

Inhalt

1	EINLEITUNG	1
1.1	DER SYNAPTISCHE VESIKELZYKLUS	1
1.1.1	<i>Rab3-Zyklus und Transport synaptischer Vesikel</i>	2
1.1.2	<i>Regulierte Exocytose und Transmitterfreisetzung</i>	2
1.1.3	<i>Endocytose und Recycling synaptischer Vesikel</i>	5
1.2	STEUERUNG DES ZYKLUS ÜBER SYNAPTISCHE VESIKELPROTEINE	6
1.2.1	<i>Integrale Membranproteine</i>	8
1.2.1.1	Synaptobrevin	8
1.2.1.2	Synaptophysin	8
1.2.1.3	Synaptotagmin.....	9
1.2.1.4	vATPase	9
1.2.1.5	Neurotransmitter Transport	10
1.2.1.6	SV2	10
1.2.2	<i>Membranassoziierte Proteine und transient assoziierte Proteine</i>	11
1.2.2.1	Rab3 und Rab3- Effektoren.....	11
1.2.2.2	Munc18	12
1.2.2.3	Munc13	12
1.2.2.4	Synapsin	13
1.3	PROTEOMANALYSE SYNAPTISCHER VESIKEL	14
1.4	DREI NEUE KANDIDATEN	16
1.4.1	<i>Leucin zipper domain protein</i>	16

1.4.2	<i>WD repeat und FYVE domain containing 1 isoform 1</i>	16
1.4.3	<i>Testis- specific adriamycin sensitivity protein</i>	17
1.5	ATLASTIN UND SPG3A	17
1.6	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	18
2	MATERIAL UND METHODEN	19
2.1	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	19
2.1.1	<i>Steriles Arbeiten</i>	19
2.1.2	<i>Herstellung von Nährmedien</i>	19
2.1.3	<i>Anzucht von Bakterien</i>	21
2.1.3.1	Animpfen von Flüssigkulturen.....	21
2.1.3.2	Ausplattieren von Flüssigkulturen.....	21
2.1.4	<i>Herstellung elektrokompetenter Bakterien</i>	21
2.1.5	<i>Herstellung RbCl₂-kompetenter Bakterien</i>	22
2.1.6	<i>Plasmidpräparation durch alkalische Lyse</i>	22
2.1.6.1	Minipräparation.....	22
2.1.6.2	Maxipräparation	23
2.1.7	<i>DNA-Konzentrationsbestimmung</i>	24
2.1.7.1	Konzentrationsbestimmung über ein Agarosegel	24
2.1.7.2	Photometrische Messung.....	25
2.1.8	<i>Transformation</i>	25
2.1.8.1	Elektroporation.....	25
2.1.8.2	Hitzeschock.....	26
2.1.9	<i>Sequenzierung</i>	26
2.1.10	<i>Agarosegel- Elektrophorese</i>	26
2.1.11	<i>DNA- Isolation aus Agarosegelen</i>	27
2.1.11.1	DNA- Isolation aus Agarosegelen mit Glasmilch	27
2.1.11.2	DNA- Isolation aus Agarosegelen über eine Säule	28
2.1.12	<i>Polymerase- Kettenreaktion (PCR)</i>	29
2.1.13	<i>Präzipitation von DNA</i>	30
2.1.14	<i>Direkte Aufreinigung von PCR- Produkten über eine Silicamembran</i>	30

2.1.15	<i>Restriktion</i>	31
2.1.16	<i>DNA- Modifikation</i>	32
2.1.16.1	Phosphorylierung von 5'- Enden.....	32
2.1.16.2	Dephosphorylierung von 5'- Enden	32
2.1.17	<i>Ligation</i>	33
2.2	METHODEN DER ZELLKULTUR	33
2.2.1	<i>Steriles Arbeiten</i>	33
2.2.2	<i>Nährmedien</i>	33
2.2.3	<i>Kultivierung von eukaryotischen Zellen</i>	34
2.2.4	<i>Passagieren</i>	34
2.2.5	<i>Transfektion durch Elektroporation</i>	35
2.2.6	<i>Beschichten von Deckgläsern</i>	36
2.2.7	<i>Ausplattieren der Zellen</i>	36
2.3	IMMUNCYTOCHEMIE	37
2.3.1	<i>Fixierung der Zellen</i>	37
2.3.2	<i>Immunfärbung</i>	38
2.3.3	<i>Mikroskopische Analyse</i>	39
2.4	MATERIALIEN	39
2.4.1	<i>Chemikalien</i>	39
2.4.2	<i>Kits</i>	40
2.4.3	<i>Zellen</i>	40
2.4.4	<i>Plasmide</i>	40
2.4.5	<i>Oligonucleotide</i>	41
2.4.6	<i>Antikörper</i>	42
2.4.7	<i>Zubehör und Geräte</i>	42
3	ERGEBNISSE	46
3.1	KLONIERUNG	46
3.1.1	<i>Klonierungsstrategie</i>	46
3.1.2	<i>Präparation des Vektors für die Ligation</i>	47

3.1.3	<i>Präparation der Insert- Sequenzen für die Ligation</i>	51
3.1.4	<i>Ligation und Transformation</i>	56
3.1.5	<i>Vektorkarte</i>	61
3.1.6	<i>In Fusion Dry Down PCR Cloning Kit</i>	61
3.1.6.1	Primer Design.....	62
3.1.6.2	Präparation des linearisierten Vektors	62
3.1.6.3	PCR- Amplifikation und Aufreinigung	63
3.1.6.4	Klonierungsreaktion	65
3.2	SEQUENZANALYSE DER ERHALTENEN KONSTRUKTE.....	66
3.3	LOKALISATIONSTUDIEN	67
3.3.1	<i>Vorhersage der Lokalisation</i>	67
3.3.2	<i>Transfektionen und Immuncytologie</i>	67
3.3.2.1	Mus musculus LanC like 2.....	68
3.3.2.2	Atlastin	69
3.3.2.3	Interaktionspartner von Atlastin.....	75
3.4	IN SILICO IN SITU HYBRIDISIERUNG.....	77
4	DISKUSSION	81
4.1	KLONIERUNG	82
4.2	TRANSFEKTION UND IMMUNCYTOCHEMIE	86
4.3	LEUCIN ZIPPER DOMAIN PROTEIN	88
4.4	WD REPEAT AND FYVE DOMAIN CONTAINING 1 ISOFORM 1	89
4.5	TESTIS SPECIFIC ADRIAMYCIN SENSITIVITY PROTEIN.....	90
4.6	ATLASTIN UND DKFZp761B107	92
4.7	AUSBLICK	94
5	ZUSAMMENFASSUNG	96
6	LITERATURVERZEICHNIS	97
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	110

