuronen kamen gleiche Viruskonzentrationen zum Einsatz: Auf 1ml Neurobasal-Medium (ein *well*) in einer 12-*Well*-Schale mit Hippocampusneuronen kamen 20 µl HBSS mit Lentiviren; zu jeder Kulturschale mit Cortexneuronen mit 10 ml Neurobasal-Medium wurden 200 µl Viren-HBSS gegeben.

2.3.4 Isolation von Hippocampus -und Cortexneuronen aus Rattenembryonen

NEURONENPRÄPARATION

An Tag 18-20 nach Schwangerschaftsbeginn wurde eine schwangere Ratte durch CO_2-Begasung betäubt und mithilfe einer Tischguillotine dekapitiert. Anschließend wurde das Fell mit 70% Alkohol desifinziert. Zur Eröffnung des Bauchraumes wurden Fell und Bauchmuskulatur durchtrennt und die Gebärmutter mit den Rattenembryonen entnommen. Der auf Eis gekühlte Gebärmutterschlauch wurde aufgetrennt, die Rattenembryonen entnommen und der Kopf mit einer scharfen Schere vom Rumpf getrennt. Im Anschluss wurde die Kopfhaut entfernt, die Schädeldecke eröffnet und die Gehirne entnommen. Nach dem Transfer in Präparationsschalen mit HBSS wurden am rostralen Ende der Gehirne die Riechkolben mithilfe einer Pinzette entfernt. Hiernach wurden die Großhirnhemisphären von Stammhirn und Kleinhirn getrennt und ihre Hirnhaut abgezogen. Hippocampi und Hirnhälften der Rattenembryonen wurden voneinander separiert und getrennt weiterbehandelt.

KULTIVIERUNG VON HIPPOCAMPUSNEURONEN

Hippocampi wurden in 4,5 ml HBSS aufgenommen und nach Zugabe von 500 µl 10x Trypsin für 15 min bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurde das Gewebe viermal mit 10 ml Plating Medium gewaschen. Um die Zellen zu vereinzeln, wurden sie wiederholt durch 2-3 Glaspipetten mit zunehmend kleineren Diametern trituriert. Danach wurde die Zellzahl in einer Zählkammer unter dem Mikroskop ermittelt und die Zellen bei einer Dichte von 150.000/ml auf PLL-beschichteten Deckgläschen in 12-well-Schalen ausplattiert. Nach dreistündiger Inkubationszeit, in der die Neurone auf die Deckgläschen absacken, wurde das *Plating Medium* gegen frisches *Neurobasal*-Medium ausgetauscht (für Zusätze zum Neurobasal-Medium siehe Tabelle 2.15). Das *Neurobasal*-Medium wurde nach zweitägiger Inkubation im Zellkulturinkubator (37 °C und 5 %ige CO_2-Umgebungsluft) durch Glutamat-freies *Neurobasal* ersetzt.

KULTIVIERUNG VON CORTEXNEURONEN

Cortices wurden nach Isolation aus den Embryogehirnen ebenfalls in HBSS aufgenommen (36 ml) und mit 5 ml 10x Trypsin für 30 min inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit jeweils 40-45 ml *plating*-Medium wurden auch sie trituriert. Im Anschluss an die

Vereinzelung wurde das Cortexzellmedium filtriert (Porengröße 70 µm) und auf 10 cm-Kulturschalen ausplattiert. Wechsel der Medien erfolgte entsprechend dem Zellmediumwechsel bei den Hippocampusneuronen.

ZUSATZ /ml *NEUROBASAL*	*NEUROBASAL* (TAG 0)	*NEUROBASAL* (TAG 2)
B-27	20 µl	20 µl
L-Glutamin	0,5 mM	0,5 mM
Primocin	100 µg	-
Glutamat	25 µM	-

TABELLE 2.15 ZUSAMMENSETZUNG DES ZELLMEDIUMS ZUR PRIMÄRKULTIVIERUNG VON NEURONEN

BESCHICHTUNG VON DECKGLÄSERN UND KULTURSCHALEN MIT POLY-L-LYSIN (PLL)

Die Deckgläser für die Kultivierung von Hippocampusneuronen wurden zunächst durch mehrmaliges Waschen mit 70 %igem Ethanol desinfiziert. Anschließend wurden sie für mindestens 3h im Backschrank bei >180 °C gebacken. Vor der Neuronenpräparation wurden die Deckgläschen über Nacht mit PLL (1 mg/ml) inkubiert. Anschließend wurde das PLL 3-4x mit sterilem H_20 abgewaschen. Die 10 cm-Kulturschalen wurden für lediglich 15 min mit PLL beschichtet, anschließend wurde das PLL ebenfalls mit sterilem H_20 abgewaschen.

2.3.5 Stimulierung und Blockade der Aktivität von Neuronenkulturen

Hippocampus- und Cortexneurone wurden nach 19-23 Tagen in Kultur fixiert bzw. aufgereinigt. Ein Teil der Cortexneurone wurde vor PSD-Präparation mit Neurotoxinen behandelt.

BLOCKADE DER NEURONALEN AKTIVITÄT DURCH TETRODOTOXIN (TTX)

Um die synaptische Aktivität der Neurone zu unterdrücken, wurden dem Kulturmedium Tetrodotoxin (TTX) zugegeben (Endkonzentration = 1 µM). Das Nervengift TTX hemmt spannungsaktivierte Natriumkanäle durch Bindung an die extrazelluläre Porenöffnung der Kanäle. Dadurch können die Zellen nicht mehr depolarisieren, Aktionspotentiale und Transmitter-Ausschüttung bleiben aus. Das hat zur Folge, dass jegliche neuronale Aktivität unterdrückt wird. Für die hier beschriebenen Experimente wurde das Kulturmedium mit

Tetrodotoxin nach 40 minütiger Wirkdauer wieder abgenommen und die Zellen fixiert bzw. für biochemische Aufreinigung der postsynaptischen Dichte verwendet.

STIMULIERUNG DES NMDA-REZEPTORS DURCH N-METHYL-D-ASPARTAT (NMDA)

Einer Stimulation der *NMDA*-Rezeptoren für Glutamat durch den Agonisten N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) ging eine Blockade der Neuronenaktivität durch TTX voraus. Wie oben beschrieben, wurde dem Kulturmedium zur Blockade der Transmitteraktivität TTX (Endkonzentration = 1 µM) zugegeben. Nach einer Wirkdauer von 30 min wurde das TTX-haltige Medium durch Stimulationsmedium ersetzt: Die Stimulation erfolgte hierbei durch NMDA (Endkonzentration = 50 µM) bei gleichzeitiger Blockade der spannungsabhängigen Natriumkanäle durch TTX (ebenfalls 1 µM) für 10 min.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Fixierung von kultivierten Hippocampusneuronen

Im Anschluss an die Behandlung der Hippocampusneurone mit den oben beschriebenen Neurotoxinen wurde jede weitere Zellaktivität durch Fixierung unterbunden. Zunächst wurden die Neurone nach Abnahme des Zellmediums einmal mit *Phosphate Buffered Saline* (PBS) gewaschen und danach fixiert: Entweder für 15-20 min mit Paraformaldehyd (PFA; 4%) auf Eis oder bei -20°C mit reinem Methanol für 15 min. Anschließend wurde PFA mit PBS abgewaschen und die fixierten Neurone bis zur ihrer immuncytochemischen Färbung bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

2.4.2 Immunzytochemie hippocampaler Rattenneurone

Mittels Immunzytochemie wurde die subzelluläre Verteilung von Proteinen in den kultivierten Neuronen untersucht. Hierfür wurden die fixierten Deckgläschen mit den Hippocampusneuronen im Anschluss an die Aufbewahrung im Kühlschrank auf lichtundurchlässige Färbeplatten umgesetzt. Zunächst wurden die Neurone mit 2% Pferdeserum (in PBS) für 1-2h geblockt, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern. Als nächstes wurde auf die Deckgläschen die Primärantikörperlösung (2% HS, 0,1% Triton-X 100) gegeben und über Nacht im Kühlschrank inkubiert (zu

Verdünnungsfaktoren der Antikörper siehe Tabelle 2.6). Durch dreimaliges Waschen mit PBS wurden ungebundene Erstantikörper von den Deckgläschen gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläschen für zwei Stunden mit gegen den Primärantikörper gerichteten fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern (in 2 % HS und 0,1 % Triton-X 100) inkubiert. Die Unterscheidung der Proteine erfolgte unter dem Mikroskop durch verschiedene Fluoreszenzmarkierungen der Zweitantikörper (Alexa 488 für grüne Färbung, Cy3 für rote Färbung). Schließlich wurden die Zweitantikörper dreimal mit PBS abgewaschen und die Deckgläschen mit Permafluormedium invers auf Objektträgern eingebettet, so dass die Hippocampusneurone zwischen Deckgläsern und Objektträgern geschützt zu liegen kamen.

2.4.3 Biochemische Aufreinigung der postsynaptischen Dichte (PSD-Präparation) aus kultivierten Cortexneuronen aus Rattenembryonen

Um die Anreicherung von Proteinen in der PSD von Cortex-Neuronen nachzuverfolgen, wurde in mehreren Zentrifugationsschritten die PSD vom übrigen Teil der Zellen isoliert. Zur Zusammensetzung der Puffer (*Puffer 1*, *Puffer 2* und *Puffer 3)* der PSD-Präparation siehe Tabelle 2.16. Zunächst wurden Cortexneurone nach 19-23 d in Kultur mit Neurotoxinen stimuliert oder deren Transmitter-Aktivität blockiert. Anschließend wurde das Zellmedium von den Cortexneuronen genommen und die Neurone in 1 ml *Puffer 1* von der Kulturschale abgeschabt. Hiernach wurden die Neurone im Glas-Teflon-Homogenisierer auf Eis zerkleinert und 100 µl des Homogenats als Probe *P1* abgenommen. Die Kerne der Neurone wurden bei 1000 g für 10 min aus dem Homogenat abzentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde der Zentrifugationsüberstand abgenommen und für eine kurze Zeit auf Eis gestellt. Währenddessen wurde die Kulturschale mit einem weiteren ml *Puffer 1* abgespült, um damit das Kern-Pellet des vorausgegangenen Zentrifugationsschrittes zu resuspendieren. Nach Zentrifugation (1000 g, 10 min) wurde wiederum auch hier der Überstand abgenommen und mit dem vorherigen, auf Eis gekühlten, vereint. Bei der nun folgenden Zentrifugation wurden die Synaptosomen (Pellet) von den übrigen Zellorganellen getrennt (10.000 g, 15 min) und in *Puffer 1* resuspendiert. Hiervon wurde bei einigen PSD-Präparationen eine Probe *P2* als Synaptosomenfraktion entnommen, anschließend folgte eine erneute Zentrifugation (10.000 g, 15 min) und Resuspension des Pellet in *Puffer 2*. Durch osmotische Lyse und

durch das Homogenisieren im Glas-Teflon-Homogenisierer werden die Synaptosomen-membranen geöffnet. Schließlich erfolgte die Trennung der PSD-Proteine von den Synaptosomen-Membranen durch Zentrifugation (20.000 g, 30 min), Resuspension des Pellets in *Puffer 3* und Lösung der Membranbestandteile durch das Detergenz Triton-X 100 (zu 0,5% v/v). Nach einer letzten Zentrifugation (20.000g g, 40 min) erfolgte die Resuspension des Pellets in 100 µl *Puffer 3*. Diese Fraktion wurde als *Postsynaptische Dichte* (PSD) für weitere Analysen verwendet.

PUFFER 1	***PUFFER 2***	***PUFFER 3***
4 mM HEPES mit: - 1 Tab. Complete™ (auf 50 ml Puffer) - 2mM EDTA - 50 mM NaF - 1mM NaOrthovanadat - 0,32 M Saccharose	4 mM HEPES mit: - 1 Tab. Complete™ (auf 50 ml Puffer) - 2mM EDTA - 50 mM NaF - 1mM NaOrthovanadat	50 mM HEPES - 1 Tab. Complete™ (auf 50 ml Puffer) - 2mM EDTA - 50 mM NaF - 1mM NaOrthovanadat

TABELLE 2.16 ZUSAMMENSETZUNG DER PUFFER FÜR DIE AUFREINIGUNG DER POSTSYNAPTISCHEN DICHTE; COMPLETE™ = PROTEASE INHIBITOR

2.4.4 Zelllyse

Die Lyse von Neuronen und HEK-Zellen erfolgte nach dem gleichen Prinzip: Zunächst wurden die Zellen mit 4°C-kaltem PBS gewaschen und anschließend für 15 min auf Eis mit RIPA-Lysepuffer (inkl. Phosphataseinhibitoren; Zusammensetzung siehe Tabelle 10.4) lysiert. Nachfolgend wurden die gelösten Proteine durch Zentrifugation bei 20.000 g und 4°C für 15 min von Zelltrümmern getrennt.

2.4.5 Natrium (Sodium)-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Zur Analyse wurden Proteine anhand ihres Molekulargewichtes in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Durch Zugabe von 5x-Laemmli-Probenpuffer und 10-minütiges Erhitzen

auf 95°C wurden die Proteine vor dem *SDS-Page* denaturiert. In Folge dessen konnten Sekundär- und Tertiärstrukturen wie Wasserstoffbrückenbindungen oder Disulfidbrücken aufgeschlossen werden. Die denaturierten Proben wurden auf ein Polyacrylamidgel geladen (von *SDS-Page*-Laufpuffer umgeben) und durch ein angelegtes elektrisches Feld (mit einer Spannung von 100-150 V) über das Gel hinweg in *Mini-Protean III-Page*-Kammern aufgetrennt. Entsprechend dem von Ulrich Laemmli beschriebenen diskontinuierlichen *SDS-Page*-System wurden die Proteine nach Durchlaufen eines Sammelgels vor einem Trenngel abgebremst, gesammelt und anschließend im Trenngel aufgetrennt. Die weitere Analyse der Proteine erfolgte nach Übertragen aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran.

2.4.6 Proteintransfer durch *Western Blot* und Immundetektion von Proteinen

Die Proteine des Polyacrylamidgels wurden in einem elektrischen Feld auf die Nitrozellulosemembran transferiert. Dieser Transfer erfolgte, gekühlt durch einen Eisblock, in einer *Wetblot*-Apparatur (*Biorad*) bei einem konstanten Stromfluss von 90 mA über Nacht oder für 1-2h bei 400 mA. Die Nitrozellulosemembran wurde anschließend in *Tris-buffered Saline-Tween 20* (TBS-T) mit 5% Magermilchpulver blockiert. Das zu analysierende Protein wurde im Anschluss in TBS-T mit 5% Magermilchpulver und dem spezifischen Erstantikörper (Konzentration siehe Tabelle 2.6) bei 4°C über Nacht oder bei Raumtemperatur für 2h inkubiert. Als nächstes wurden ungebundene Erstantikörper dreimal mit TBS-T (für jeweils 10min) von der Membran gewaschen, bevor gebundene Erstantikörper selektiv mittels Zweitantikörpern (in TBS-T; Konzentration siehe Tabelle 2.7) für 1h inkubiert wurden. Die eigentliche Detektion erfolgte durch Meerrettichperoxidase (*Horseradish Peroxidase*, HRP), die mit dem Zweitantikörper konjugiert waren. Substrate (*Pierce ECL Western Blotting Substrate*) werden durch die HRP oxidiert und lumineszieren. Anschließend wurden Röntgenfilme (*Cronex 5 Medical X-Ray Film, AGFA*) belichtet und nach entsprechender Exposition entwickelt. Für eine quantitative Auswertung wurde die Photoaktivität im *ChemiDoc XRS Imager*-System aufgezeichnet.