1 Einleitung

1.1 Der synaptische Vesikelzyklus

Der synaptische Vesikelzyklus ist einer der wesentlichen Elemente synaptischer Transmission und damit auch der Informationsverarbeitung im Gehirn. Er findet im präsynaptischen Teil der Synapse statt, mit dem Ziel, auf eine lokale Ca^{2+} -Erhöhung mit einer schnellen, regulierten und sich wiederholenden Neurotransmitterfreisetzung in den synaptischen Spalt reagieren zu können und damit den Informationsfluss von einer Nervenzelle zur anderen aufrechtzuerhalten. Hierfür sind allerdings noch weitere zelluläre Prozesse notwendig, die an dieser Stelle keine Erwähnung finden. Das zentrale Element des Vesikelzyklus ist die Ca^{2+} -gesteuerte Exocytose mit Transmitterfreisetzung (5), der sich drei verschiedene Wege der Endocytose (6-8) und der Vesikelregeneration (1 und 9) anschliessen. Anschliessend werden die synaptischen Vesikel regeneriert und entweder, im so genannten Reservepool, zwischengelagert oder sie gelangen als Teil des Recyclingpools direkt wieder zur aktiven Zone. Die Vesikel des Reservepools gewährleisten vor allem die Transmitterfreisetzung bei anhaltender Stimulation. Bei moderater Stimulation kommt es zur Freisetzung des Neurotransmitters aus Vesikeln des Recyclingpools und/oder des sogenannten *readily releasable pools* (Gesamtheit aller in der aktiven Zone für die Fusion bereitstehenden Vesikel). Das *Docking* (3) und *Priming* (4) leitet die erneute Exocytose ein und schliesst damit den Kreis. Im Folgenden wird genauer auf die molekularen Ereignisse und die entsprechenden Proteine des Zyklus eingegangen.

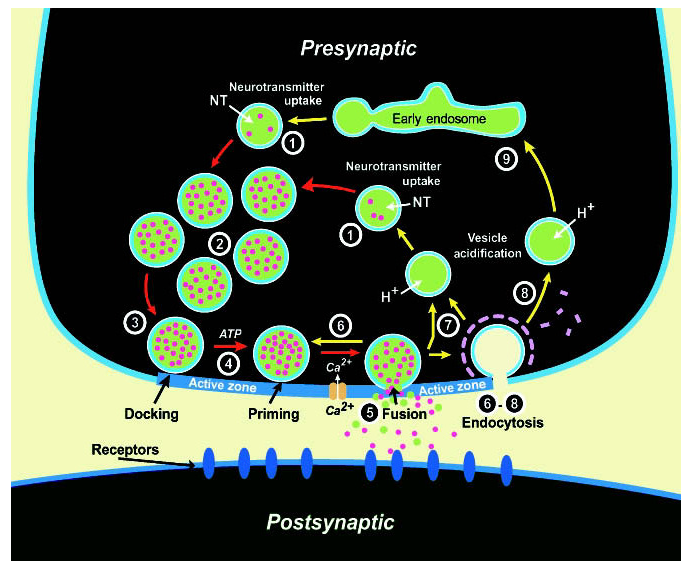


Abb.1 Der synaptische Vesikelzyklus

1.1.1 Rab3-Zyklus und Transport synaptischer Vesikel

Der Transport synaptischer Vesikel erfolgt entweder durch Diffusion oder durch das Cytoskelett (Abbildung 3). Rab3A und Rabophilin-3A könnten für Richtung und Spezifität des Transports eine wichtige Rolle spielen. Rab3A, ein GTP-bindendes Protein, ist eng mit der Vesikelmembran verknüpft und bindet im GTP-gebundenen Zustand Rabophilin-3A. Durch die GTP Hydrolyse wird der Vesikel in eine bestimmte Richtung gelenkt. In den GDP-gebundenem Zustand dissoziiert Rabophilin-3A ab und Rab3A wird von einem Protein namens GDI gebunden und dissoziiert ebenfalls von der Membran ab. Durch Austausch des GDP mit GTP kann der Rab3-Zyklus erneut stattfinden: GDI bindet nur im GDP-gebundenen Zustand an Rab3A und gibt dieses somit wieder frei. Rab3A assoziiert mit der Vesikelmembran. Rab3 und seine Effektoren werden in Abschnitt 1.2.2.1 detailliert beschrieben

1.1.2 Regulierte Exocytose und Transmitterfreisetzung

Wird die präsynaptische Membran durch ein Aktionspotential depolarisiert, so öffnen sich in den meisten Synapsen spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle des P/Q- oder des N-Typs (Dietrich, 2003). Diese sind, im Gegensatz zu den zufällig angeordneten Vesikeln

der aktiven Zone, in Clustern angeordnet. Die regulierte Exocytose hat zwei Komponenten der Transmitterfreisetzung: eine schnelle synchrone und eine langsamere asynchrone Komponente. Beide sind strikt Ca^{2+} -abhängig. Die schnelle Transmitterfreisetzung wird durch eine lokale Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration auf 5-100 μM ausgelöst, wobei die Freisetzung ab 20 μM gesättigt ist. Ca^{2+} strömt in die Zelle und löst die Transmitterfreisetzung mit einer Verzögerung von 50-500 μsec aus. Diese sehr kurze Dauer lässt vermuten, dass hierbei Ca^{2+} nur die Öffnung der Fusionspore und keine komplexe Signalkaskade auslöst. Die langsame asynchrone Komponente wird bereits durch Ca^{2+} -Konzentration von unter 5 μM ausgelöst. Im Gegensatz zur schnellen Transmitterfreisetzung dominiert diese Komponente bei hohen Stimulationsfrequenzen.

An der aktiven Zone angedockte Vesikel müssen einen Komplex, den sogenannten Core-Komplex, bilden (*Priming*). Dieser wird aus SNARE-Proteinen gebildet. SNARE-Proteine vermitteln nicht nur die Fusion synaptischer Vesikel mit der Plasmamembran, sondern sind auch an allen anderen intrazellulären Membranfusionsprozessen beteiligt. Sie sind durch etwa 70 Aminosäuren lange Motive, den SNARE-Motiven, charakterisiert. Vier Klassen solcher Motive sind bekannt: R-, Qa-, Qb- und Qc-Motive. SNARE-Proteine besitzen ein oder zwei solcher Motive. Stabile SNARE-Komplexe können nur dann entstehen, wenn sich vier SNARE-Motive in einem parallelen vier-helicalen Bündel anordnen. Dabei muss aus jeder der genannten Klassen jeweils ein Motiv zum Komplex beitragen. SNARE-Proteine lassen sich entweder in v (*vesicle*)- und t (*target membrane*)-SNAREs, oder in R (konserviertes Arginin im Zentrum des SNARE-Motivs)- und Q (konserviertes Glutamin im Zentrum des SNARE-Motivs)-SNAREs einteilen. Die synaptische Exocytose wird durch drei SNARE-Proteine vermittelt: Synaptobrevin (detaillierte Beschreibung des Proteins in Abschnitt 1.2.1.1), Syntaxin-1 und SNAP-25 (Söllner, 1993). Synaptobrevin befindet sich in der Membran synaptischer Vesikel und trägt ein R-SNARE-Motiv zum Core-Komplex bei. Syntaxin-1 ist mit der Plasmamembran assoziiert und trägt das Qa-Motiv zum Komplex bei. SNAP-25 ist ebenfalls mit der Plasmamembran assoziiert und trägt zwei Motive zum Core-Komplex bei: das Qb- und Qc-Motiv. SNARE-Proteine haben einen Anteil an der Spezifität der intrazellulären Membranfusionsprozesse (Jahn & Südhof,

1999, Rizo & Südhof, 2002). Durch die Bildung des SNARE-Komplexes entsteht ein unstabiles Intermediat, welches entweder vollständig mit der Membran fusioniert oder zurück in den angedockten Zustand gelangt. Zur Stabilisierung des Intermediates können so genannte Complexine an den Komplex binden (Archer et al., 2002). Kommt es zur vollständigen Fusion, geht der Core-Komplex von einem *trans*-Zustand in einen *cis*-Zustand über. Anschliessend dissoziiert der Komplex. Die Bildung des SNARE-Komplexes wird durch weitere Protein-Protein-Interaktionen kontrolliert. Das lösliche SM-Protein Munc18 (detaillierte Beschreibung des Proteins in Abschnitt 1.2.2.2) bindet an Syntaxin. Ausserdem bindet Synaptophysin (detaillierte Beschreibung des Proteins in Abschnitt 1.2.1.2) an Synaptobrevin. Beide SNAREs können in diesem Zustand nicht mehr in den SNARE-Komplex eingebracht werden. Sowohl Synaptophysin, als auch Synaptobrevin können Heterooligomere und Homooligomere bilden (Thomas et al. 1988, Laage & Langosch 1997), wobei Synaptobrevin nur als Dimer beobachtet wird, Synaptophysin jedoch auch als Hexamer oder größeres Oligomer (Johnston & Südhof 1990).

Durch welchen Mechanismus löst Ca^{2+} das Öffnen der Fusionspore aus? Eine mögliche Antwort für die schnelle Transmitterfreisetzung liefert das folgende Modell. Das integrale Membranprotein synaptischer Vesikel Synaptotagmin (detaillierte Beschreibung des Proteins in Abschnitt 1.2.1.3) bindet Ca^{2+} -unabhängig an den SNARE-Komplex. Synaptotagmin besitzt fünf Bindungsstellen für Ca^{2+} . Werden diese Stellen durch einströmende Ca^{2+} -Ionen besetzt, kommt es zur partiellen Einlagerung der C_2 -Domänen in die Phospholipide der Plasmamembran. Durch diese Einlagerung öffnet sich die Fusionspore und der *trans*-Komplex wird in einen *cis*-Komplex umgewandelt. Dieses Modell ist jedoch noch nicht bewiesen.

Nach der Transmitterfreisetzung kommt es zur Auflösung des *cis*-SNARE-Komplexes, um die SNAREs für die nächste Fusionsrunde bereit zu machen. Dies geschieht üblicherweise an der Plasmamembran bevor es zur Endocytose kommt (Littleton et al. 2001), kann jedoch auch auf Clathrin beschichteten Vesikeln geschehen, bevor diese erneut an die Plasmamembran docken. Das Auflösen des Komplexes wird von NSF,

einer hexameren Chaperon-ähnlichen ATPase, und dessen Kofaktor α -SNAP unter ATP-Verbrauch bewerkstelligt.

1.1.3 Endocytose und Recycling synaptischer Vesikel

Für die Endocytose und das Recycling synaptischer Vesikel stehen der Nervenzelle drei verschiedene Wege zur Verfügung. Bei einem Weg werden die Vesikel direkt durch Schliessen der Fusionspore endocytiert, verbleiben an der Plasmamembran und werden dort mit Neurotransmitter angereichert (*kiss and stay*). Bei dem lokalen Recycling Weg werden die Vesikel Clathrin-unabhängig endocytiert, angesäuert und mit Neurotransmitter angereichert (*kiss-and-run*). Der dritte Weg verläuft über Clathrin beschichtete Vesikel, die entweder direkt oder über ein frühes Endosom regeneriert werden. Bei den ersten beiden handelt es sich um schnellere Wege, die bei niedrigen Stimulationsfrequenzen zum Tragen kommen. Das endosomale Recycling hingegen wird eher bei hohen Stimulationsfrequenzen eingesetzt (Koenig & Ikeda 1996, Pyle et al. 2000, Richards et al. 2000). Ein Grund hierfür könnte sein, dass die Kapazität des lokalen Weges für hohe Stimulusfrequenzen zu niedrig ist. So wird die erniedrigte Geschwindigkeit durch die erhöhte Kapazität ausgeglichen. Eine andere mögliche Erklärung könnte sein, dass die Zelle unter Stress (hohe Stimulusfrequenzen) das Endosom als Sortierstation für intakte und defekte Vesikel nutzt.

Die Anreicherung des Neurotransmitters bringt der Zelle neben ihrer primären Bedeutung für die Transmitter Exocytose noch weitere Vorteile. Zum Beispiel wird durch die Anreicherung das Cytosol vor hohen Transmitterkonzentrationen bewahrt und die dort befindlichen Enzyme für die Synthese des Transmitters werden nicht inhibiert. Gleichzeitig ist die Aufnahme in die synaptischen Vesikel ein Schutz für den Transmitter selbst, der so nicht durch katabolische Enzyme angegriffen werden kann. Bestimmte Transmitter, wie zum Beispiel Dopamin, würden im Cytosol oxidiert und könnten dadurch der Zelle schaden. Der Transport verläuft über vesikuläre Transporter (detaillierte Beschreibung in Abschnitt 1.2.1.5) und eine Protonenpumpe. Bei der Protonenpumpe handelt es sich um die vATPase (detaillierte Beschreibung des Proteins in Abschnitt 1.2.1.4). Sie sorgt dafür, dass Protonen unter ATP-Verbrauch in die Vesikel gepumpt

werden, wodurch ein elektrochemischer Protonengradient über der Membran aufgebaut wird (Maycox et al. 1988). Dieser dient als Energiequelle für die Transporter, um Transmittermoleküle ins Innere der Vesikel zu transportieren. Dadurch können im Lumen des Vesikels bis zu 1000fach höhere Konzentrationen als im Cytoplasma entstehen. Die Konzentration von Acetylcholin kann bis zu 0,6 M ansteigen (Barker et al., 1972).

1.2 Steuerung des Zyklus über synaptische Vesikelproteine

Die verschiedenen Funktionen, die synaptische Vesikel während des in Abschnitt 1.1 beschriebenen Zyklus erfüllen, werden von einer Vielzahl an Proteinen vermittelt. Nicht zuletzt durch ihre geringe Größe und einfache Proteinzusammensetzung konnte man in der Vergangenheit synaptische Vesikel detailliert charakterisieren. Die Proteine synaptischer Vesikel können in zwei funktionelle Klassen eingeteilt werden: Proteine, die an der Aufnahme von Neurotransmittern beteiligt sind (Transport Proteine) und Proteine, die den Membranfluss der Vesikel vermitteln (*trafficking proteins*) (Südhof & Jahn, 1991). Die meisten Erkenntnisse über die Funktion synaptischer Vesikelproteine konnte man aus Mutations- und Toxinstudien gewinnen (Südhof 1995). Obwohl die meisten Proteine spezifisch für synaptische Vesikel sind, lassen sie kein gemeinsames Motiv erkennen, welches auf einen Sortiermechanismus hindeuten könnte. Synaptische Vesikelproteine kommen oft in mehreren Isoformen vor, die in verschiedenen Neuronengruppen differentiell exprimiert werden. In Abbildung 2 sind die bereits etablierten synaptischen Vesikelproteine und deren Anordnung in der Vesikelmembran dargestellt. Abbildung 3 zeigt die synaptischen Proteine, die während des synaptischen Vesikelzyklus transient mit der Vesikelmembran assoziiert sind.

Die am Zyklus synaptischer Vesikel beteiligten Proteine werden in Abschnitt 1.1 nur kurz erwähnt und ihre Bedeutung für den dargestellten Prozess erläutert. Im Folgenden wird auf diese Proteine im Detail eingegangen.