2.5 Auswertung

2.5.1 Quantifizierung der postsynaptischen Anreicherung von IRSp53

Um die Anreicherung eines exprimierten Proteins in der PSD quantifizieren zu können, wurden die Proteinproben mit einem Antikörper gegen IRSp53 gefärbt. Auf den *Blots* (Abbildung 2.1 A) sind zunächst die Proteinproben aus den einzelnen Schritten der Aufreinigung der postsynaptischen Dichte zu erkennen. Links aufgetragen sind die Proben P1, P2 und P3 von Neuronen, die mit Lentiviren infiziert waren, die zur Expression des Wildtyp-IRSp53 führten. Rechts daneben sind beispielhaft die Proben P1, P2 und P3 von Neuronen zu erkennen, die mit Lentiviren infiziert waren, die die Information für IRSp53 mit mutierten Domänen enthielten (In diesem Beispiel ein mutiertes PDZ-Bindemotiv). Auf den *Blots* ist zum einen eine Doppelbande bei ca. 55 kDa zu erkennen, die dem endogen produzierten IRSp53 entspricht. Zum anderen ist bei ca. 90 kDa die Bande für das Fusionsprotein GFP-IRSp53 zu erkennen, das rechnerisch eine Größe von 87 kDa besitzt.

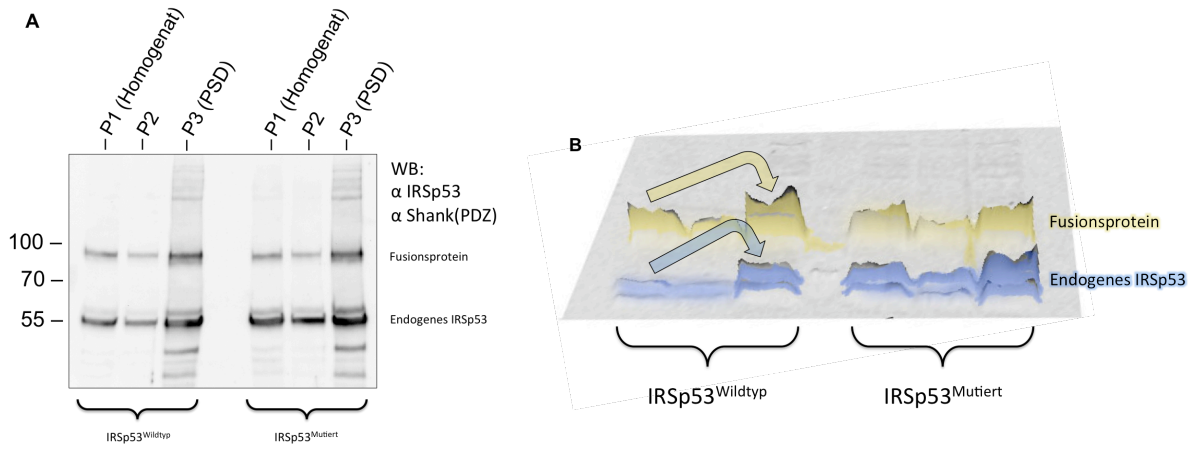

ABBILDUNG 2.1 PSD-AUFREINIGUNG AUS NEURONEN UND VORBEREITUNG DER QUANTITATIVEN AUSWERTUNG

A DIE PROTEINPROBEN SIND AUS EINZELNEN SCHRITTEN DER PSD-AUFREINIGUNG AUFGETRAGEN; LINKS AUS NEURONEN NACH INFEKTION MIT GFP-IRSP53-WILDTYP-LENTIVIREN, RECHTS AUS NEURONEN NACH INFEKTION MIT GFP-IRSP53$^{*PDZ-BM}$-LENTIVIREN; PROBE P1 FÜR DAS HOMOGENE ZELLLYSAT DER NEURONEN, P2 FÜR EINEN ZWISCHENSCHRITT DER AUFREINIGUNG, P3 FÜR DIE POSTSYNAPTISCHE FRAKTION; FÄRBUNG MIT ANTIKÖRPERN GEGEN IRSP53 UND SHANK (PDZ); AUF DEN BLOTS IST DIE ANREICHERUNG VON SHANK VOM HOMOGENAT ZUR PSD HIN ZU ERKENNEN, ZUDEM BEI 53-55 KDA DIE PHYSIOLOGISCHE IRSP53-BANDE, BEI CA. 90 KDA DIE DES FUSIONSPROTEINS; SOWOHL DIE ENDOGENEN PROTEINE, ALS AUCH DIE FUSIONSPROTEINE ZEIGEN EINE ANREICHERUNG ZUR PSD HIN **B** 3-DIMENSIONALE DARSTELLUNG VON **A**; ZUR ERMITTLUNG DER ANREICHERUNG WIRD EIN QUOTIENT AUS PROTEINMENGE IN DER PSD UND PROTEINMENGE IM HOMOGENAT GEBILDET; ANSCHLIEßEND WERDEN ANREICHERUNG VOM GFP-IRSP53-FUSIONSPROTEIN UND ANREICHERUNG DES ENDOGENEN IRSP53 VERGLICHEN

Anschließend wurden die Banden manuell markiert (Abbildung 2.2) und durch das Programm *ImageLab* über die Bandenintensität die Proteinmenge ermittelt (durch Antikörper angefärbte Bandenintensität proportional zur Proteinmenge; Abbildung 2.3).

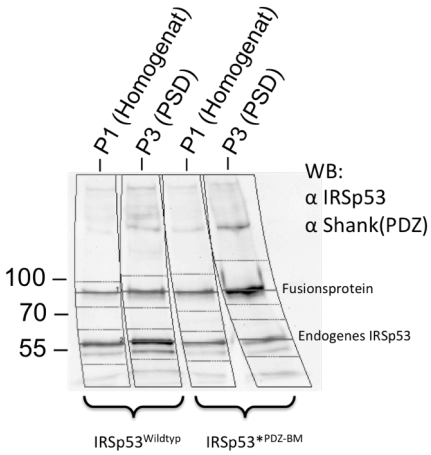

ABBILDUNG 2.2

MANUELLE BANDENMARKIERUNG EINES *WESTERN BLOT* IM PROGRAMM *IMAGELAB*

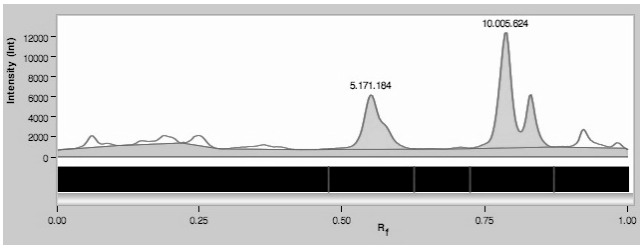

ABBILDUNG 2.3 **ERMITTLUNG DES BANDENINTEGRALS ZUR PROTEINMENGENBESTIMMUNG DURCH DAS PROGRAMM *IMAGELAB***

Danach wurde ein Quotient gebildet: Proteinmenge des Fusionsproteins in der PSD durch Proteinmenge des Fusionsproteins im Homogenat (Gelber Pfeil in Abbildung 2.1 B). Dies entspricht der Anreicherung des Fusionsproteins vom homogenen Zelllysat zur postsynaptischen Dichte. Anschließend wurde der gleiche Quotient für das endogene Protein IRSp53 gebildet (Blauer Pfeil in Abbildung 2.1 B). Diese Quotienten entsprechen der absoluten Anreicherung der jeweiligen Proteine. Um allerdings die einzelnen Konstrukte besser miteinander vergleichen zu können, wurde im nächsten Schritt die Anreicherung des endogenen Proteins als interne Kontrolle gewählt. Deshalb wurden beide Anreicherungen wieder miteinander verglichen und ein neuer Quotient gebildet: Anreicherung des Fusionsproteins durch Anreicherung des endogenen IRSp53. In Tabelle 2.17 ist beispielhaft die Ermittlung der Relativen Anreicherung für den *Western Blot* von Abbildung 2.1 gezeigt.

Lentiviren	Protein	Bande	Integral der Bande	Anreicherung PSD/Homogenat	Relative Anreicherung
Wildtyp IRSp53	Fusionsprotein	Homogenat	4613528	2,721	**2,234**
		PSD	12552708		
	Endogenes P.	Homogenat	4218720	1,218	
		PSD	5139792		
Mutiertes PDZ-Bindemotiv	Fusionsprotein	Homogenat	2512580	2,0581	**1,254**
		PSD	5171184		
	Endogenes P.	Homogenat	6098330	1,641	
		PSD	10005624		

TABELLE 2.17 ERMITTLUNG DER ANREICHERUNG DES EXPRIMIERTEN IRSP53-PROTEINS

MITTELS QUOTIENTEN AUS DEN FLÄCHENINTEGRALEN DER BANDEN WERDEN ZUNÄCHST DIE ANREICHERUNGEN VON FUSIONSPROTEIN UND ENDOGENEM IRSP53 ERMITTELT: INTEGRAL (PSD) / INTEGRAL (HOMOGENAT) ERMITTELT; ANSCHLIEßEND ERGIBT SICH HIERAUS DIE RELATIVE ANREICHERUNG: ANREICHERUNG DES FUSIONSPROTEINS ZUR ANREICHERUNG DES ENDOGENEN PROTEINS; ZUM DAZUGHÖRIGEN WESTERN BLOT SIEHE ANHANG ABBILDUNG 10.2

2.5.2 Statistische Auswertung

Vor der statistischen Auswertung wurden die einzelnen Experimente verschlüsselt und *verblindet* ausgewertet. Danach wurden die Rohdaten mithilfe der Einweg-Varianzanalyse (*One-Way ANOVA*) auf Signifikanz überprüft. Hierbei wird der Einfluss einer unabhängigen, nominalskalierten Einflussvariable (z.B. die einzelnen Konstrukte $IRSp53^{Wildtyp}$, $IRSp53^{IMD}$ usw.) auf eine abhängige, metrisch skalierte Zielvariable (Integral der Banden auf den *Western Blots*, d.h. Menge an IRSp53 in der PSD) überprüft. Zusätzlich stellt die Varianzanalyse fest, ob die Gruppeneinteilung sinnvoll ist und wie sich die Varianz der Ergebnisse zwischen den Gruppen bzw. innerhalb der Gruppen verhält (Janssen and Laatz, 2013). Über die Summe der Abweichungsquadrate (SAQ) innerhalb der Gruppen bzw. zwischen den Gruppen und über die Freiheitsgrade lässt sich die Varianz (σ^2) innerhalb der Gruppen und zwischen den Gruppen berechnen.

$SAQ_{innerhalb}$ = Variation innerhalb der Gruppen

$$\mathrm{SAQ}_{innerhalb} = \sum (x - \bar{x}_{innerhalb})^2$$

$SAQ_{zwischen}$ = Variation zwischen den Gruppen

$$SAQ_{zwischen} = \sum_{i=1}^{k} n_i \, (\bar{x}_i - \bar{x}_T)^2$$

σ = Standardabweichung

$$\sigma^2{}_{innerhalb} = \frac{SAQ_{innerhalb}}{df} \qquad \sigma_{zwischen}{}^2 = \frac{SAQ_{zwischen}}{df}$$

Der Quotient aus der Varianz zwischen den Gruppen und der Varianz innerhalb der Gruppen dient als Testgröße dafür, ob die Schwankungen zwischen den Gruppen zufälliger Natur sind oder ob zwischen den Gruppen ein signifikanter Unterschied zu erkennen ist. Diese Größe wird als F bezeichnet (Janssen and Laatz, 2013):

$$F = \frac{\sigma^2_{zwischen}}{\sigma^2_{innerhalb}}$$

Aus F und df ergeben sich unterschiedliche Signifikanzniveaus zum Zutreffen der Nullhypothese, die sich aus F-Tabellen ermitteln lassen.

$p \leq 0{,}05$ Zu 95%iger Sicherheit ist der ermittelte Zusammenhang nicht zufälliger Natur. Abbildungen sind mit einem Stern markiert (*).

$p \leq 0{,}01$ Zu 99%iger Sicherheit ist der ermittelte Zusammenhang nicht zufälliger Natur. Abbildungen sind mit zwei Sternen markiert (**).

III ERGEBNISSE

3.1 Etablierung des lentiviralen Vektorsystems

Zu Beginn des experimentellen Teils dieser Arbeit erfolgte zunächst die Etablierung eines lentiviralen Vektorsystems für die Proteinexpression in kultivierten Neuronen. Wie in den Kapiteln I und II kurz erläutert werden drei Plasmide zur Herstellung der Viren benötigt: VSV-G für das Oberflächenprotein, FUW als Transfervektor mit der genetischen Information für das Zielprotein und Δ8.9 als Verpackungsvektor, der für einige der viralen Proteine kodiert. Diese werden in HEK293T-Zellen transfiziert, welche dann Lentiviren synthetisieren und sie ins Zellmedium abgeben.

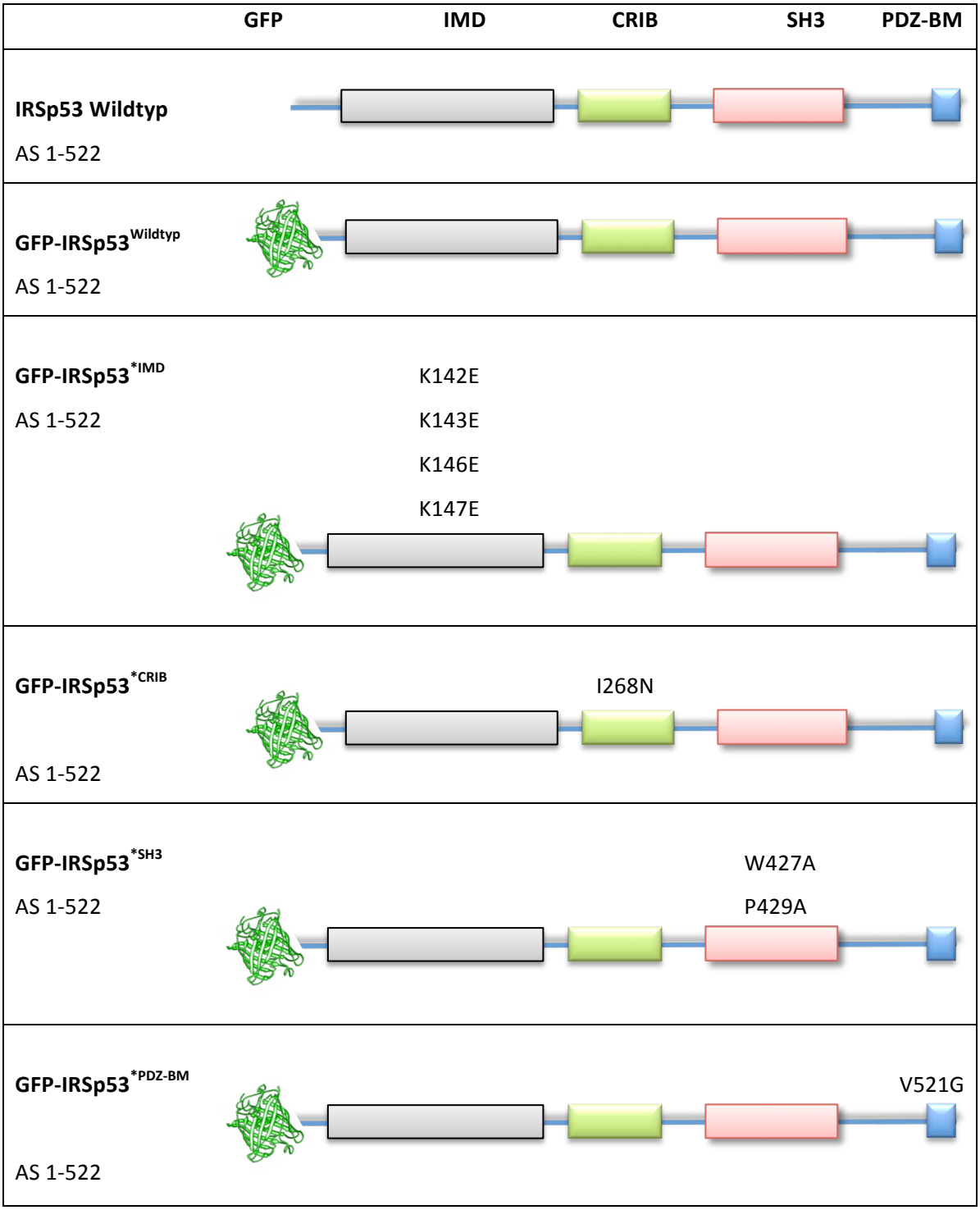

ABBILDUNG 3.1 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER VERWENDETEN KONSTRUKTE VON IRSP53

ES SIND DIE EINZELNEN DOMÄNEN VON IRSP53 UND DIE GFP-MARKIERUNG GEZEIGT; ENTSPRECHEND DER LITERATUR HABEN DIE EXPRIMIERTEN PROTEINE DURCH MUTATIONEN IN DER BASENSEQUENZ DIE BINDEFÄHIGKEIT ZU IHREN PARTNERPROTEINEN VERLOREN: IRSP53*IMD (Millard et al., 2005), IRSP53*CRIB (Krugmann et al., 2001), IRSP53*SH3 (AG KREIENKAMP) UND IRSP53*PDZ-BM (Kornau et al., 1995); ZUSÄTZLICH SIND GESAMTLÄNGE DER AMINOSÄURENSEQUENZ (AS 1-522) UND DIE AUSGETAUSCHTEN AMINOSÄUREN ANGEGEBEN