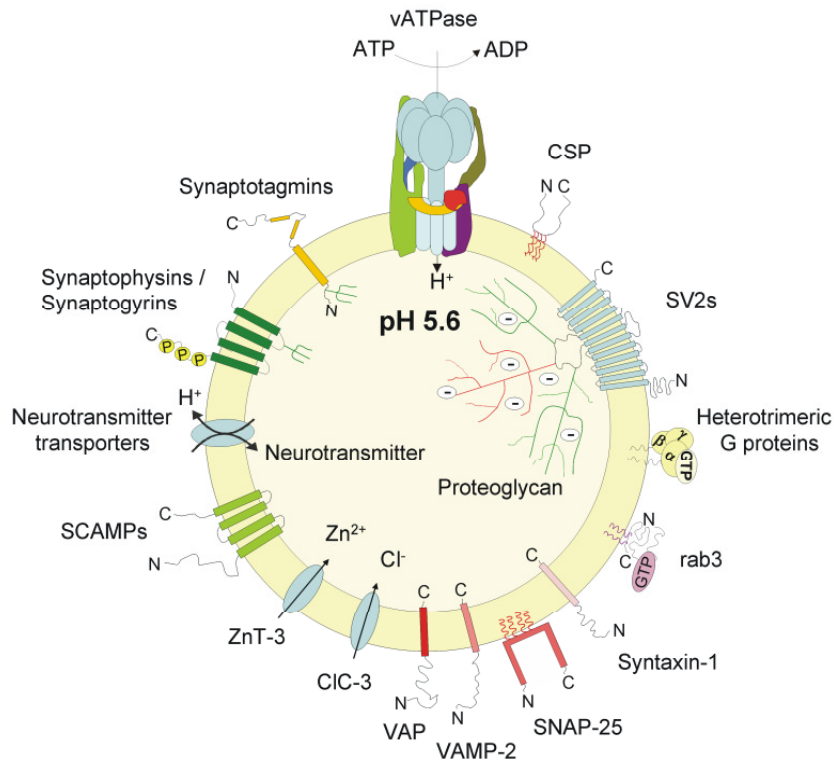


Abb. 2 Zusammenstellung bereits etablierter synaptischer Vesikelproteine (Burré & Volkandt 2006)

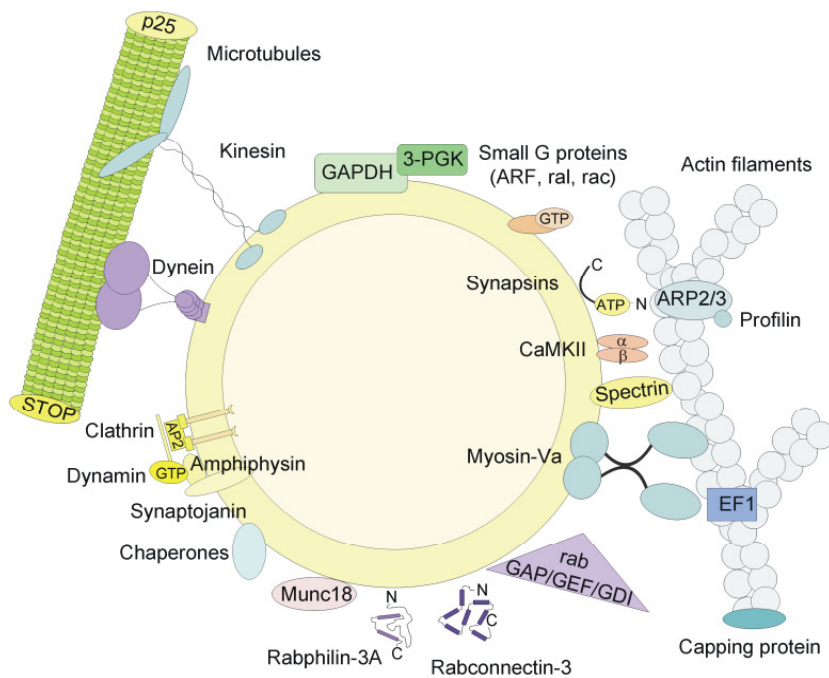


Abb. 3 Zusammenstellung synaptischer Vesikelproteine die während des synaptischen Vesikel-zyklus vorübergehend mit der Vesikelmembran assoziiert sind. (Burré & Volkandt 2006)

1.2.1 Integrale Membranproteine

1.2.1.1 Synaptobrevin

Synaptobrevin, auch VAMP-2 genannt, war eines der ersten synaptischen Vesikelproteine, das kloniert wurde. Es gehört zur Superfamilie der SNARE-Proteine (R- oder v-SNARE) und ist als Bestandteil des Core-Komplexes eines der drei für die Membranfusion notwendigen SNAREs. Synaptobrevin ist mit einer einzigen Transmembrandomäne C-terminal in der Vesikelmembran verankert. Die cytoplasmatische aminotermi-nale Domäne umfasst eine prolinreiche Region, gefolgt von einer geladenen konser-vierten Sequenz und beinhaltet die SNARE-typische α -helicale *coiled-coil*-Domäne, die ebenfalls Bestandteil des Core-Komplexes ist. Drei verschiedene Formen des Pro-teins sind bekannt: VAMP-1, VAMP-2, VAMP-B. Es ist Angriffspunkt der bakteriellen Neurotoxine Tetanustoxin und Botulinumtoxin.

1.2.1.2 Synaptophysin

Das Glycoprotein Synaptophysin gehört zur gleichen Familie, der auch die Proteine Synaptoporin und Synaptogyrin angehören, und besitzt vier Transmembrandomänen, deren Amino- und Carboxytermini ins Cytoplasma ragen. Der tyrosinreiche carboxy-terminale Schwanz wird von den Proteinen pp60c-src17 und CaM Kinase II phospho-ryliert und dient als Substrat für src-Kinasen. Es wurde gezeigt, dass Ca^{2+} in dieser Region binden kann (Rehm et al. 1986). Synaptophysin kann Homooligomere, beste-hend aus vier bis sechs Monomeren, bilden. Synaptophysin ist das Hauptphosphopro-tein synaptischer Vesikel (Pang et al. 1988) und besitzt sowohl für Serin/Threonin-Kinasen, als auch für Tyrosinkinase Bindungsstellen. Im Zyklus synaptischer Vesikel dient es als Kontrollprotein für die Membranfusion während der Exocytose, in dem es VAMP-2 reversibel bindet. Ist VAMP-2 an Synaptophysin gebunden, kann es keine Interaktionen mit den anderen SNAREs eingehen und der, für die Membranfusion, notwendige Core-Komplex kann nicht gebildet werden.

1.2.1.3 Synaptotagmin

Synaptotagmine besitzen eine kurze N-terminale intravesikuläre Sequenz, eine einzige Transmembrandomäne, eine kurze Linker-Sequenz, und zwei cytoplasmatische C₂-Domänen (C₂A und C₂B-Domänen; Perin et al 1990, Geppert et al. 1991). Zwei verschiedene Formen, Synaptotagmin 1 und 2, werden differentiell exprimiert, sind jedoch wahrscheinlich funktionell ähnlich. Beide können bis zu fünf Ca²⁺-Ionen kooperativ binden. Die C₂A-Domäne von Synaptotagmin 1 bindet drei (Ubach et al. 1998) und die C₂B-Domäne zwei Ca²⁺-Ionen (Fernandez et al. 2001). Binden die C₂-Domänen an Phospholipidmembranen, steigt die Ca²⁺-Affinität bis zu 1000fach. Die negativ geladenen Kopfgruppen bieten zusätzliche Koordinationsstellen für Ca²⁺-Ionen. Synaptotagmin ist nach einem gängigen Modell der Ca²⁺-Sensor, welcher Ca²⁺-unabhängig an den SNARE-Komplex bindet, sich dann Ca²⁺-abhängig partiell in die Phospholipidschicht der Membran einlagert und somit die Fusion auslöst. Insgesamt gibt es 15 verschiedene Synaptotagmine.

1.2.1.4 vATPase

Die vATPase ist ein großer Multiprotein-Komplex (~1 Million Dalton) der sich aus 13 Untereinheiten zusammensetzt und die Maße 14 x 14 x 24 nm besitzt (Arata et al. 2002), was ungefähr 10% des Vesikelvolumens ausmacht. Damit ist die vATPase die größte Komponente synaptischer Vesikel. Die meisten synaptischen Vesikel verfügen nur über eine Protonenpumpe (Stadler & Tsukita 1984). Die vATPase besteht aus dem peripheren Komplex V₁, welcher die ATPase-Aktivität vermittelt, sowie einem etwas kleineren integralen Membrankomplex V₀, welcher für die Protonentranslokation verantwortlich ist. Die beiden Komplexe können über die 116-kDa Untereinheit der Pumpe, der größten Komponente des Proteins, miteinander verbunden sein. Die vATPase pumpt Protonen in das Innere des synaptischen Vesikels und baut so einen elektrochemischen Gradienten über der Membran auf. Dieser Gradient stellt die Energie für die Aufnahme von Neurotransmittern durch Transporter bereit.

1.2.1.5 Neurotransmitter Transport

Bislang sind vier verschiedene Transporter-Familien für die Aufnahme von Neurotransmittern in die synaptischen Vesikel bekannt: eine für Acetylcholin (bislang ein Transporter identifiziert), eine andere für Catecholamine, Histamin und Serotonin (zwei differentiell exprimierte Transporter identifiziert), eine dritte Familie für die exzitatorische Aminosäure Glutamat (drei differentiell exprimierte Transporter identifiziert) und eine vierte für die inhibitorischen Aminosäuren GABA und Glycin (bislang ein Transporter identifiziert). Alle vesikulären Transporter sind integrale Membranproteine mit zwölf Transmembrandomänen, die Ähnlichkeiten mit bakteriellen *drug-resistance*-Transportern haben und deutlich von den Transmittertransportern in der Plasmamembran zu unterscheiden sind. Einige Transporter sind für den Transport von Transmittermolekülen nur auf das Membranpotential angewiesen, andere benötigen sowohl das Membranpotential, als auch den Protonengradienten. Die Expression eines bestimmten Transporters spezifiziert das Neuron für den entsprechenden Transmitter, so dass beispielsweise glutaminerge Neuronen durch die Transfektion mit Fremd-DNA, die für einen anderen Transportertyp codiert, in ein cholinerges Neuron umgewandelt werden kann. Auf einigen Neuronen kann man die Koexpression eines Glutamat-Transporters mit einem anderen Neurotransmitter-Transporter beobachten.

1.2.1.6 SV2

Das integrale Membranprotein SV2 wurde in einem monoklonalen Antikörperscreen identifiziert (Buckley & Kelly, 1985). Es kommt nicht nur in der Membran synaptischer Vesikel vor, sondern auch in neuroendokrinen sekretorischen Granula, liegt jedoch nur in Vertebraten konserviert vor. Drei SV2-Gene codieren für die hoch homologen Proteine SV2A, SV2B und SV2C (Janz & Südhof 1999). SV2-Proteine besitzen zwölf potentielle Transmembrandomänen mit cytoplasmatischen N- und C-Termini und zeigen signifikante Homologien mit Kohlenhydrat-Transportern aus Eukaryoten und Bakterien. Bis auf einen, sind alle *Loops*, die die Transmembrandomänen verbinden, sehr kurz. Die Ausnahme bildet ein großer, hoch glykosylierter intravesikulärer *Loop*, der eventuell als ionische Matrix im Vesikelinneren dient (Buckley & Kelly 1985, Scranton et al. 1993). Die Transmembrandomänen und die cytoplasmatischen

Loops sind unter den SV2-Isoformen hochkonserviert, während die N-terminale cytoplasmatische Sequenz und die intravesikulären *Loops* nur wenig Homologie zeigen. Die SV2 Proteine werden im Gehirn differentiell exprimiert. SV2A ist in fast allen Neuronen vorhanden, SV2B zeigt eine etwas eingeschränkte Verteilung (Bajjalieh et al. 1994) und SV2C wird nur einer kleinen Gruppe von Neuronen im basalen Vorderhirn und in caudalen Bereichen des Gehirns exprimiert (Janz & Südhof 1999). Das verwandte Protein SVOP ist ebenfalls Bestandteil synaptischer Vesikel (Janz et al. 1998). Es hat, bis auf den langen intravesikulären glykosylierten *Loop*, eine ähnliche Transmembranstruktur und ist sowohl in Vertebraten, als auch in Invertebraten hoch konserviert. Es könnte sich bei SV2 also um einen Vertebraten-spezifischen Abkömmling von SVOP handeln. Funktionell dient SV2 wahrscheinlich als Transporter für Kationen. Insbesondere der Transport von Ca^{2+} -Ionen in die Vesikel hinein, und damit die Regulation des Ca^{2+} -Levels in der Nervenendigung, werden diskutiert.

1.2.2 Membranassoziierte Proteine und transient assoziierte Proteine

1.2.2.1 Rab3 und Rab3- Effektoren

Rab3 gehört zu den kleinen GTP-bindenden Proteinen. Es ist kovalent über Geranylgeranyl-Gruppen mit der Membran synaptischer Vesikel verbunden, kann sich jedoch auch von der Membran lösen. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Richtungslenkung synaptischer Vesikel zur aktiven Zone. Hierbei durchläuft es einen Zyklus, in dem es zwischen GTP- und GDP-gebundenem Zustand, sowie zwischen membrangebundenem und nicht-membrangebundenem Zustand pendelt. Rab3 hat zwei Effektor-Proteine, die an GTP-Rab3 binden, nicht jedoch an GDP-Rab3: Rabphilin (Shirataki et al. 1993, Li et al. 1994) und RIM1 α /2 α (Wang et al. 1997a, 2000; Wang & Südhof 2003). Beide haben eine ähnliche N-terminale Zink-Finger Domäne, die mit den Rab3-Proteinen interagiert, weisen Phosphorylierungsstellen für die PKA auf, und beinhalten zwei C-terminale C₂-Domänen, sind aber ansonsten funktionell und strukturell sehr unterschiedliche Proteine. Rabphilin ist ein lösliches Protein, das im Verlauf des Rab3-Zyklus transient über Rab3 mit der Membran synaptischer Vesikel assoziiert ist. Im

Rab3-Zyklus bindet es an GDP-gebundenes Rab3, entfernt dieses von der Vesikelmembran und ermöglicht so den Austausch des GDP gegen GTP. Das andere Effektorprotein RIM1 α /2 α ist ein etwas größeres, biochemisch unlösliches Protein der aktiven Zone, dessen C-terminale C₂-Domäne keine Ca²⁺-Bindungsstellen aufweist. RIM1 α (und wahrscheinlich auch RIM2 α) reguliert die Neurotransmitterfreisetzung durch Interaktion der N-terminalen Domäne mit Rab3 und Munc13, wahrscheinlich jedoch auch durch Interaktionen der PDZ-Domäne mit ERCs sowie durch Interaktionen der C-terminalen C₂-Domäne mit α -Liprin und Synaptotagmin. Im Gegensatz zu Rabphilin handelt es sich um ein essentielles Protein für die synaptische Transmission.