3.1.1 Konstrukte zur Expression von IRSp53

Im ersten Schritt waren von Hans-Hinrich Hönck (AG Kreienkamp) entsprechend den Publikationen zu den Domänen von IRSp53 oder verwandten Proteinen Mutationen in die Wildtyp-cDNA von IRSp53 eingeführt worden. Abbildung 3.1 gibt einen Überblick über die Veränderungen auf Primärstrukturebene: Durch den Austausch von vier Lysinen gegen vier Glutamatreste an den Aminosäuren (AS) 142, 143, 146, 147 beispielsweise kann die IM-Domäne die Phospholipide (Mattila et al., 2007) und Aktin (Millard et al., 2005) nicht mehr binden. Der Austausch eines Isoleucin gegen Asparagin (AS 268) verhindert Cdc42-Bindung (GTP-gebunden) an CRIB (Krugmann et al., 2001). Die SH3-Domäne verliert durch zwei Alanine anstelle von Tryptophan (AS 427) und Prolin (AS 429) die Fähigkeit zur Bindung an ihre Bindepartner (AG Kreienkamp). Das C-terminale PDZ-Bindemotiv schließlich, durch das IRSp53 Bindungen zu PSD-95 oder LIN7 eingeht, verliert durch Mutation eines Valin zu Glycin seine physiologische Bindefähigkeit (AS 521; Kornau et al., 1995). Effektivität und Spezifität der genannten Mutationen wurden von Kristin Bobsin und Hans-Hinrich Hönck aus der Arbeitsgruppe Kreienkamp im Hinblick auf ihre Interaktionspartner überprüft. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Überprüfung der *Missense*-Mutationen mittels DNA-Sequenzierung nach Sanger (siehe Tabelle 2.5).

3.1.2 Genetische Veränderungen des Vektors FUW

Im nächsten Schritt wurden die für GFP-IRSp53 kodierenden cDNAs aus dem pEGFP-Vektor in das FUW-Plasmid kloniert. Dabei fiel auf, dass das Restriktionsenzymschnittmuster für FUW durch BglII nicht dem Muster entsprach, das die publizierte Sequenz von FUW erwarten lässt (Siehe Abbildung 3.2). Statt fünf Schnittfragmenten waren sechs zu sehen. Ein zu erwartendes 3800 bp umfassendes Fragment war in ein 2100 bp und ein 1700 bp großes Fragment geteilt. Dieser Abschnitt wurde sequenziert, wobei sich eine neue Schnittstelle für das Restriktionsenzym BglII (Siehe Kontroll-Sequenzierung, Tabelle 10.5 im Anhang) fand. Da sich diese veränderte Basensequenz allerdings vor dem Ubiquitin-Promotor befand, kann davon ausgegangen werden, dass die Funktion des Vektors nicht beeinträchtigt ist.

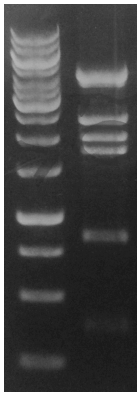

ABBILDUNG 3.2 GELELEKTROPHORESE DES FUW-VEKTORS NACH RESTRIKTIONSVERDAU MIT BGLII:

LINKE SPUR: DNA-LEITER: GENERULER 1 KB DNA LADDER; RECHTE SPUR: ANSTELLE EINES 3800 BP UMFASSENDEN FRAGMENTES SIND EIN 2100 BP UND EIN 1700 BP UMFASSENDES FRAGMENT ZU SEHEN.

3.1.3 Produktion der Viren

Nach Transfektion der Vektoren Δ8.9, VSV-G und FUW (jeweils mit GFP und IRSp53-Wildtyp-Sequenz oder der jeweiligen Mutation) in HEK293T-Zellen wurde der Erfolg der Transfektion unter dem Mikroskop durch den Nachweis der GFP-Fluoreszenz überprüft. Die Viren wurden aus dem steril-filtierten Zellmedium mittels Ultrazentrifugierung aufkonzentriert. Das virenhaltige Pellet wurde anschließend resuspendiert und stand für die Infektion von Neuronen zur Verfügung. Die Überprüfung der erfolgreichen Virenproduktion erfolgte schließlich mittels *Western Blot*-Analyse infizierter Zellen (siehe Abbildung 3.3). Verschieden behandelte HEK-Zellen wurden miteinander verglichen: Als erstes wurden unbehandelte HEK-Zellen als Negativkontrolle benutzt. Die Positivkontrolle bildeten HEK-Zellen, die mit DNA des Wildtyp-Konstrukt FUW-GFP-IRSp53 transfiziert worden waren. Schließlich wurde eine dritte HEK-Zellreihe mit den Lentiviren aus dem Zellüberstand der zuvor transfizierten HEK-Zellen (FUW, Δ8.9 und VSV-G) infiziert. Die postnuklearen Proteinlysate zeigen im *Western Blot* eine erfolgreiche Infektion durch die Lentiviren. Die IRSp53-Antikörper-Färbung zeigt bei allen Proteinproben eine Doppelbande für das endogen exprimierte IRSp53 (53kDa und 58kDa). Die FUW-GFP-IRSp53-Transfektion und die Infektion mit GFP-IRSp53-Lentiviren führten zu einer weiteren Bande bei ca. 90 kDa, die dem Fusionsprotein GFP-IRSp53 entspricht (rechnerisch 87 kDa, Abbildung 3.3 A). In der Negativkontrolle ist diese Bande dagegen nicht zu sehen. Das Färben mit dem GFP-Antikörper zeigt zwar einige unspezifische Banden, als deutlichste Bande ist nach Lentivirus-Infektion, sowie nach Transfektion bei 87 kDa dennoch das GFP-IRSp53-Fusionsproteins zu erkennen (Abbildung 3.3 B).

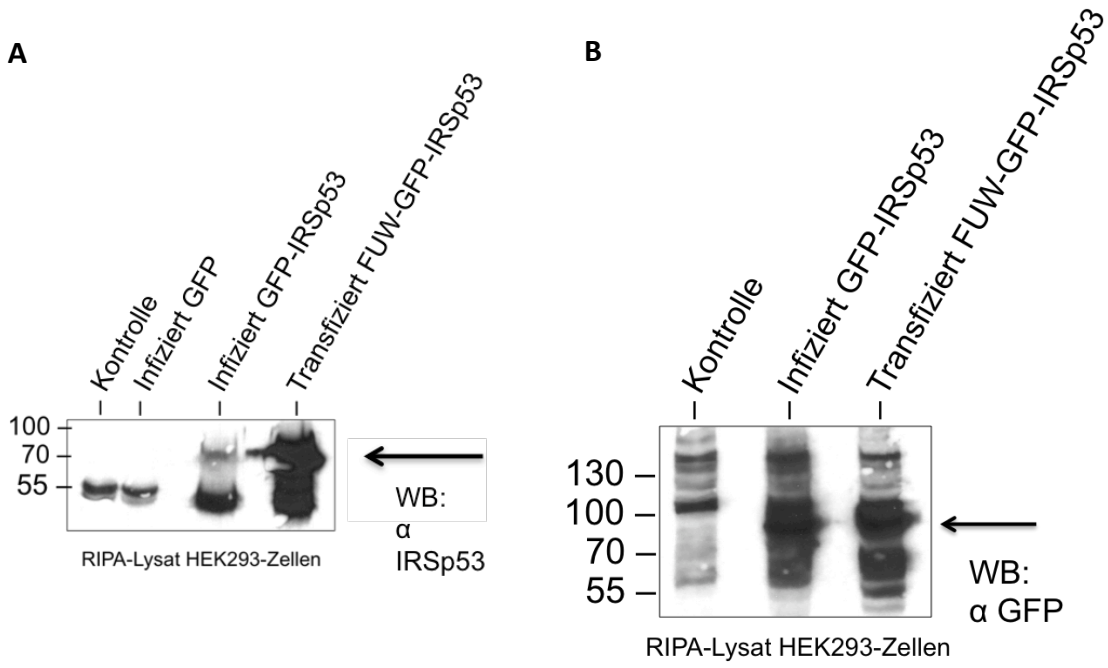

ABBILDUNG 3.3 *WESTERN BLOTS* VON RIPA-LYSATEN AUS TRANSFIZIERTEN UND INFIZIERTEN HEK-ZELLEN:

A DIE HEK-ZELLLYSATE SIND ALS PROBEN AUFGETRAGEN UND MIT ANTIKÖRPER GEGEN IRSP53 GEFÄRBT; SOWOHL BEI UNBEHANDELTEN HEK-ZELLEN, ALS AUCH BEI HEK-ZELLEN NACH INFEKTION MIT GFP-KODIERENDEN LENTIVIREN, IST KEIN FUSIONSPROTEIN (87KDA) ZU ERKENNEN; NACH INFEKTION MIT GFP-IRSP53-KODIERENDEN LENTIVIREN, EBENSO WIE NACH FUW-GFP-IRSP53-TRANSFEKTION IST DAS FUSIONSPROTEIN ALS BANDE (87KDA) AUF DEN *BLOTS* ZU ERKENNEN; **B** FÄRBEN MIT GFP-ANTIKÖRPER ZEIGT DIVERSE UNSPEZIFISCHE BANDEN. DENNOCH IST ZU ERKENNEN, DASS UNBEHANDELTE HEK-ZELLEN KEINE BANDE AUF HÖHE DES FUSIONSPROTEINS AUFWEISEN; BEI GFP-IRSP53-INFIZIERTEN ZELLEN UND BEI FUW-GFP-IRSP53-TRANSFIZIERTEN ZELLEN IST SIE DAGEGEN ZU ERKENNEN (87KDA)

3.2 Proteinbiochemische Lokalisationsstudien zu IRSp53

In Anlehnung an bisherige Studien wurde ein eigenes Protokoll zur Präparation der PSD aus kultivierten Neuronen an die apparativen Voraussetzungen im Labor adaptiert. Für proteinbiochemische Analysen wurden Cortexneuronen, für immunzytochemische Färbungen dagegen Hippocampusneuronen verwendet. Nach Präparation der Neuronen aus embryonalen Rattengehirnen (18d p.c.) wurden diese am Tag 15 nach Kultivierung infiziert. An den Tagen 19-23 wurden die Neurone für immunzytochemische Färbungen fixiert oder die PSDs aufgereinigt. Die Analyse der Proben aus der PSD-Fraktionierung erfolgte mittels *Western Blot*. Zur Kontrolle der erfolgreichen Aufreinigung postsynaptischer Proteine wurden die *Western Blots* mit Antikörpern gegen die PDZ-Domäne der Shank-Proteine gefärbt. Proteine der Shank-Familie besitzen Molekulargewichte zwischen 130 kDa und 270 kDa. Aufschluss über den Erfolg der PSD-Aufreinigung ergab die Anreicherung der Shank-Proteine in der Probe P3 (PSD) gegenüber der Probe P1 (Homogenat; Abbildung 3.4 A).

Darüberhinaus wurden GFP-infizierte Neurone analysiert. Da GFP frei im Zytosol der Zelle vorliegt, dürfte es in der postsynaptischen Dichte nicht mehr nachzuweisen sein. Wie erwartet konnte kein GFP in der PSD-Fraktion nachgewiesen werden (Abbildung 3.4 B). Somit war sichergestellt, dass eine erfolgreiche Aufreinigung der postsynaptischen Dichte erfolgt war.

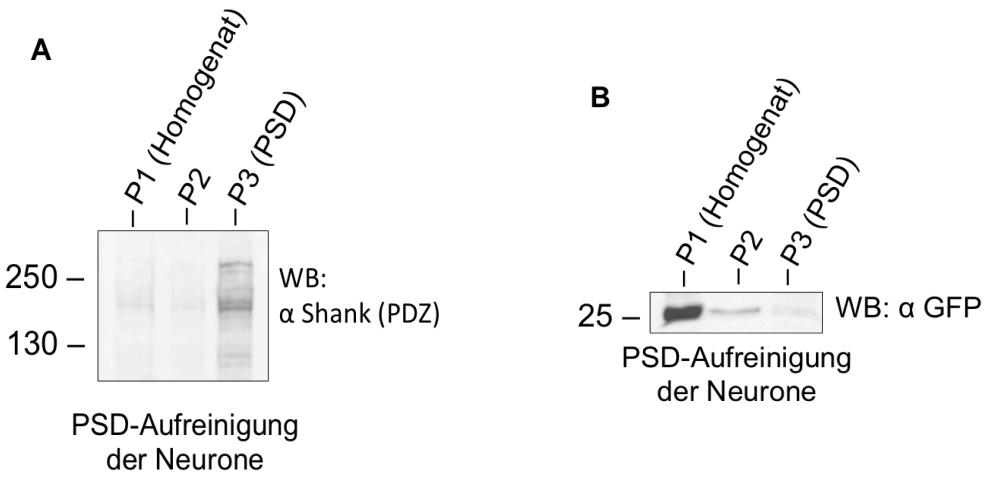

ABBILDUNG 3.4 *WESTERN BLOTS* VON PROTEINPROBEN AUS PSD-AUFREINIGUNGEN:

DIE PROTEINPROBEN SIND AUS EINZELNEN SCHRITTEN DER PSD-AUFREINIGUNG AUFGETRAGEN: P1 FÜR DAS HOMOGENE ZELLLYSAT DER NEURONEN, P2 FÜR EINEN ZWISCHENSCHRITT DER AUFREINIGUNG, P3 FÜR DIE POSTSYNAPTISCHE FRAKTION; **A** FÄRBUNG MIT ANTIKÖRPER GEGEN SHANK (PDZ); PROTEINE DER SHANK-FAMILIE BESITZEN MOLEKULARGEWICHTE ZWISCHEN 130 KDA UND 270 KDA; AUF DEN *BLOTS* IST DIE ANREICHERUNG VON SHANK VOM HOMOGENAT ZUR PSD HIN ZU ERKENNEN; **B** DIE NEURONEN SIND NACH 15D IN KULTUR MIT GFP-KODIERENDEN LENTIVIREN INFIZIERT WORDEN; FÄRBUNG MIT GFP-ANTIKÖRPER ZEIGT DIE GFP-BANDE IN DER ZYTOSOLISCHEN FRAKTION (CA. 30 KDA); IN DER PSD-FRAKTION DAGEGEN FEHLT SIE, ES IST KEIN GFP VORHANDEN

3.2.1 Translokation von IRSp53 in die PSD

Ob IRSp53 dauerhaft in der PSD lokalisiert ist oder einen Stimulus benötigt, ist nicht geklärt. Bei einigen Arbeitsgruppen war es ohne äußere Einflüsse in der PSD zu finden (Abbott et al., 1999; Bockmann et al., 2002; Soltau et al., 2002), Hori et al. (2005) hingegen berichten von einer Lokalisierung von IRSp53 in der PSD erst auf NMDA-Stimulierung hin. Diese Rekrutierungsversuche wurden mit Lentiviren als Vektorsystem wiederholt. Auf den *Blots* (Abbildung 3.5 A und B) sind zunächst die Proteinproben aus der Aufreinigung der postsynaptischen Dichten zu erkennen.

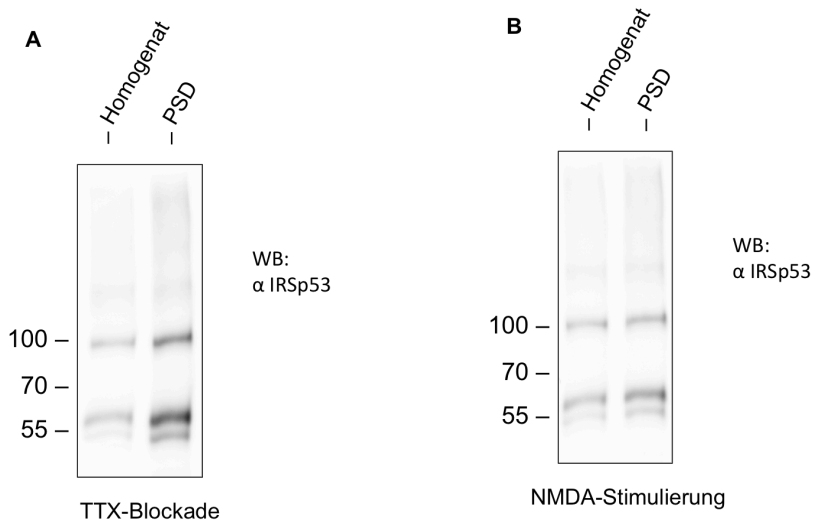

ABBILDUNG 3.5 *WESTERN BLOTS* VON PSD-AUFREINIGUNGEN NACH TTX-BLOCKADE UND NMDA-STIMULIERUNG:

DIE PROTEINPROBEN DES WB ENTSTAMMEN PSD-AUFREINIGUNGEN VON NEURONEN NACH INFEKTION MIT LENTIVIREN MIT IRSP53^{WILDTYP}-DNA: JEWEILS IST LINKS DAS HOMOGENAT DER NEURONEN, RECHTS DIE POSTSYNAPTISCHE FRAKTION AUFGETRAGEN; **A** NEURONEN NACH BLOCKADE DER NEURONALEN AKTIVITÄT DURCH TTX, ANSCHLIEßEND FÄRBUNG MIT ANTIKÖRPERN GEGEN IRSP53; **B** NEURONEN WURDEN MIT NMDA STIMULIERT

Es ist jeweils das homogene Zelllysat von Neuronen neben der aufgereinigten postsynaptischen Fraktion aufgetragen. Die Neuronen waren mit Lentiviren infiziert, die für Wildtyp-IRSp53 kodieren: In Abbildung 3.5 A ist die neuronale Aktivität 40 min. lang mit TTX blockiert worden, Abbildung 3.5 B dagegen zeigt die gezielte Aktivierung der neuronalen Aktivität durch NMDA (bei gleichzeitiger Blockade der präsynaptischen Aktivität mittels TTX). Bei 50-60 kDa ist die Doppelbande des endogen produzierten IRSp53 zu erkennen, bei ca. 90 kDa die Bande des Fusionsproteins GFP-IRSp53.

	SAQ_x	df	σ^2	$F = \frac{\sigma^2_{zwischen}}{\sigma^2_{innerhalb}}$	p-Wert
$SAQ_{TTX\text{-}NMDA}$	0,064526	1	0,064526	1,2093	0,28155
SAQ_{NMDA}	1,387314	26	0,053358		

TABELLE 3.1 EINFACHE VARIANZANALYSE DER REKRUTIERUNG VON IRSP53 IN DIE PSD

ES IST DIE EINFACHE VARIANZANALYSE FÜR DIE REKRUTIERUNG VON IRSP53 IN DIE PSD GEZEIGT; ES SIND DIE ANREICHERUNGEN UNTER NMDA-STIMULATION UND UNTER TTX-BLOCKADE GEZEIGT; FÜR WERTE INNERHALB DER GRUPPEN UND ZWISCHEN DEN GRUPPEN (TTX BZW. TTX+NMDA) WERDEN DIE SUMMEN DER ABWEICHUNGSQUADRATE (SAQ) GEBILDET; AUS IHNEN UND DEN FREIHEITSGRADEN (DF) ERGEBEN SICH VARIANZ (σ^2) UND VARIANZANALYTISCHER F-TEST (F); NMDA HAT KEINEN SIGNIFIKANTEN EINFLUSS AUF DIE REKRUTIERUNG VON IRSP53 IN DIE PSD GEGENÜBER EINER REINEN TTX-BLOCKADE

Es wurde überprüft, wie das endogene IRSp53 sich unter TTX-Blockade (n=17) bzw. nach NMDA-Stimulierung (n=11) verhält und der Unterschied mittels Einweg-Varianzanalyse (*One-Way ANOVA*) auf Signifikanz überprüft (Tabelle 3.1). Aus den varianzanalytischen F-Tests ergibt sich das Signifikanzniveau. Mit einer Wahrscheinlichkeit von 28.16 % ist die Nullhypothese, dass NMDA keinen signifikanten Effekt auf das Ausmaß der IRSp53-Rekrutierung in die PSD hat, anzunehmen. Aus statistischer Sicht spielt es somit bei der Anreicherung von IRSp53 in der PSD keine Rolle, ob die neuronale Aktivität durch TTX blockiert oder mittels NMDA stimuliert worden ist. Als Kontrolle wurde die Anreicherung von Shank verwendet.

3.2.2 PSD-Lokalisierung von IRSp53 in Abhängigkeit der funktionellen Domänen

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der funktionellen Domänen von IRSp53 auf die Lokalisierung des Proteins in der PSD überprüft. Zur detaillierten Erklärung der Quantifizierungsmethode siehe Kapitel 2.5.1. In Abbildung 3.6 zeigen die *Western Blots* von PSD-Aufreinigungen jeweils IRSp53-Antikörperfärbung des homogenen Zelllysats und der PSD-Fraktion für mittels Lentiviren eingebrachte cDNAs: IRSp53 mit Wildtyp-Sequenz (Abb. 3.6 A), GFP (Abb. 3.6 B) und die Fusionsproteine mit entsprechender *Missense*-Mutation (Abb. 3.6 C-F). Die Anreicherung eines Proteins vom homogenen Zelllysat zur PSD ist mit einem Quotienten angegeben, der $Absoluten\ Anreicherung = \frac{Proteinmenge_{PSD}}{Proteinmenge_{Homogenat}}$. Zur Ermittlung der „Relativen Anreicherung“ des jeweiligen Fusionsproteins wird nun die „Absolute Anreicherung“ des Fusionsproteins ins Verhältnis zur „Absoluten Anreicherung“ des endogenen Proteins gesetzt:

$$Relative\ Anreicherung_{Fusionsprotein} = \frac{Absolute\ Anreicherung_{Fusionsprotein}}{Absolute\ Anreicherung_{Endogenes\ Protein}}$$

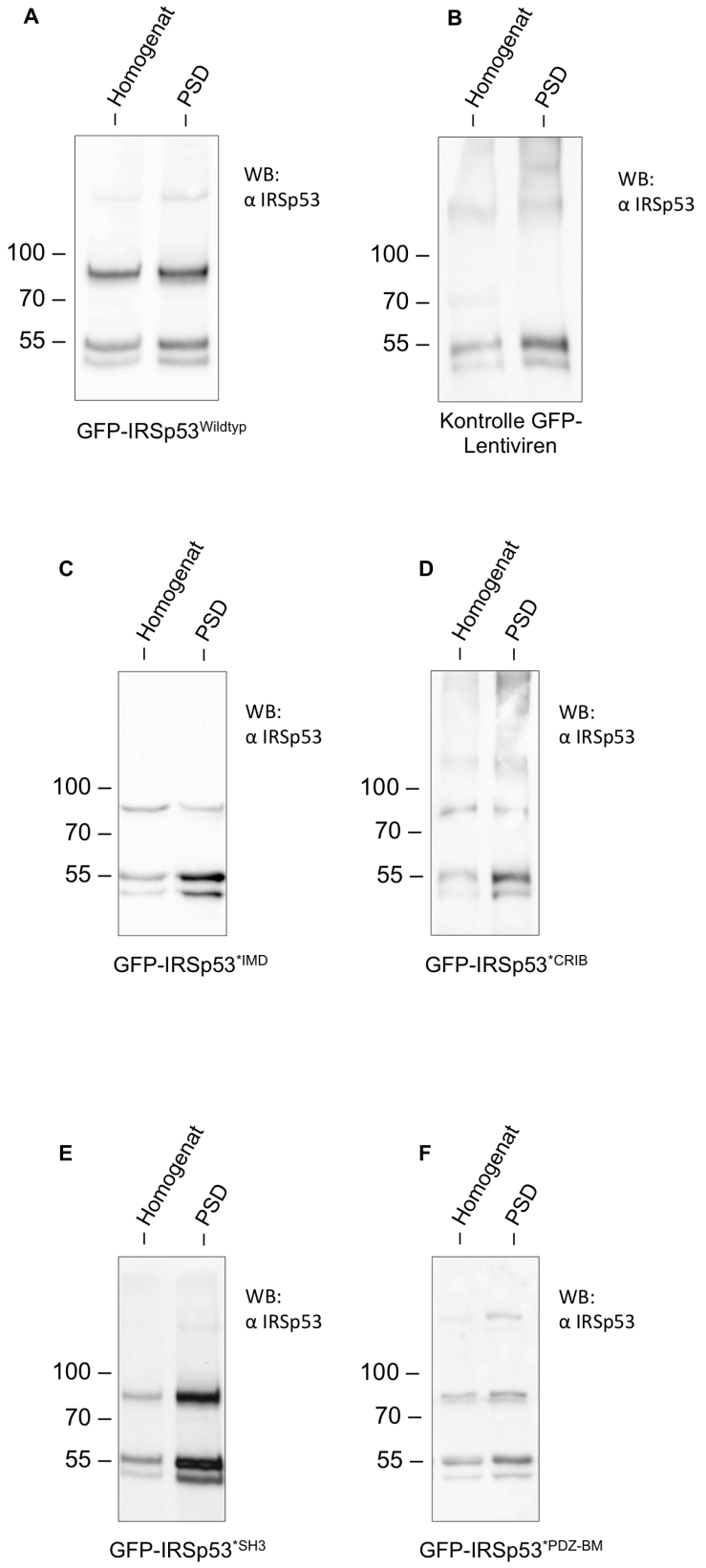

ABBILDUNG 3.6 *WESTERN BLOTS* VON PSD-AUFREINIGUNGEN NACH INFEKTION VON NEURONEN MIT LENTIVIREN:

DIE PROTEINPROBEN SIND AUS EINZELNEN SCHRITTEN DER PSD-AUFREINIGUNG AUFGETRAGEN. ES WERDEN HOMOGENAT UND PSD MITEINANDER VERGLICHEN; FÄRBUNG ERFOLGT GEGEN IRSP53.

A SOWOHL ENDOGENES IRSP53 (DOPPELBANDE BEI 53-58 KDA), ALS AUCH DAS FUSIONSPROTEIN GFP-IRSP53-WILDTYP (CA. 90 KDA) SIND IN DER PSD DEUTLICH ANGEREICHERT;

B NACH INFEKTION MIT GFP-KODIERENDEN LENTIVIREN SIEHT MAN DIE ANREICHERUNG DES ENDOGENEN IRSP53, AUF HÖHE DES FUSIONSPROTEINS IST, WIE ZU ERWARTEN, KEINE BANDE ZU ERKENNEN;

C WÄHREND DAS ENDOGENE IRSP53 STARK ANGEREICHERT IST, IST DAS FUSIONSPROTEIN MIT MUTIERTER IMD WENIGER AUSGEPRÄGT IN DER PSD LOKALISIERT;

D EBENSO ZEIGT SICH BEI MUTIERTER CRIB-DOMÄNE EINE UNBEEINTRÄCHTIGTE ANREICHERUNG DES ENDOGENEN IRSP53, WÄHREND AUCH HIER DIE LOKALISIERUNG DES FUSIONSPROTEINS DURCH DIE MUTATIONEN BEEINTRÄCHTIGT IST;

E TROTZ MUTATION DER SH3-DOMÄNE KOMMT ES SOWOHL BEI FUSIONSPROTEIN ALS AUCH BEI ENDOGENEM IRSP53 ZUR ANREICHERUNG IN DER PSD;

F NACH MUTATION DES PDZ-BINDEMOTIVS IST DIE LOKALISIERUNG DES FUSIONSPROTEINS IN DER PSD ABGESCHWÄCHT, DAS ENDOGENE PROTEIN IST WIE GEWOHNT ANGEREICHERT.

		SAQ_x	df	σ^2	$F = \frac{\sigma^2_{zwischen}}{\sigma^2_{innerhalb}}$	p-Wert
IMD	$SAQ_{WT\text{-}IMD}$	0,784886	1	0,784886	9,238606	**0,012473**
	SAQ_{IMD}	0,849572	10	0,084957		
CRIB	$SAQ_{WT\text{-}CRIB}$	0,55874	1	0,55874	20,33126	**0,00147**
	SAQ_{CRIB}	0,247336	9	0,027482		
SH3	$SAQ_{WT\text{-}SH3}$	0,000177	1	0,000177	0,00761	0,932647
	SAQ_{SH3}	0,185775	8	0,023222		
PDZ-BM	$SAQ_{WT\text{-}PDZ\text{-}BM}$	0,1944	1	0,1944	6,728052	**0,02903**
	$SAQ_{PDZ\text{-}BM}$	0,260045	9	0,028894		

TABELLE 3.2 EINFACHE VARIANZANALYSE DER PROTEINBIOCHEMISCHEN IRSP53-LOKALISIATIONSSTUDIEN

DIE TABELLE ZEIGT DIE EINFACHE VARIANZANALYSE FÜR DIE ANREICHERUNGEN DER FUSIONSPROTEINE AUS DEN AUFREINIGUNGEN DER POSTSYNAPTISCHEN DICHTE; FÜR WERTE INNERHALB DER GRUPPEN UND ZWISCHEN DEN GRUPPEN (JEWEILS WT BZW. FUSIONSPROTEIN) WERDEN DIE SUMMEN DER ABWEICHUNGSQUADRATE (SAQ) GEBILDET; AUS IHNEN UND DEN FREIHEITSGRADEN (DF) ERGEBEN SICH VARIANZ (σ^2) UND VARIANZANALYTISCHER F-TEST (F); ENTSPRECHEND DER FREHEITSGRADE ERGEBEN SICH BEIM F-TEST UNTERSCHIEDLICHE WERTE FÜR DIE NULLHYPOTHESENABLEHNUNG; FÜR DIE SIGNIFIKANZ DER GETESTETEN KONSTRUKTE ERGIBT SICH FOLGENDES BILD (ROTE MARKIERUNG BEDEUTET SIGNIFIKANZ MIT $p < 0{,}05$): IMD-, CRIB- UND PDZ-BM-MUTATIONEN VERÄNDERN DIE ANREICHERUNG DES JEWEILIGEN FUSIONSPROTEINS IN DER PSD SIGNIFIKANT, DER EINFLUSS DER SH3-DOMÄNEN-MUTATION AUF LOKALISATION DES FUSIONSPROTEINS IN DER PSD UNTERSCHEIDET SICH DAGEGEN NICHT VON DER INTAKTEN GENSEQUENZ DES WILDTYP-FUSIONSPROTEINS