1.2.2.2 Munc18

Munc18 gehört zu den SM-Proteinen, einer Gruppe hydrophiler Proteine mit einer Größe von 60-70 kDa, die über die gesamte Sequenz Homologien zeigen, so dass wahrscheinlich keine spezielle Domäne mit der Funktion der Proteine korreliert. SM-Proteine sind essentiell für die Membranfusion. Sie interagieren auf verschiedene Weise mit SNARE-Proteinen in verschiedenen Membranfusionsprozessen. Munc18 ist das humane Homolog des ersten SM-Proteins, UNC-18, welches in einem genetischen Screen an *Caenorhabditis elegans* entdeckt wurde (Hosono et al., 1992). Munc18 bindet, im meist verbreitetsten Fusionsmechanismus, an die 20 N-terminalen Reste des SNARE-Proteins Syntaxin und kontrolliert somit die Bildung des Core-Komplexes. Munc18 könnte jedoch auch eine Rolle beim Andocken an die aktive Zone spielen (Voets et al., 2001). Im humanen Genom gibt es sieben UNC-18 Homologe (Bock et al., 2001), von denen drei (Munc18, Munc18b und Munc18c) an der exocytotischen Transmitterfreisetzung beteiligt sind (Hata et al., 1993; Pevsner et al., 1994; Tellam et al., 1995; Gengyo-Ando et al., 1996). Munc18 ist in Neuronen angereichert und absolut notwendig für die Exocytose synaptischer Vesikel.

1.2.2.3 Munc13

Munc13 gehört ebenfalls zu den SM-Proteinen. Es handelt sich um das humane Homolog des in einem genetischen Screen an *Caenorhabditis elegans* entdeckten Protein UNC-13. Drei Gene codieren für Munc13: Munc13-1, Munc13-2 und Munc13-3 (Bro-

se et al., 2000; Brose et al., 1995). Diese Isoformen werden differentiell im Gehirn exprimiert, wo sie nahe der aktiven Zone lokalisiert sind (Brose et al., 2000; Brose et al., 1995; Betz et al., 1998; Augustin et al., 1999). Munc13 ist essentiell für das *Priming* synaptischer Vesikel, wobei Munc13-1 in 90% der glutamatergen Synapsen *Priming*-Faktor ist und Munc13-2 in den restlichen 10% (Augustin et al., 1999; Varoqueaux et al., 2002). In GABA-ergen Synapsen werden beide coexprimiert und spielen eine Rolle beim *Priming* (Varoqueaux et al., 2002). Die Munc13-3 Isoform scheint diese Aufgabe in Synapsen paralleler Fiber-Purkinje-Zellen zu übernehmen (Augustin et al., 2001). Munc13 Proteine binden hochaffin über eine C1-Domäne endogen an die second messenger Diacylglycerol und Phorbol ester (Betz et al., 1998; Maruyama & Brenner, 1991). Dadurch wird wahrscheinlich die *Priming*-Funktion des Proteins aktiviert. Untersuchungen zeigen, dass diese Bindung zur verstärkten Nachlieferung von Vesikeln in den *ready-releasable-pool* führt und die Wahrscheinlichkeit der Transmitterfreisetzung ansteigt (Rhee et al., 2002). Die *Priming*-Aktivität selbst kommt wahrscheinlich durch Interaktion mit der N-terminalen *coiled-coil*-Domäne von Syntaxin 1 zustande. Syntaxin 1 wechselt dadurch von einer geschlossenen in eine offene Konformation, was zur Folge hat, dass Munc18 abdissoziiert und der SNARE-Komplex gebildet werden kann.

Munc13 interagiert mit fünf weiteren Proteinen, deren Bedeutung für den synaptischen Vesikel Zyklus jedoch noch nicht geklärt ist. Diese Proteine sind: RIM (Betz et al., 2001), Calmodulin (Xu X. Z. et al., 1998a), Doc2 (Orita et al., 1997; Duncan et al., 1999), ein ARF Austausch-Faktor (Neeb et al., 1999), eine hirnspezifische Spectrin-Isoform.

1.2.2.4 Synapsin

Synapsine sind die ersten synaptischen Proteine, die man identifiziert hat. Sie bedecken die Oberfläche synaptischer Vesikel als periphere Membranproteine. In Säugern exprimieren drei Synapsin-Gene alternativ gespleißte Protein-Varianten (Synapsin 1-3), die ähnliche N-terminale und zentrale Domänen, jedoch unterschiedliche C-terminale Sequenzen haben (Südhof et al., 1989; Hosaka & Südhof, 1998a; Kao et al., 1998; Porton et al., 1999). Die meisten Synapsen exprimieren Synapsin 1 und 2, Synapsin 3

kommt deutlich seltener vor. Eine N-terminale Domäne hat eine Phosphorylierungsstelle für PKA und Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase I. Die zentrale C-Domäne formt ein Dimer und bindet hochaffin ATP (Hosaka & Südhof, 1998a,b, 1999). Synapsin 1 bindet ATP nur in Anwesenheit von Ca^{2+} , Synapsin 2 bindet ATP unabhängig von Ca^{2+} , und Synapsin 3 bindet Ca^{2+} nur in Abwesenheit von Ca^{2+} (Hosaka & Südhof, 1998a,b). Synapsine binden, abhängig vom Phosphorylierungszustand ihrer N-terminalen Domäne, an synaptische Vesikel. Die Phosphorylierung durch die PKA und Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase I löst die Bindung auf. Synapsine wechseln demnach stimulationsabhängig zyklisch von einem Vesikel-gebundenem Zustand in einen nicht-gebundenen Zustand (Hosaka et al., 1999). Synapsine sind nicht essentiell für die synaptische Vesikelexocytose, werden jedoch benötigt, um die Anzahl der Vesikel aufrechtzuerhalten und um die synaptische Kurzzeit-Plastizität zu regulieren (Rosahl et al., 1993, 1995; Li et al., 1995b). Einer Hypothese zufolge vereinen Synapsine die synaptischen Vesikel in einem präsynaptischen Vesikelcluster, in dem sie diese am Cytoskelett verankern. Es wurde jedoch *in silico* gezeigt, dass reife Vesikelcluster kein Cytoskelett enthalten (Dunaevsky & Connor, 2000; Morales et al., 2000; Zhang & Benson, 2001). Daher ist diese Hypothese zur Synapsinfunktion relativ unwahrscheinlich.