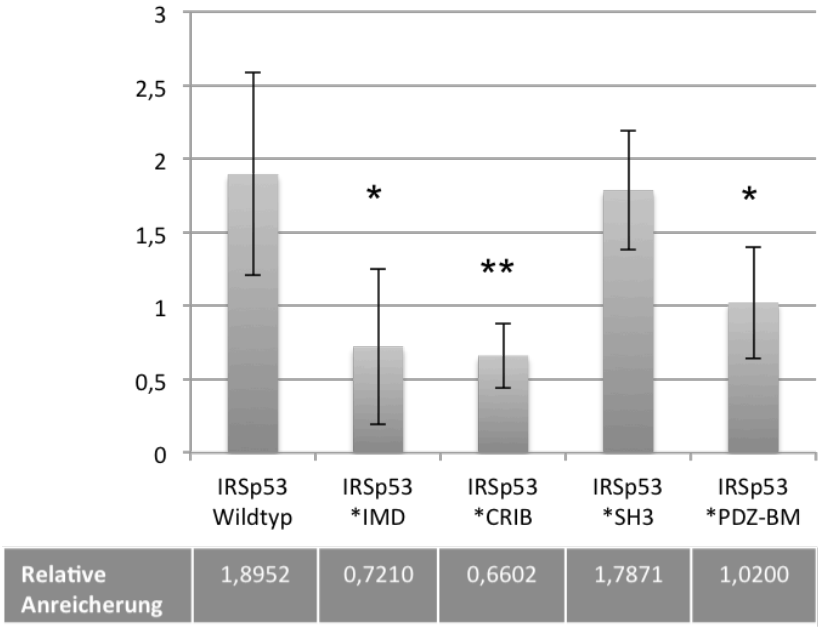

ABBILDUNG 3.7 RELATIVE ANREICHERUNG DER GFP-IRSP53-FUSIONSPROTEINE

STATISTISCHE AUSWERTUNG DER *WESTERN BLOTS* ZUR RELATIVEN ANREICHERUNG DER EINZELNEN GFP-IRSP53-FUSIONSPROTEINE VON HOMOGENEM ZELLLYSAT ZUR POSTSYNAPTISCHEN DICHTE; FÄRBUNG DER *BLOTS* MIT IRSP53-ANTIKÖRER; DIE RELATIVE ANREICHERUNG IST DER QUOTIENT AUS ANREICHERUNG DES JEWEILIGEN FUSIONSPROTEINS DURCH ANREICHERUNG DES ENDOGENEN PROTEINS; DEREN ANREICHERUNG ENTSPRICHT DER PROTEINMENGE IN DER PSD IM VERHÄLTNIS ZUR PROTEINMENGE IM HOMOGENAT

Die „Relativen Anreicherungen“ der Fusionsproteine in der PSD wurden anschließend mittels Einweg-Varianzanalyse auf Signifikanz überprüft (siehe Tabelle 3.2). Wie zu erwarten, zeigt die Infektion der Neuronen mit GFP-kodierenden Lentiviren nach Färben mit dem Antikörper gegen IRSp53 auf dem *Western Blot* keine Bande auf Höhe des Fusionsproteins von GFP-IRSp53 (Abbildung 3.6 B). Nach Infektion mit Lentiviren für IRSp53-Wildtyp ist die Bande für das GFP-IRSp53-Fusionsprotein dagegen gut zu erkennen (Abbildung 3.6 A). Zudem ist zu erkennen, dass nicht nur das endogene IRSp53 (Doppelbande 53-58 kDa), sondern auch das Fusionsprotein vom Homogenat zur postsynaptischen Dichte hin angereichert ist (Abbildung 3.7).

Verliert die IMD durch Mutationen die Fähigkeit, ihre Bindungspartner zu binden, zeigt sich das auch in der Lokalisierung des Fusionsproteins GFP-IRSp53^{*IMD} in der PSD. Während auf Abbildung 3.6 C gut zu erkennen ist, dass das endogene IRSp53 (Bande bei 53-58kDa) stark angereichert ist, zeigen die Banden des Fusionsproteins, dass bei diesem Konstrukt keine Anreicherung stattfindet (Abbildung 3.7). Die Anreicherung von IRSp53^{*IMD} ist im Vergleich zu IRSp53^{Wildtyp} signifikant abgeschwächt ($p = 0.012473$; Tabelle 3.2). Somit gelangt durch *Missense*-Mutationen in der kodierenden Sequenz der IM-Domäne weniger Fusionsprotein in die PSD. Eine *Missense*-Mutation im CRIB-Motiv beeinflusst ebenfalls die PSD-Lokalisation von IRSp53 (Abbildung 3.6 D, Abbildung 3.7). IRSp53^{*CRIB} ist in der PSD signifikant schlechter angereichert als IRSp53^{Wildtyp} ($p = 0{,}00147$; Tabelle 3.2). Somit ist das GFP-IRSp53^{*CRIB}-Fusionsprotein nach Mutation der proteinbindenden Aminosäure des CRIB-Motivs ebenfalls nur zu geringen Mengen in der PSD lokalisiert. Fehlt dagegen der SH3-Domäne durch Mutation entsprechender Aminosäuren die Fähigkeit zur Assoziation mit ihren Bindungspartnern, hat das keine Auswirkungen auf die Lokalisierung in der PSD (Abbildung 3.6 E, Abbildung 3.7). Die relative Anreicherung von IRSp53^{Wildtyp} und IRSp53^{*SH3} weisen keinen signifikanten Unterscheid auf ($p = 0{,}932647$; Tabelle 3.2). Das PDZ-Bindemotiv wiederum hat eine Bedeutung bei der Lokalisierung von IRSp53 in der PSD. Das zeigt sich daran, dass das Fusionsprotein mit mutiertem PDZ-Bindemotiv ebenfalls in geringerem Ausmaß in der PSD lokalisiert ist (Abbildung 3.6 F, Abbildung 3.7). Die relative Anreicherung von IRSp53$^{*PDZ-BM}$ ist signifikant niedriger als die des Wildtyp-IRSp53 ($p = 0{,}02903$; Tabelle 3.2).

3.3 Immunzytochemische Lokalisationsstudien zu IRSp53

Parallel zu den proteinbiochemischen Analysen in Kortexneuronen wurden immunzytochemische Lokalisationsstudien zu den einzelnen GFP-IRSp53-Fusionsproteinen durchgeführt. Hierzu wurden Primärkulturen von Neuronen aus dem Hippocampus von Rattenembryonen (ca. d 18) verwendet. Diese Neuronen wurden ebenfalls mit Lentiviren infiziert (lentivirale Konstrukte siehe Abbildung 3.1) und fixiert (d 19-23). Die Verteilung von GFP und sämtlichen GFP-IRSp53-Fusionsproteinen in hippocampalen Neuronen ist in Abbildung 3.8 A-F gezeigt. Als erstes wurde kontrolliert, wie sich mittels Lentiviren eingebrachtes GFP in den hippocampalen Primärneuronen verhält (Abbildung 3.8 B). Das Protein ist homogen über das gesamte Zytosol verteilt zu erkennen, zusätzlich besonders gut im Zellkern (Abbildung 3.8 B). Das Fusionsprotein GFP-IRSp53^{Wildtyp} (Abbildung 3.8 A) hingegen zeigt die Aussprossung synaptischer Dornen entlang des vergrößerten Dendriten, wie sie bei GFP nicht zu erkennen ist. Somit ist davon auszugehen, dass das Wildtyp-Konstrukt in der PSD lokalisiert ist. Das Fusionsprotein GFP-IRSp53^{*IMD} ist nur homogen über das Zytosol des Neuron verteilt und weist keine Bündelung an den Synapsen auf (Abbildung 3.8 C). Deshalb ist davon auszugehen, dass GFP-IRSp53^{*IMD} eingeschränkt in der PSD lokalisiert ist. Die Lokalisationsstudien mit GFP-IRS5p53^{*CRIB} (Abbildung 3.8 D) zeigen deutlich, dass dieses Konstrukt mit mangelhafter Bindefähigkeit an Bindungspartner des CRIB-Motivs homogen über den Dendriten verteilt ist und nicht in *Clustern* vorliegt. Insofern ist auch bei diesem Konstrukt von einer mangelhaften Lokalisierung in der PSD auszugehen. Dagegen ist GFP-IRSp53^{*SH3} ebenso in dendritischen Dornen lokalisiert wie das GFP-IRSp53^{Wildtyp}-Konstrukt (Abbildung 3.8 E). Infolgedessen ist bei der SH3-Domänenmutation kein Hinweis auf Einschränkung der korrekten Lokalisation des Fusionsproteins in der PSD nachzuweisen. Eine eher homogene Verteilung von GFP-IRSp53 zeigt sich wiederum nach Mutation des PDZ-BM (Abbildung 3.8 F). Insofern ist auch bei GFP-IRSp53$^{*PDZ-BM}$ von einer mangelhaften PSD-Lokalisierung auszugehen.

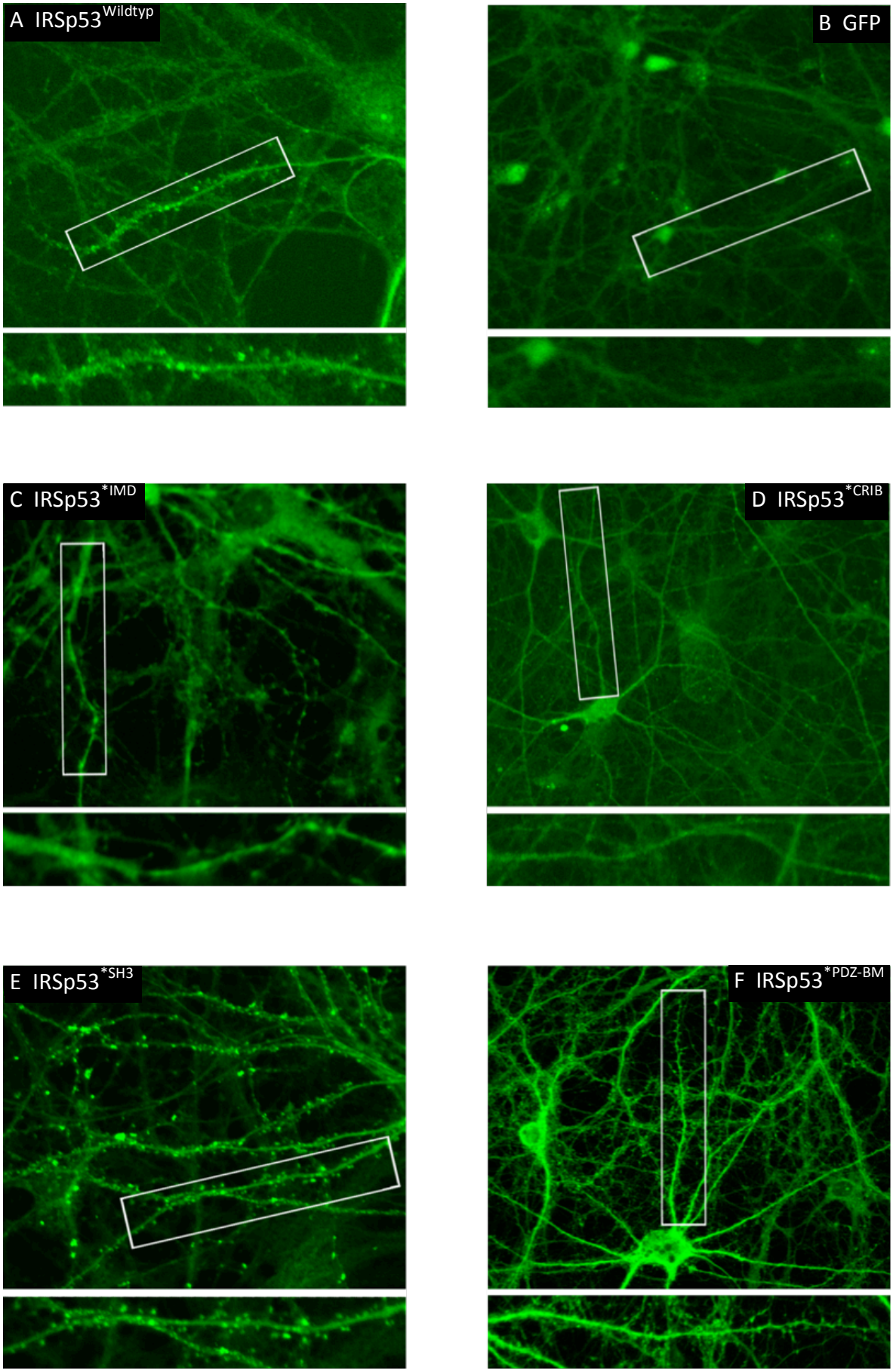
A IRSp53Wildtyp
B GFP
C IRSp53*IMD
D IRSp53*CRIB
E IRSp53*SH3
F IRSp53*PDZ-BM

ABBILDUNG 3.8 LOKALISIERUNG VON GFP UND GFP-IRSP53-FUSIONSPROTEINEN IN HIPPOCAMPUSNEURONEN

A – F ZEIGEN HIPPOCAMPUSNEURONEN NACH INFEKTION MIT LENTIVIREN, DIE FÜR GFP ODER GFP-IRSP53-KONSTRUKTE MIT MUTIERTEN DOMÄNEN KODIEREN; DIE FÄRBUNG ERFOLGTE MIT ANTIKÖRPERN GEGEN GFP; DER OBERE TEIL DER ABBILDUNGEN ZEIGT EINE ÜBERSICHTSAUFNAHME, DARUNTER IST EIN DENDRIT IN VERGRÖßERUNG DARGESTELLT; **A** GFP-ISP53-WILDTYP *CLUSTERT* ENTLANG DES DENDRITEN UND IST IN DER PSD LOKALISIERT; **B** NACH INFEKTION MIT GFP-LENTIVIREN ZEIGT SICH EINE HOMOGENE VERTEILUNG IN DEN ZELLEN, *CLUSTER* SIND NICHT ZU ERKENNEN; **C** GFP-IRSP53^{*IMD} BILDET EBENFALLS KEINE *CLUSTER* ENTLANG DER DENDRITEN AUS; **D** AUCH GFP-IRSP53^{*CRIB} KONZENTRIERT SICH NICHT IN *CLUSTERN*, ES ZEIGT EINE HOMOGENE VERTEILUNG; **E** GFP-IRSP53^{*SH3} IST TROTZ MUTATION DER SH3-DOMÄNE NOCH IN DER LAGE, ÄHNLICH DEM WILDTYP-KONSTRUKT IN DER PSD ZU LOKALISIEREN; **F** DAS PDZ-BINDEMOTIV DAGEGEN IST WIEDERUM NOTWENDIG FÜR EINE *CLUSTERUNG* IN DER PSD, DA ES NACH MUTATION EBENFALLS ZUR HOMOGENEN VERTEILUNG ÜBER DAS ZYTOSOL KOMMT

IV DISKUSSION

In der Literatur ist beschrieben, dass es bei Mangel an IRSp53 in diversen Zelltypen zu Veränderungen kommt: In Primärkultur gebrachte Neurone aus IRSp53-defizienten KO-Mäusen zeigen einen Schwund an Dendriten (Sawallisch et al., 2009). Bei NIH-Src-Zellen (embryonale Mausfibroblasten-Linie) führt ein IRSp53-Knockdown zu abgeschwächter Podosomen-Ausreifung (Oikawa et al., 2013). IRSp53-defiziente Mäuse weisen zudem ein kognitives Defizit in einfachen Lerntests und eine erhöhte LTP in elektrophysiologischen Untersuchungen des Hippocampus auf (Kim et al., 2009; Sawallisch et al., 2009). Demnach scheint IRSp53 in exzitatorischen, glutamatergen Neuronen eine essentielle Rolle in der Signaltransduktion zu spielen. Bekannt ist, dass IRSp53 in der PSD angereichert ist (Abbott et al., 1999; Burette et al., 2014). Das Ziel dieser Arbeit war, die Rolle der durch NMDA-Rezeptoren vermittelten Translokation sowie den Einfluss der funktionellen Domänen auf die postsynaptische Lokalisation zu untersuchen.