1.3 Proteomanalyse synaptischer Vesikel

In der Vergangenheit wurden viele synaptische Proteine entdeckt. Die wichtigsten wurden bereits in Abschnitt 1.2 erwähnt und beschrieben. Es gibt jedoch Hinweise auf die Existenz weiterer synaptischer Proteine. Hierbei könnte es sich vor allem um hydrophobe Membranproteine handeln. Vergleicht man die Resultate verschiedener Proteomanalysen miteinander, so ergeben sich zwar einige Übereinstimmungen, jedoch auch einige Unterschiede was die identifizierten Proteine angeht. Besondere Schwierigkeiten hierbei bringt vor allem die Analyse integraler Membranproteine mit sich, die aufgrund ihrer Hydrophobizität Probleme bei der Gelelektrophorese bereiten. Um das Proteom synaptischer Vesikel komplett zu erfassen und neue synaptische Proteine zu identifizieren, wurden im jüngsten Ansatz von Jacqueline Burré mehrere Gelseparati-

onstechniken mit unterschiedlichen Massenspektrometrietechniken kombiniert. Für die Analyse wurden synaptische Vesikel aus dem Rattenhirn über einige Schritte, wie zum Beispiel differentielle Zentrifugation und Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation, präpariert und mit magnetischen *Beads* immungereinigt. Für die Trennung und Identifizierung der Proteine wurde 1-D SDS-PAGE mit nano-LC ESI-MS/MS, und die 2-D Systeme BAC/SDS-PAGE und dSDS-PAGE mit MALDI-TOF-MS kombiniert. Mit den drei verschiedenen Gelreinigungstechniken konnten insgesamt 185 Proteine identifiziert werden, deutlich mehr als in den vergangenen Proteomansätzen. Ungefähr die Hälfte der Proteine wurden als bekannte synaptische Vesikelproteine identifiziert. Hierbei handelte es sich um integrale synaptische Vesikelproteine, oder um Proteine, die peripher oder transient mit synaptischen Vesikeln assoziiert sind, inklusive der Proteine für die Endocytose. 4% aller identifizierten Proteine wurden als neue Proteine angesehen. Unter ihnen sind erst kürzlich dem Vesikelkompartiment zugeteilte Proteine, Proteine, über die weder Lokalisations-, noch Funktionsdaten vorliegen, und ganz neue Proteine, deren Aminosäuresequenz zum ersten Mal identifiziert wurde. In Abbildung 4 sind einige dieser Kandidaten schematisch dargestellt.

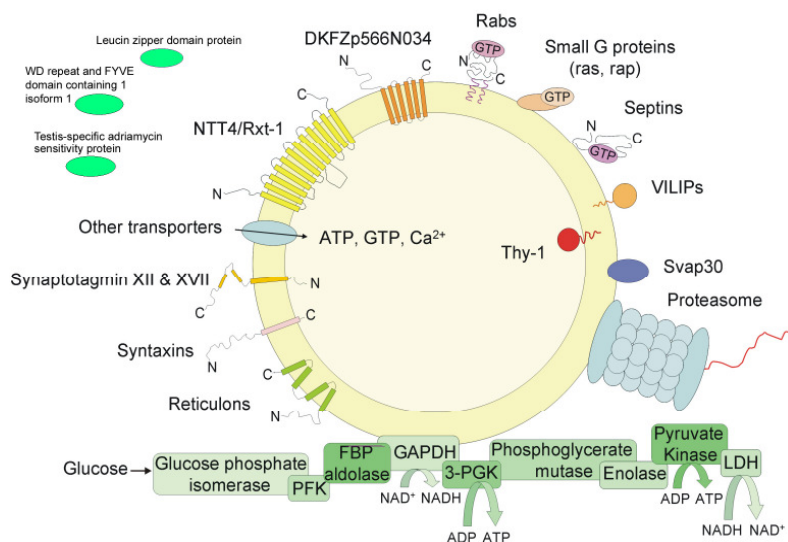


Abb. 4 Zusammenstellung einiger neuer synaptischer Vesikel Proteine (Burré & Volkandt 2006, modifiziert von Barrera 2007). Unter ihnen befinden sich unter anderem neue Isoformen bereits beschriebener etablierter Vesikelproteine, neue GTP-bindende Proteine, putative Transporter, Enzyme der Glykolysemaschinerie, Proteine des proteasomalen Abbaus, sowie Proteine deren Aminosäuresequenz zum ersten Mal identifiziert wurde.

1.4 Drei neue Kandidaten

Teil des Projektes ist die Untersuchung der neuen Proteine *leucin zipper domain protein* (LZD-Protein), *WD and FYVE domain containing 1 isoform 1* (WDFY1-Protein) und *testis-specific adriamycin sensitivity protein* (TSAS-Protein). Mit Hilfe verschiedener Algorithmen wurden konservierte Domänen der Proteine vorhergesagt.

1.4.1 Leucin zipper domain protein

Für das Protein mit der NCBI-Zugangsnummer XP_213213.2 kommen mehrere Domänen in Frage. Neben der katalytischen Domäne der Tyrosinkinase (Aminosäuren 5-188), der Polyphosphatkinase 2-Domäne (Aminosäuren 5-161) und der DEATH-Domäne (Aminosäuren 96-184), kommen die C-terminale Domäne der Glutathion S-Transferase (Aminosäuren 105-207), die in der Detoxifizierung eine wichtige Rolle spielt und die BAR-Domäne (Aminosäuren 112-277) in Frage, in die Endocytose und einige Schritten des intrazellulären Transportes verwickelt ist und eine Rolle bei der Membrankurvatur spielt.

1.4.2 WD repeat und FYVE domain containing 1 isoform 1

Das Protein mit der NCBI-Zugangsnummer XP_237323.2 enthält drei WD-40 *repeats* (Aminosäuren 5-43, 48-87 und 91-130). WD-40 *repeats* sind kurze, etwa 40 Aminosäure lange Motive, die oft mit dem Dipeptid Tryptophan und Aspartat (WD) enden (van der Voorn und Ploegh, 1992). WD-haltige Proteine besitzen vier bis 16 dieser Einheiten, die wahrscheinlich alle eine β -Propellerstruktur bilden. WD-haltige Proteine sind an verschiedenen zellulären Vorgängen wie zum Beispiel Signaltransduktion, Regulation des Zellzyklus oder Apoptose beteiligt. Die Bereiche um die WD-*repeats* stellt die Spezifität der Proteine sicher. Beispiele für WD-haltige Proteine sind die E3 Ubiquitin-Ligase und der Transkriptionsfaktor TAFII. Das Protein enthält wahrscheinlich vier weitere Domänen: Die Ubiquitin-Domäne, die Myosin-Domäne, die RING-Domäne und die FYVE-Domäne. Das Protein hat Ähnlichkeiten mit β -Transducin, der Untereinheit $\beta 2$ des *guanine nucleotide-binding proteins*, und mit einer Serin/Threonin- und Tyrosinkinase.

1.4.3 Testis- specific adriamycin sensitivity protein

Das Protein mit der Zugangsnummer XP_216158.2 enthält die LANC-ähnliche Domäne, die die Aminosäuren 81 und 444 umfasst. Lanthionine sind Thioetherbrücken, die vermutlich durch Dehydratation von Serinen und Threoninen und Anfügung von Cysteinen entstehen. Dieses Protein wird in hohen Mengen im Gehirn und in den Testes exprimiert und spielt wahrscheinlich eine Rolle in der Immunüberwachung dieser Organe (Mayer et al., 2001). Ein anderes Protein, LANCL1 (P40 *seven-transmembrane-domain protein*), enthält ebenfalls die erwähnte Domäne.