4.1 Translokation von IRSp53 in die Postsynaptische Dichte

Es ist nicht eindeutig geklärt, ob IRSp53 ohne Stimulation in der PSD zu finden ist (Abbott et al., 1999; Bockmann et al., 2002; Soltau et al., 2002) oder einen bestimmten exogenen Stimulus benötigt (Hori et al., 2005). Dieser Frage wurde in dieser Arbeit nachgegangen. Trotz einer Blockade von Cortex-Neuronen mit TTX konnte eine Lokalisierung von IRSp53 in der PSD beobachtet werden. Darüberhinaus konnte kein signifikanter Unterschied zwischen IRSp53-Lokalisierung bei Blockade von Neuronen mittels TTX bzw. Stimulierung mittels NMDA festgestellt werden. Diese Versuche, wie auch die von Bockmann et al. (2002), Sawallisch et al. (2009) und Soltau et al. (2002) beschriebenen Experimente zeigen, dass IRSp53 auch unabhängig von einer exogenen Stimulation der Glutamat-Rezeptoren und nachgeschalteter Signalwege in der PSD zu finden ist. Hori et al. (2005) beobachteten dagegen in ihren Experimenten, dass IRSp53 exogene Stimuli für eine Lokalisierung in der Synapse benötigt. Ohne Stimulation durch Glutamat oder NMDA war kein IRSp53 synaptisch lokalisiert. Unklar bleibt dabei allerdings, welche unmittelbaren Folgen die NMDA-Stimulierung hat. Lediglich eine Exzitation von Neuronen durch Zugabe von Glutamat führt zu einer Koinzidenz von Depolarisation der Postsynapse (über AMPAR) und Aktivierung der NMDA-Rezeptoren. Diese Koinzidenz ist für die Permeabilität der NMDAR vonnöten, da ohne Membrandepolarisation Mg^{2+}-Ionen den Ionenkanal blockieren (Nowak et al., 1984). Eine alleinige Exzitation der PSD mittels NMDA aktiviert zwar die NMDA-Rezeptoren und erhöht die Öffnungswahrscheinlichkeit der für Kationen (Na^{+}, Ca^{2+}, K^{+}) unspezifisch durchlässigen Ionenkanäle. Es depolarisiert die Membran aber nicht und dürfte folglich den durch NMDA aktivierten Ionenkanal nicht für Ca^{2+}-Ionen durchlässig machen. Möglicherweise kann NMDAR aber auch ohne Membrandepolarisation einen Ca^{2+}-Einstrom verursachen und nachfolgende Signalwege anstoßen. Beispielsweise ist bekannt, dass alleinige Exzitation des NMDA-Rezeptors mittels NMDA zu einer Aktivierung intrazellulärer Kinasen wie der Proteinkinase C (PKC) führt (Wu et al., 2003). Die PKC wurde auch von Hori et al. (2005) als Teil des intrazellulären Signalwegs identifiziert, der durch NMDAR aktiviert wird und für die postsynaptische Lokalisierung von IRSp53 verantwortlich zu sein scheint. Durch Blockade der PKC mittels PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimid war die synaptische Lokalisierung von IRSp53 fast vollständig aufgehoben, eine Stimulierung der Neuronen mit dem PKC-Agonist 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Azetat (TPA) erzielte dagegen einen viel stärkeren

und länger andauernden Effekt auf die synaptische Lokalisierung von IRSp53, als die Stimulierung mit NMDA oder Glutamat. NMDA hat demnach einen direkten oder indirekten Einfluss auf die PKC. Trotzdem bleibt unklar, warum Hori et al. (2005) mittels NMDA-Stimulierung einen Effekt auf die postsynaptische Lokalisierung von IRSp53 erzielen, während IRSp53 im Rahmen dieser Arbeit und in anderen Experimenten bereits ohne Stimulierung in der PSD zu finden war (Abbott et al., 1999; Bockmann et al., 2002; Soltau et al., 2002). Hori et al. (2005) vermuten ein unterschiedliches Niveau basaler synaptischer Aktivität unter verschiedenen Kulturbedingungen. Dennoch sollte TTX auch dann in der Lage sein, basale synaptische Aktivität zu blockieren. Dadurch, dass TTX spannungsabhängige Natriumkanäle blockiert, wird hauptsächlich die präsynaptische Aktivität blockiert. Sowohl Glutamat als Transmitter im synaptischen Spalt als auch die nachgeschalteten Signalkaskaskaden über die PKC könnte eine längere Latenz als die Zeit von Beginn der TTX-Blockierung bis Beginn der Fixierung (40 min) besitzen. Dies würde erklären, warum unter den Versuchsanordnungen, wie sie für diese Arbeit galten, kein Effekt der TTX-Blockierung zu erkennen war.

4.2 Diskussion der Lokalisierungsstudien zu IRSp53

Für einige PSD-Stützproteine ist bekannt, dass ihre Rekrutierung in die PSD von bestimmten Domänen abhängt (*Synaptic Targeting Signals*). So reicht bei SHANK1 bereits eine intakte PDZ-Domäne für die korrekte Lokalisierung in der PSD aus (Sala et al., 2001), während für Shank3 die Interaktion mit Homer, sowie die Multimerisierung der SAM-Domäne essentiell für die synaptische Lokalisierung sind (Boeckers et al., 2005). Für IRSp53 existieren ebenfalls Lokalisierungsstudien, doch die *Targeting Signals* sind bisher nicht eindeutig bekannt und ihre Bedeutung ist zum Teil widersprüchlich. Daher wurden Lokalisierungsexperimente für das Protein durchgeführt, die die Auswirkung einer Inaktivierung einzelner funktioneller Domänen untersuchten. Da IRSp53, wie beschrieben, unter den durchgeführten Messbedingungen bereits in der PSD lokalisiert war, erfolgten die Lokalisierungsstudien unabhängig von einer Stimulierung mit NMDA oder einer Blockade durch TTX.

Versuche zur Lokalisierung von IRSp53 in der PSD hatten bereits Hori et al. (2005) mit diversen Deletionskonstrukten durchgeführt. Dabei zeigte die C-terminale Hälfte des

Proteins, der die IM-Domäne und das CRIB-Motiv fehlten, weder im Ruhezustand noch nach Stimulierung mit NMDA eine Anreicherung in der PSD. Bereits bei singulär fehlender Bindefähigkeit der IM-Domäne an ihre Bindepartner wurde bei den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten eine verminderte Anreicherung in der PSD beobachtet. In dieser Arbeit zeigten immunzytochemische Studien lediglich eine zytosolische Lokalisation von GFP-IRSp53 nach Mutation der IMD. Dies deckt sich mit den erwähnten Arbeiten von Hori et al. (2005). Zusätzlich zeigten Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe Kreienkamp (Bobsin, 2013; Gerhard, 2014), dass eine intakte IMD in HEK293-Zellen für die Membranassoziierung von IRSp53 notwendig ist. Womöglich führt also eine mangelhafte Membranassoziierung von IRSp53 zur Dissoziation aus der PSD. Andererseits bindet IRSp53 an Aktin-Filamente (Futó et al., 2013), was einem IRSp53-Protein ohne funktionierende IMD ebenfalls weniger Halt in der PSD böte. Dies wird unterstützt durch die Beobachtung, dass IRSp53 auch dann nicht in synaptischen *Clustern* zu finden ist, wenn die Aktin-Filamente durch Latrunculin A-Behandlung unterbrochen sind (Hori et al., 2005).

Eine fehlende Bindung von aktivem Cdc42 durch Mutation der CRIB-Domäne führte in den Experimenten dieser Arbeit ebenfalls zu einer signifikant schlechteren Anreicherung des Fusionsproteins in der PSD. Auch immunzytochemisch war es nicht mehr in dendritischen Dornen nachweisbar. Diese Beobachtungen decken sich wiederum mit denen von Hori et al. (2005) für die C-terminale Hälfte von IRSp53. Die hier vorliegenden Ergebnisse grenzen also die Beobachtungen von Hori et al. (2005) weiter ein und weisen sowohl für die IM-Domäne als auch für das CRIB-Motiv je eine eigenständige Bedeutung in der korrekten Lokalisierung von IRSp53 in der PSD nach.

IRSp53 mit defizitärer SH3-Domäne wiederum war sowohl proteinbiochemisch, als auch immunzytochemisch in dieser Arbeit ähnlich stark wie das Wildtyp-Konstrukt in der PSD nachweisbar. Dies deckt sich mit Hori et al. (2005), die nach Deletion der SH3-Domäne eine konstitutive Lokalisierung des Proteins in der PSD feststellten – auch ohne NMDA-Stimulierung. Choi et al. (2005) beobachteten dagegen eine leicht abgeschwächte Lokalisierung von IRSp53 bei fehlender SH3-Domäne in der PSD. Dies ließe sich dadurch erklären, dass IRSp53 an das PSD-Gerüstprotein SHANK1 bindet, das durch seine eigene

Lokalisierung in der PSD wiederum zur Verankerung von IRSp53 in der PSD beitragen könnte. Die geringe Auswirkung dieser SH3-Domänen-Mutation auf die synaptische Lokalisierung von IRSp53 ließe sich dadurch erklären, dass zwar einerseits die SH3-Domäne und ihre Bindung zu SHANK1 tatsächlich einen relevanten Einfluss auf die synaptische Lokalisierung von IRSp53 haben, andererseits würde durch eine mangelhafte Funktionsfähigkeit der SH3-Domäne gleichermaßen die intramolekulare Bindung von der SH3-Domäne an den N-Terminus (IMD/CRIB) von IRSp53 aufgegeben (Gerhard, 2014; Kast et al., 2014; Krugmann et al., 2001). IM-Domäne und CRIB-Motiv könnten folglich einfacher Bindungen zur ihren jeweiligen Bindepartnern eingehen. Diese nehmen – wie nachgewiesen – jeweils eine eigenständige Funktion in der PSD-Lokalisierung von IRSp53 in der PSD ein und könnten dann die Auswirkung der verlorengegangenen SHANK1-Bindung kompensieren.

Abschließend wurde untersucht, wie eine defekte Bindefähigkeit zu PDZ-Domänen-Proteinen die postsynaptische Lokalisation von IRSp53 beeinflusst. Choi et al. (2005) beobachteten, dass IRSp53 mit fehlendem C-Terminus und fehlender PDZ-Bindefähigkeit diffus im Zytoplasma der Zellen verteilt war. Ebenso konnten Hori et al. (2005) bei defektem PDZ-BM kein IRSp53 mehr in der PSD nachweisen. Die hier beschriebenen Daten für das Protein IRSp53 mit defektem PDZ-Bindemotiv bestätigen die bisher erzielten Ergebnisse. Die proteinbiochemischen und immunzytochemischen Untersuchungen zeigen gleichermaßen eine deutlich reduzierte Anreicherung an den Synapsen im Vergleich zum Wildtyp-Protein. Das PDZ-BM wird somit für eine korrekte Lokalisierung von IRSp53 in der PSD benötigt. In Übereinstimmung mit den hier beobachteten Ergebnissen haben Crespi et al. (2012) für IRSp53 nach Deletion des PDZ-Bindemotivs herausgefunden, dass das Protein in der Motoneuron-ähnlichen Zelllinie NSC34 nicht mehr in Filopodien-ähnlichen Zellausläufern zu finden war. Eine Lokalisierung von IRSp53 in den Zellausläufern war bei einem Chimer-Protein L27-IRSp53Δ5 (aus IRSp53Δ5 und der Domäne L27 von LIN7, einem Bindepartner des PDZ-Liganden von IRSp53) allerdings wiederhergestellt. Zusätzlich war bei Expression eines LIN7ΔL27-Konstrukts kein IRSp53 mehr in den Ausläufern nachweisbar. Demnach scheint auch LIN7 eine Rolle bei der Translokation von IRSp53 zu spielen. Da LIN7 das PDZ-Bindemotiv bindet würde dies die Bedeutung des PDZ-BM für die synaptische Lokalisierung von

IRSp53 erklären können. Choi et al. (2005) räumen dieser Domäne auch eine Schlüsselfunktion in der postsynaptischen Lokalisierung von IRSp53 in der PSD ein. Sie gehen aufgrund ihrer Ergebnisse davon aus, dass die PDZ-Interaktion den Hauptanteil der Verankerung von IRSp53 in der PSD ausmacht. Sie zeigen, dass verhältnismäßig mehr IRSp53 über das PDZ-Bindemotiv einen Komplex mit PSD-95 bildet als die SH3-Domäne von IRSp53 mit SHANK1. Sie postulieren, dass das PDZ-BM durch die Verankerung von IRSp53 in der PSD über PSD-95-Bindung dauerhaft belegt sei. Die SH3-Domäne sei dagegen frei für eine Bindung an ihre intra- und intermolekularen Bindepartner.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass IMD, CRIB und PDZ-BM, nicht aber die SH3 notwendige Domänen für die Verankerung von IRSp53 in der PSD sind. Warum sind nur manche Bindepartner relevant für eine korrekte Lokalisierung des Proteins in der PSD? Über andere Zytoskelettproteine ist bekannt, dass für effiziente Aktivierung und korrekte Lokalisierung mehrere synergistische Inputs vonnöten sind. N-WASP beispielsweise muss zur vollen Aktivierung an Cdc42, Phospholipid-Membranen und SH3-enthaltende Bindepartner binden (Kim et al., 2000). Ebenso scheint IRSp53 zur korrekten Lokalisierung in der PSD drei seiner vier funktionellen Domänen zu benötigen. Mit den in dieser Arbeit beobachteten Ergebnissen bietet sich in Anlehnung an Kast et al. (2014) und Krugmann et al. (2001) folgendes Modell an:

IRSp53 besitzt vermutlich einen aktiven und einen inaktiven Zustand. Zunächst liegt das Protein in einem inaktiven, auto-inhibierten Zustand vor, in dem der N-Terminus von IRSp53 und die SH3-Domäne einander intramolekular binden (Gerhard, 2014; Kast et al., 2014). Eine Assoziation mit der Membran ist nicht möglich (Abbildung 4.1 A; Kast et al., 2014; Krugmann et al., 2001). Kast et al. (2014) postulieren, dass IRSp53 zur Aktivierung mehrerer gleichzeitig stattfindender synergistischer Bindungen bedarf. Dazu würden die Dimerisierung der IM-Domänen an der Phospholipidmembran, die Bindung von Eps8 an die SH3-Domäne und die Bindung der GTPase Cdc42 an das CRIB-Motiv zählen.

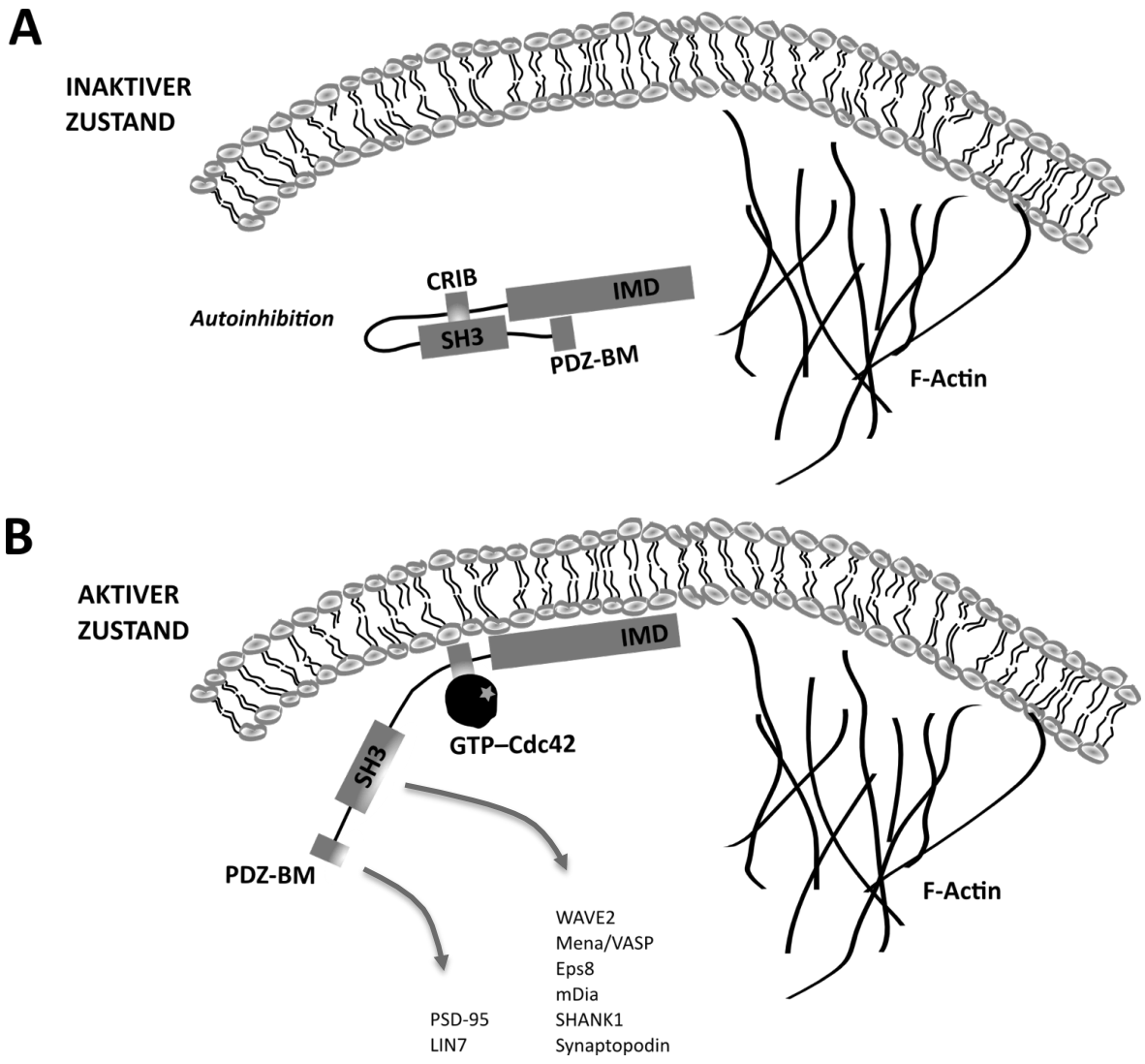

ABBILDUNG 4.1 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER AKTIVIERUNG VON IRSP53 DURCH CDC42 UND ANSCHLIEßENDE LOKALISIERUNG IN DER PSD

A IRSP53 ZUNÄCHST IN INAKTIVEM, AUTO-INHIBIERTEN ZUSTAND; IRSP53 IST NICHT IN DER PSD LOKALISIERT, KEINE HAFTUNG AN MEMBRAN BZW. AKTINFILAMENTE (IMD), KEINE BINDUNG VON PSD-95 (PDZ-BM) ODER EFFEKTORPROTEINE (SH3). SH3 BINDET INTRAMOLEKULAR AN DEN N-TERMINUS DES PROTEINS (KRUGMANN ET AL., 2001; GERHARD, 2014; KAST ET AL., 2014). OBEN ENTSPRECHEND DEN ERGEBNISSEN VON KAST ET AL. (2014) MIT SH3–CRIB-BINDUNG; **B** DURCH BINDUNG VON AKTIVIERTEM CDC42 AN CRIB ERFOLGT EINE KONFORMATIONSÄNDERUNG: SH3 GIBT DIE BINDUNG AN DEN N-TERMINUS AUF. DARAUFHIN BINDEN DIE DOMÄNEN AN IHRE BINDEPARTNER UND IRSP53 IST SYNAPTISCH LOKALISIERT.

Die Bindungen von Eps8 und Cdc42 bewirken eine Konformationsänderung von IRSp53, die Cdc42-Bindung an CRIB scheint dabei einen Schlüsselschritt darzustellen (Abbildung 4.1 B; Kast et al., 2014; Krugmann et al., 2001). Daraufhin wird die Auto-Inhibition aufgegeben und die SH3-Domäne löst sich vom N-Terminus (Krugmann et al., 2001). Gerhard (2014) weist eine intramolekulare Bindung zwischen N-Terminus (AS 1-283) und

SH3-Domäne nach. Kast et al. (2014) grenzen dies auf einen C-terminalen Bereich im CRIB-Motiv ein (durch Verwendung der Mutationen P278D, P281D). Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse zeigen, dass die korrekte Bindefähigkeit der IMD an ihre Bindepartner für eine Lokalisierung von IRSp53 in der PSD unabdingbar ist. Ebenso ist IRSp53 mit mutiertem CRIB-Motiv in geringerem Ausmaß in der PSD lokalisiert. Dies passt zum dargelegten Modell, da hier die Aktivierung durch Cdc42 nicht erfolgen kann. Auch das Anreicherungsverhalten von IRSp53$^{*PDZ\text{-}BM}$ lässt sich gut mit dem erläuterten Modell erklären: Dadurch dass IRSp53 durch die Bindung von Cdc42 an das CRIB-Motiv nun im offenen Zustand vorliegt, werden auch die Bereiche C-terminal der SH3-Domäne (PDZ-BM) nicht mehr blockiert (Kast et al., 2014). Das PDZ-BM kann durch Bindung an PSD-95 und LIN7 für eine weitere Verankerung von IRSp53 in der PSD sorgen (Choi et al., 2005; Crespi et al., 2012). Dies ist, wie gezeigt, ein weiterer kritischer Schritt in der PSD-Lokalisierung von IRSp53, da die Lokalisierung des Proteins in der PSD bei defektem PDZ-Bindemotiv abgeschwächt ist.

Zusätzlich sind die beobachteten intramolekularen Bindungen – CRIB-PR – SH3 bei Kast et al. (2014) bzw. N-Terminus – SH3 bei Gerhard (2014) sehr schwach. Gerhard (2014) beobachtete sie beispielsweise nur bei geringen Salzkonzentrationen. Das könnte insofern Sinn ergeben, als intramolekulare Bindungen durch die räumliche Nähe der Interaktionspartner zueinander verstärkt wirken, allerdings reversibel sein müssen (Kast et al., 2014). Eine weitere Beobachtung von Hori et al. (2005) stützt die Hypothese, dass die Auto-Inhibition durch SH3 für ein korrektes Anreicherungsverhalten von IRSp53 relevant ist: Bei einem Konstrukt, bei dem nicht nur das CRIB-Motiv, sondern auch die SH3-Domäne fehlte, zeigte sich eine dauerhafte Lokalisation von IRSp53 in der PSD, die unabhängig von einer Stimulierung durch NMDA war. Da IRSp53 aufgrund der defekten SH3-Domäne keine intramolekulare Bindung eingehen kann, befindet sich das Protein dauerhaft im aktivierten Zustand, die Lokalisierung in der PSD scheint nicht beeinträchtigt zu sein. Dementsprechend wird die Interaktion mit Cdc42 nicht zur Änderung des Konformationszustandes und zur Aktivierung von IRSp53 benötigt. Demnach ist die SH3-Domäne als einzige nicht essentiell für eine Verankerung von IRSp53 in der PSD, wohl aber durch Bindung an Effektorproteine relevant für die weitere Funktion des Proteins (Bockmann et al., 2002).

Nachfolgend an die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente sollte geklärt werden, ob eine und wenn ja welche der drei nachgewiesenen Domänen einen Hauptanteil in der Lokalisierung von IRSp53 in der PSD einnimmt und inwiefern ein additiver Effekt zu sehen wäre, würde man Doppel- oder Dreifachmutationen einfügen. Fraglich ist auch, wie sich die SH3-Domänen-Mutation bei gleichzeitiger Mutation in IMD, CRIB oder PDZ-Bindemotiv verhält. Nach dem dargelegten Modell mit Autoinhibition von IRSp53 durch eine intramolekulare Bindung zwischen SH3-Domäne und CRIB-PR-Motiv (P278, P281; Kast et al., 2014) wäre es vorstellbar, dass nach Mutation des CRIB-Motivs eine gleichzeitige Mutation der SH3-Domäne keine Veränderung der synaptischen Lokalisierung von IRSp53 mehr bringt, da die SH3-Domäne das CRIB-PR-Motiv dann ohnehin nicht mehr blockieren würde. Zusätzlich sollte überprüft werden, inwiefern dieser SH3-bindende Prolin-reiche Bereich am Ende des CRIB-Motivs (P278, P281) alleine bereits für eine synaptische Lokalisierung von IRSp53 verantwortlich ist. Kast et al. (2014) schreiben dieser Region die intramolekulare Bindung SH3-CRIB zu.

Weiterhin bleibt die Funktion von IRSp53 in der PSD ungeklärt. Im nächsten Schritt ließe sich untersuchen, ob sich die bei IRSp53-defizienten Mäusen beobachteten Veränderungen durch ein Einbringen von IRSp53 retten ließen und wenn ja, welche Domänen von IRSp53 hierfür wiederum benötigt würden.

V ZUSAMMENFASSUNG

Lernen ist einer der wichtigsten Vorgänge menschlichen Lebens. Erkrankungen wie die Alzheimer-Demenz zeigen deutlich, dass eigenständiges Leben ohne Gedächtnis nicht möglich ist. Ein molekulares und zellbiologisches Korrelat dafür ist die synaptische Plastizität, die zum größten Teil auf Vorgängen in der postsynaptischen Dichte (PSD) basiert. Sie ist der spezialisierte Teil der postsynaptischen Region einer exzitatorischen Synapse und enthält Neurotransmitter-Rezeptoren, die für die postsynaptische Signal-transduktion benötigten Proteine und Gerüstproteine. Ein wichtiger Bestandteil der PSD ist das Insulin-Rezeptor Substrat von 53kDa (IRSp53). Genetische Studien haben eine Verbindung von IRSp53 zu diversen neurologischen Erkrankungen wie Autismus oder ADHS gefunden. IRSp53 spielt eine wichtige Rolle als Vermittler zwischen GTPasen und dem Aktin-Zytoskelett. Wie IRSp53 die PSD erreicht, ist nicht eindeutig geklärt. Es gibt widersprüchliche Ergebnisse, ob die synaptische Lokalisierung des Proteins einen Stimulus wie NMDA braucht und welche Domänen relevant sind. In dieser Arbeit wurde zunächst der Einfluss von NMDA auf die Rekrutierung von IRSp53 untersucht. Dabei zeigte sich, dass in einem neuronalen Zellkulturmodell IRSp53 auch ohne besonderen Stimulus und trotz Blockade der neuronalen Aktivität bereits postsynaptisch lokalisiert ist. Im nächsten Schritt wurden in vier Domänen von IRSp53 *Missense*-Mutationen eingefügt, sodass je eine Domäne die Bindefähigkeit zu ihren Binderpartnern verloren hatte. Diese mutierten Proteine wurden mittels Expression durch Lentiviren in primär kultivierte Neuronen eingebracht. In proteinbiochemischen und immunzytochemischen Analysen zeigte sich, dass die Domänen IMD, CRIB und das PDZ-BM für die korrekte Lokalisierung benötigt werden, die SH3-Domäne dagegen nicht. Daraus ergibt sich ein Modell, dementsprechend IRSp53 zunächst inaktiv und durch eine intramolekulare Bindung auto-inhibiert ist. Erst nach Aktivierung wird das Protein korrekt in der PSD lokalisiert. Die Aktivierung erfolgt durch Bindung von Cdc42 an das CRIB-Motiv. Dadurch kommt es vermutlich zu einer Konformationsänderung des Proteins, sodass die SH3-Domäne sich vom N-Terminus löst. Die IM-Domäne fixiert infolgedessen über Bindung an F-Actin bzw. die Phospholipidmembran und das PDZ-Bindemotiv über Bindung an PSD-95 und LIN7 IRSp53 in der Synapse. Gleichzeitig wäre auch die SH3-Domäne frei, Effektorproteine zu binden, wodurch IRSp53 womöglich wiederum Einfluss auf die Signaltransduktion und synaptische Plastizität haben könnte.

V ABSTRACT

Learning is one of the most important aspects of human existence. As can be seen in neurological disorders as Alzheimer's dementia one cannot live autonomously without memory. The molecular and cellular equivalent of learning is synaptic plasticity. Synaptic plasticity is mainly based on events that take place in the post-synaptic density (PSD). The PSD of a neuron constitutes the specialized part of the postsynaptic region of an excitatory synapse. It contains neurotransmitter receptors, proteins necessary for postsynaptic signal transduction and associated scaffold proteins. One important component of the PSD is the Insulin receptor substrate protein of 53kDa (IRSp53). Genetic studies have detected a link between IRSp53 and various neurological disorders such as Alzheimer's and autism. As a multi-domain protein IRSp53 plays an important role as mediator between GTPases and the rearrangements of the actin cytoskeleton. So far, it is not clear how IRSp53 reaches the PSD. Results of previous studies are inconsistent with respect to the critical domains for recruitment of IRSp53 into the PSD or whether stimulation of NMDA receptors is needed. Here, the influence of NMDA on recruitment of IRSp53 into the PSD was examined. The data show that IRSp53 is already present in the PSD without stimulation and even despite blocking of neuronal activity with TTX. Next, four mutant variants of IRSp53 were developed, each lacking the ability to bind the partner proteins of one particular domain. Mutant proteins were introduced into neuronal cell culture using lentiviral vectors. Western blot analysis of purified PSD proteins and immunocytochemical examination showed an attenuated PSD accumulation when the IMD, CRIB or PDZ-BM were mutated. On the other hand, the SH3 domain does not seem to be required. This results in a model with IRSp53 initially being inactive and auto-inhibited by an intra-molecular bond. It is not until activation that IRSp53 localizes correctly in the PSD. Cdc42 starts this activation by binding to the CRIB domain. Thus, the conformation of IRSp53 changes and the SH3 domain dissociates from the N-terminal end. Hence, the IMD binds to F-Actin and the phospholipid membrane. IMD and PDZ-binding motif would therefore be able to bind PSD-95 and LIN7. Each of the interactions could tether IRSp53 postsynaptically. Also, the SH3 domain would be free to bind effector proteins. This again might influence signal transduction and synaptic plasticity.

VI Literaturverzeichnis

Abbott, M., Wells, D.G., and Fallon, J.R. (1999). The insulin receptor tyrosine kinase substrate p58/53 and the insulin receptor are components of CNS synapses. J Neurosci *19*, 7300–7308.

Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., et al. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science *220*, 868–871.

Bear, M.F., and Abraham, W.C. (1996). Long-term depression in hippocampus. Annu Rev Neurosci *19*, 437–462.

Bliss, T. V, and Collingridge, G.L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. Nature *361*, 31–39.

Bliss, T. V, and Lømo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. J Physiol *232*, 331–356.

Bobsin, K. (2013). Functional analysis of the insulin receptor substrate protein of 53 kDa (IRSp53) in the brain of mus musculus. Biologische Dissertation, Universität Hamburg.

Bockmann, J., Kreutz, M.R., Gundelfinger, E.D., and Böckers, T.M. (2002). ProSAP/Shank postsynaptic density proteins interact with insulin receptor tyrosine kinase substrate IRSp53. J Neurochem *83*, 1013–1017.

Boeckers, T.M., Liedtke, T., Spilker, C., Dresbach, T., Bockmann, J., Kreutz, M.R., and Gundelfinger, E.D. (2005). C-terminal synaptic targeting elements for postsynaptic density proteins ProSAP1/Shank2 and ProSAP2/Shank3. J Neurochem *92*, 519–524.

Brady, S., and Tai, L. (2012). Cell Biology of the Nervous System. In Basic Neurochemistry, S.T. Brady, G.J. Siegel, R.W. Albers, and D.L. Price, eds. (Elsevier), pp. 3–25.

Burette, A.C., Park, H., and Weinberg, R.J. (2014). Postsynaptic distribution of IRSp53 in spiny excitatory and inhibitory neurons. J Comp Neurol *522*, 2164–2178.

Chetkovich, D.M., Bunn, R.C., Kuo, S.-H., Kawasaki, Y., Kohwi, M., and Bredt, D.S. (2002). Postsynaptic targeting of alternative postsynaptic density-95 isoforms by distinct mechanisms. J Neurosci *22*, 6415–6425.

Chilian, B., Abdollahpour, H., Bierhals, T., Haltrich, I., Fekete, G., Nagel, I., Rosenberger, G., and Kutsche, K. (2013). Dysfunction of SHANK2 and CHRNA7 in a patient with intellectual disability and language impairment supports genetic epistasis of the two loci. Clin Genet *85*, 560–565.

Choi, J., Ko, J., Racz, B., Burette, A., Lee, J.-R., Kim, S., Na, M., Lee, H.W., Kim, K., Weinberg, R.J., et al. (2005). Regulation of dendritic spine morphogenesis by insulin receptor substrate 53, a downstream effector of Rac1 and Cdc42 small GTPases. J Neurosci *25*, 869–879.

Chung, C., Niemela, S., and Miller, R. (1989). One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. Proc … *86*, 2172–2175.

Cockrell, A.S., and Kafri, T. (2007). Gene delivery by lentivirus vectors. Mol Biotechnol *36*, 184–204.

Crespi, A., Ferrari, I., Lonati, P., Disanza, A., Fornasari, D., Scita, G., Padovano, V., and Pietrini, G. (2012). LIN7 regulates the filopodia and neurite promoting activity of IRSp53. J Cell Sci *125*, 4543–4554.

Cronin, J., Zhang, X.-Y., and Reiser, J. (2006). Altering the Tropism of Lentiviral Vectors through Pseudotyping. Curr Gene Ther *5*, 387–398.

Disanza, A., Mantoani, S., Hertzog, M., Gerboth, S., Frittoli, E., Steffen, A., Berhoerster, K., Kreienkamp, H.J., Milanesi, F., Di Fiore, P.P., et al. (2006). Regulation of cell shape by Cdc42 is mediated by the synergic actin-bundling activity of the Eps8-IRSp53 complex. Nat Cell Biol *8*, 1337–1347.

Durand, C.M., Betancur, C., Boeckers, T.M., Bockmann, J., Chaste, P., Fauchereau, F., Nygren, G., Rastam, M., Gillberg, I.C., Anckarsater, H., et al. (2007). Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. Nat Genet *39*, 25–27.

Endele, S., Rosenberger, G., Geider, K., Popp, B., Tamer, C., Stefanova, I., Milh, M., Kortüm, F., Fritsch, A., Pientka, F.K., et al. (2010). Mutations in GRIN2A and GRIN2B encoding regulatory subunits of NMDA receptors cause variable neurodevelopmental phenotypes. Nat Genet *42*, 1021–1026.

Futó, K., Machesky, L.M., Nyitrai, M., and Visegrády, B. (2013). Membrane binding properties of IRSp53-missing in metastasis domain (IMD) protein. Biochim Biophys Acta *1831*, 1651–1655.

Gerhard, Y. (2014). Molekulare Interaktionen des postsynaptischen Gerüstproteins IRSp53. Medizinische Dissertation, Universität Hamburg.

Hassel, B., and Dingledine, R. (2012). Glutamate and Glutamate Receptors. In Basic Neurochemistry, S.T. Brady, G.J. Siegel, R.W. Albers, and D.L. Price, eds. (Elsevier), pp. 342–366.

Hebb, D.O. (1949). The Organization of Behaviour (Wiley & Sons).

Hori, K., Yasuda, H., Konno, D., Maruoka, H., Tsumoto, T., and Sobue, K. (2005). NMDA receptor-dependent synaptic translocation of insulin receptor substrate p53 via protein kinase C signaling. J Neurosci *25*, 2670–2681.

Janssen, J., and Laatz, W. (2013). Statistische Datenanalyse mit SPSS (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg).

Kast, D.J., Yang, C., Disanza, A., Boczkowska, M., Madasu, Y., Scita, G., Svitkina, T., and Dominguez, R. (2014). Mechanism of IRSp53 inhibition and combinatorial activation by Cdc42 and downstream effectors. Nat Struct Mol Biol *21*, 413–422.

Kim, A.S., Kakalis, L.T., Abdul-manan, N., Liu, G.A., and Rosen, M.K. (2000). Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. Nature *3*, 151–158.

Kim, M.-H., Choi, J., Yang, J., Chung, W., Kim, J.-H., Paik, S.K., Kim, K., Han, S., Won, H., Bae, Y.-S., et al. (2009). Enhanced NMDA receptor-mediated synaptic transmission, enhanced long-term potentiation, and impaired learning and memory in mice lacking IRSp53. J Neurosci *29*, 1586–1595.

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

Krugmann, S., Jordens, I., Gevaert, K., Driessens, M., Vandekerckhove, J., and Hall, A. (2001). Cdc42 induces filopodia by promoting the formation of an IRSp53 : Mena complex. Curr Biol *11*, 1645–1655.

Martin, K.C., and Zukin, R.S. (2006). RNA trafficking and local protein synthesis in dendrites: an overview. J Neurosci *26*, 7131–7134.

Mattila, P.K., Pykäläinen, A., Saarikangas, J., Paavilainen, V.O., Vihinen, H., Jokitalo, E., and Lappalainen, P. (2007). Missing-in-metastasis and IRSp53 deform PI(4,5)P2-rich membranes by an inverse BAR domain–like mechanism. J Cell Biol *176*, 953–964.

Miki, H., Yamaguchi, H., Suetsugu, S., and Takenawa, T. (2000). IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. Nature *408*, 732–735.

Millard, T.H., Bompard, G., Heung, M.Y., Dafforn, T.R., Scott, D.J., Machesky, L.M., and Fütterer, K. (2005). Structural basis of filopodia formation induced by the IRSp53/MIM homology domain of human IRSp53. Eur Mol Biol Organ J *24*, 240–250.

Miyahara, A., Okamura-Oho, Y., Miyashita, T., Hoshika, A., and Yamada, M. (2003). Genomic structure and alternative splicing of the insulin receptor tyrosine kinase substrate of 53-kDa protein. J Hum Genet *48*, 410–414.

Morfini, G.A., Burns, M.R., and Stenoien, D.L. (2012). Axonal Transport. In Basic Neurochemistry, S.T. Brady, G.J. Siegel, R.W. Albers, and D.L. Price, eds. (Elsevier), pp. 146–164.

Naldini, L., Blömer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., Verma, I.M., and Trono, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. Science *272*, 263–267.

Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., and Prochiantz, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. Nature *307*, 462–465.

Oikawa, T., Okamura, H., Dietrich, F., Senju, Y., Takenawa, T., and Suetsugu, S. (2013). IRSp53 Mediates Podosome Formation via VASP in NIH-Src Cells. PLoS One *8*, e60528.

Palay, S.L. (1956). Synapses in the central nervous system. J Biophys Biochem Cytol *2*, 193–202.

Paschou, P., Feng, Y., Pakstis, A.J., Speed, W.C., DeMille, M.M., Kidd, J.R., Jaghori, B., Kurlan, R., Pauls, D.L., Sandor, P., et al. (2004). Indications of linkage and association of Gilles de la Tourette syndrome in two independent family samples: 17q25 is a putative susceptibility region. Am J Hum Genet *75*, 545–560.

Poznansky, M., Lever, A., Bergeron, L., Haseltine, W., and Sodroski, J. (1991). Gene transfer into human lymphocytes by a defective human immunodeficiency virus type 1 vector. J Virol *65*, 532–536.

Ribasés, M., Bosch, R., Hervás, A., Ramos-Quiroga, J.A., Sánchez-Mora, C., Bielsa, A., Gastaminza, X., Guijarro-Domingo, S., Nogueira, M., Gómez-Barros, N., et al. (2009). Case-Control Study of Six Genes Asymmetrically Expressed in the Two Cerebral Hemispheres: Association of BAIAP2 with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. Biol Psychiatry *66*, 926–934.

Ribasés, M., Bosch, R., Hervás, A., Ramos-Quiroga, J.A., Sánchez-Mora, C., Bielsa, A., Gastaminza, X., Guijarro-Domingo, S., Nogueira, M., Gómez-Barros, N., et al. (2011). Association study of six candidate genes asymmetrically expressed in the two cerebral hemispheres suggests the involvement of BAIAP2 in autism. J Psychiatr Res *66*, 926–934.

Rommelse, N.N.J., Franke, B., Geurts, H.M., Hartman, C.A., and Buitelaar, J.K. (2010). Shared heritability of attention-deficit/hyperactivity disorder and autism spectrum disorder. Eur Child Adolesc Psychiatry *19*, 281–295.

Sala, C., Piëch, V., Wilson, N.R., Passafaro, M., Liu, G., and Sheng, M. (2001). Regulation of dendritic spine morphology and synaptic function by Shank and Homer. Neuron *31*, 115–130.

Sawallisch, C., Berhörster, K., Disanza, A., Mantoani, S., Kintscher, M., Stoenica, L., Dityatev, A., Sieber, S., Kindler, S., Morellini, F., et al. (2009). The insulin receptor substrate of 53 kDa (IRSp53) limits hippocampal synaptic plasticity. J Biol Chem *284*, 9225–9236.

Scita, G., Confalonieri, S., Lappalainen, P., and Suetsugu, S. (2008). IRSp53: crossing the road of membrane and actin dynamics in the formation of membrane protrusions. Trends Cell Biol *18*, 52–60.

Setou, M., Seog, D.-H., Tanaka, Y., Kanai, Y., Takei, Y., Kawagishi, M., and Hirokawa, N. (2002). Glutamate-receptor-interacting protein GRIP1 directly steers kinesin to dendrites. Nature *417*, 83–87.

Soltau, M., Richter, D., and Kreienkamp, H.J. (2002). The insulin receptor substrate IRSp53 links postsynaptic shank1 to the small G-protein cdc42. Mol Cell Neurosci *21*, 575–583.

Soltau, M., Berhörster, K., Kindler, S., Buck, F., Richter, D., and Kreienkamp, H.-J. (2004). Insulin receptor substrate of 53 kDa links postsynaptic shank to PSD-95. J Neurochem *90*, 659–665.

Steward, O. (1995). Targeting of mRNAs to subsynaptic microdomains in dendrites. Curr Opin Neurobiol *5*, 55–61.

Suetsugu, S., Murayama, K., Sakamoto, A., Hanawa-Suetsugu, K., Seto, A., Oikawa, T., Mishima, C., Shirouzu, M., Takenawa, T., and Yokoyama, S. (2006). The RAC binding domain/IRSp53-MIM homology domain of IRSp53 induces RAC-dependent membrane deformation. J Biol Chem *277*, 35347–35358.

Terwilliger, E.F., Godin, B., Sodroski, J.G., and Haseltine, W.A. (1989). Construction and use of a replication-competent human immunodeficiency virus (HIV-1) that expresses the chloramphenicol acetyltransferase enzyme. Proc Natl Acad Sci U S A *86*, 3857–3861.

WHO (2012). The International Statistical Classification of Diseases and Health Related Problems (ICD-10). [Online im Internet.] URL: http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2015/en#/F00 [Stand: 05.12.2014, 14:15].

Wu, J., Huang, K.P., and Huang, F.L. (2003). Participation of NMDA-mediated phosphorylation and oxidation of neurogranin in the regulation of Ca2+- and Ca 2+/calmodulin-dependent neuronal signaling in the hippocampus. J Neurochem *86*, 1524–1533.

Xia, Z., and Storm, D.R. (2005). The role of calmodulin as a signal integrator for synaptic plasticity. Nat Rev Neurosci *6*, 267–276.

Yeh, T.C., Ogawa, W., Danielsen, A.G., and Roth, R.A. (1996). Characterization and Cloning of a 58/53-kDa Substrate of the Insulin Receptor Tyrosine Kinase. J Biol Chem *271*, 2921–2928.

Zhou, J., Jones, D.R., Duong, D.M., Levey, A.I., Lah, J.J., and Peng, J. (2013). Proteomic analysis of postsynaptic density in Alzheimer's Disease. ClinChimActa *420*, 62–68.

VII Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Hans-Jürgen Kreienkamp für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, seine fachliche Unterstützung und die mir eingeräumten Freiheiten, die zum Entstehen der hier vorliegenden Arbeit beigetragen haben. Kristin Bobsin danke ich für die gute Zusammenarbeit und das aufmerksame Korrekturlesen. Darüberhinaus bedanke ich mich bei allen weiteren Lesern des Manuskripts für ihre Mühe und den kritischen Blick. Daneben danke ich meinen Mitstreitern aus der AG Kreienkamp, insbesondere Margarete Bamann und Hans-Hinrich Hönck, für die angenehme Arbeitsatmosphäre, Stefan Kindler danke ich für die gemeinsamen Neuronen-Präparationen. Meiner Familie danke ich für die motivierenden Worte und Ihren seit Jahren großen Rückhalt.

VIII Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

IX Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ort, Datum: ..... Unterschrift: .....

X Anhang

Tabelle 10.1: Bezugsquellen des Materials für molekularbiologische Arbeiten

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

Tabelle 10.2: Bezugsquellen des Materials für zellbiologische Arbeiten

DMEM	*Lonza*
HBSS	*PAA*
MEM	*PAA*
FCS	*Invitrogen*
Trypsin	*Invitrogen*
Horseserum	*Invitrogen*
GIBCO Neurobasal Medium	*Invitrogen*
B27	*Invitrogen*
L-Glutamin	*Invitrogen*
Glutamat	*Invitrogen*
PermaFluor Aqueous Mounting Medium	*Thermo Scientific*
Objektträger	*Assistent*
Deckgläschen	*Assistent*
Poly-L-Lysin	*Sigma*
12-Loch-Zellkulturschale	*Nunc*
100 x 20 mm Zellkulturschale	*Sarstedt*
Brefeldin A	*AppliChem*
Rolipram	*Sigma*
Forskolin	*Merck*
Formaldehyd	*Sigma*
Triton-X-100	*Sigma*
TTX	*Sigma*
NMDA	*Sigma*

Tabelle 10.3: Bezugsquellen des Materials für proteinbiochemische Arbeiten

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

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

Tabelle 10.4: Zusammensetzung von Puffern und Lösungen

5x KCM	0,5 M KCl, 0,15 M CaCl2 , 0,25 M $MgCl_2$
LB-Medium	10 g/l Bacto-Trypton, 10 g/l NaCl, 10 g/l Hefeextrakt (pH 7,5)
LB-Plattenagar	LB-Medium, 15 g/l Select Agar
TAE-Puffer	100 mM Tris, 5 mM EDTA (pH 8,0)
Versenepuffer	137 mM NaCl, 8,8 mM Na2 HPO4 , 2,7 mM KCl, 0,7 mM KH_2 PO_4 , 1 mM EDTA
Präparationsmedium	HBSS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
Ausplattiermedium	MEM, 0,6 % Glukose, 10 % HS
Kulturmedium für Neurone	Neurobasalmedium, B27 20 µl/ml, L- Glutamin (0,5 mM), Primocin 100 µg/ml, Glutamat (25 µM)
Boratpuffer	0,05 M Borsäure, 0,02 M Na2 B_4 O_7 (pH 8,5)
2x BBS	50 mM BES, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na_2 HPO_4 (pH 6,94 - 6,98, steril filtriert)
PBS	137 mM NaCl, 8,8 mM Na_2 HPO_4 , 2,7 mM KCl, 0,7 mM KH_2 PO_4
RIPA-Puffer	150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 % NP- 40, 0,5 % Natriumdeoxycholat, 0,1 % SDS, 50 mM Tris/HCl (pH 8,0), Proteaseinhibitoren (10 µg/ml Leupeptin, 100 µM PMSF, 1 µg/ml Pepstatin A)
5 x Lämmlipuffer	300 mM Tris, 50 % (v/v) Glycerin, 500 mM DTT, 7,5% (w/v) SDS, 0,5% (w/v) Bromphenolblau (pH 6,8)
Laufpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycerin, 0,1 % (w/v) SDS (pH 8,3)
Transferpuffer	20 % Methanol, 9 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,02 % SDS
TBST	150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 0,2 % Tween 20 (pH 7,9)

Tabelle 10.5 Kontrolle der FUW-Sequenz (5'-Ende links, 3'-Ende rechts):

Publizierte Sequenz	TTAATT-----G-G--G--TGCAG--C-GGCCTCC
Sanger-Sequenzierung	TTAATTAACCCGTGTCGGCTCCAGATCTGGCCTCC
Neue Schnittstelle BglII	AGATCT