1.5 Atlastin und SPG3A

Neben den drei neuen Proteinen werden Studien zu dem Protein Atlastin durchgeführt. Dieses bereits bekannte synaptische Vesikelprotein wurde ebenfalls in der erwähnten Proteomanalyse identifiziert. Man konnte dem Protein jedoch noch keine eindeutige Funktion im Zusammenhang mit synaptischen Vesikeln zuordnen. Es ist an einer speziellen Form der erblichen spastischen Paraplegie beteiligt, was das besondere Interesse an diesem Protein mit erklärt. Angeborene spastische Paraplegien (HSPs) umfassen eine Gruppe klinisch heterogener Syndrome, die sich durch Spastizität und Schwäche der unteren Extremitäten auszeichnen. Diese Syndrome gehen mit distaler axonaler Degeneration in den langen aufsteigenden und absteigenden Bahnen des Rückenmarks einher. Eine Punktmutation in dem Gen für Atlastin verursacht die spezielle Form der Krankheit SPG3A, die durch frühes Einsetzen in der Entwicklung charakterisiert ist. Atlastin ist ein 64 kDa großes Protein, das zur Superfamilie der Dynamine gehört. Diese große GTPase kommt vorwiegend im Gehirn vor, wo sie besonders in pyramidalen Neuronen des cerebralen Cortex und des Hippocampus zu finden ist. Was die zelluläre und subzelluläre Lokalisation angeht, so konnte eine Kolo-kalisation mit verschiedenen Markern des Golgi-Apparates nachgewiesen werden. Durch Immungold Elektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass es speziell im cis-Golgi-Netzwerk zu finden ist. Ausserdem ist es in vesikulären Strukturen axonaler Wachstumskegel und Verzweigungspunkten zu finden. Atlastin ist ein integrales Membranprotein mit zwei Transmembrandomänen. Sowohl C-Terminus, als auch der GTP-bindende N-Terminus

liegen auf cytoplasmatischer Seite. Atlastin kann Oligomere bilden, in vivo kommt es in der Regel als Tetramer vor. Man vermutet für Atlastin entweder eine Rolle in der Golgi-Membrandynamik oder im Transport und zellulären Verkehr synaptischer Vesikel (*vesicle trafficking*).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Der erste Teil des Projektes umfasst die Arbeit mit den neuen Proteinen *leucin zipper domain protein*, *WD and FYVE domain containing 1 isoform 1* und *testis-specific adriamycin sensitivity protein*. Ziel ist es, möglichst genaue Lokalisationsdaten zu erhalten, so dass eventuell Hypothesen zur Funktion der Proteine aufgestellt werden können. Für die Realisierung werden die proteincodierenden Sequenzen in einen geeigneten Expressionsvektor kloniert. Nach Transfektion von CHO-Zellen mit den entsprechenden Konstrukten soll eine immunocytochemische Analyse der transfizierten Zellen erfolgen, wobei sowohl Einzelfärbungen, als auch Doppelfärbungen durchgeführt werden sollen. Eine Western Blot Analyse soll als Kontrolle dienen. Um möglichst genaue Daten zur Lokalisation der neuen Proteine zu erhalten, sollen einige ausgewählte Präparate zusätzlich mittels konfokaler Lasermikroskopie analysiert werden.

Der zweite Teil des Projektes umfasst die Arbeit mit den Proteinen Atlastin und DKFZp761B107, einem potentiellen Interaktionspartner von Atlastin. Die proteincodierenden Sequenzen dieser beiden Proteine befinden sich bereits in geeigneten Expressionsvektoren. Für Atlastin liegen bereits Daten vor (siehe Abschnitt 1.5). Diese sollen durch Untersuchungen an CHO-Zellen und PC12-Zellen überprüft werden. Immunocytochemische Analysen von rekombinant exprimiertem Atlastin und DKFZp761B107 in CHO-Zellen sowie von endogen exprimiertem Atlastin in ausdifferenzierten PC12-Zellen sollen diesem Zweck dienen. Auch hier sollen Einzel- und Doppelfärbungen gemacht werden und die Proteine zusätzlich durch eine Western Blot Analyse detektiert werden. Ausserdem soll durch eine Doppeltransfektion die Kollokalisierung von Atlastin und dem Interaktionspartner von Atlastin gezeigt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Steriles Arbeiten

Die molekularbiologischen Arbeiten umfassen die Methoden zur Klonierung der neuen Proteine. Wird mit Bakterien gearbeitet, sollte auf steriles Arbeiten geachtet werden, um Kontaminationen mit anderen Mikroorganismen (Bakterien, Pilze, Hefen) zu vermeiden. Um dies zu gewährleisten, werden Gefäße, Pipettenspitzen und sonstige Gegenstände mit Heissluft (3h 180°C) sterilisiert, Arbeitsflächen mit 70% Ethanol gereinigt und Lösungen sowie Nährmedien für 20 min bei 121°C autoklaviert und mit Antibiotika versetzt. Ausserdem werden die Arbeiten neben einem Bunsenbrenner durchgeführt.

2.1.2 Herstellung von Nährmedien

Folgende Nährmedien werden benötigt.

LB-Agar, pH 7,5

1% Casein

0,5% Hefeextrakt

0,5% NaCl

1,5% Agar

100 µg/ml Ampicillin

Nach dem Autoklavieren wird zunächst gewartet, bis das Medium eine für die Haut erträgliche Temperatur erreicht hat und erst dann kann das hitzeempfindliche Ampicillin zugegeben werden. Vor dem Erstarren des Mediums wird dieses in Petrischalen gegossen.

LB-Medium, pH 7,5

1% Casein

0,5% Hefeextrakt

0,5% NaCl

100 µg/ml Ampicillin

Auch hier wartet man mit der Ampicillin-Zugabe nach dem Autoklavieren, bis die Temperatur etwas heruntergekühlt ist.

SOB-Medium

2% Casein

0,5% Hefeextrakt

10 mM NaCl

2,5 mM KCl

10 mM MgSO₄

SOC-Medium

2% Casein

0,5% Hefeextrakt

10 mm NaCl

2,5 mM KCl

10 mM MgSO₄

20 mM Glucose

Sowohl die MgSO₄-, als auch die Glucose-Lösung werden sterilfiltriert und nach dem Autoklavieren hinzugegeben.

Im Umgang mit den Nährmedien ist neben dem Autoklavieren und der Antibiotika-Zugabe auch auf die restlichen Maßnahmen zur Gewährleistung der Sterilität (siehe Abschnitt 2.2.1) zu achten.

2.1.3 Anzucht von Bakterien

2.1.3.1 Animpfen von Flüssigkulturen

Um eine Minikultur zu erhalten, werden 5 ml Medium mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

Um eine Grosskultur anzuimpfen, werden etwa 200 ml LB-Medium mit etwa 2 ml einer Minikultur versetzt und für etwa 8 h unter Schütteln bei 37°C inkubiert.

2.1.3.2 Ausplattieren von Flüssigkulturen

Es wird eine bestimmte Menge der Bakteriensuspension auf eine LB-Agar-Platte gegeben. Anschliessend wird mit einem Drigalsky-Spatel eine kreisende Bewegung ausgeführt, bis die Bakterienlösung vollständig in das Medium eingedrungen ist. Die Platten werden über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.1.4 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Eine Minikultur des Stocks *E.coli* XL10 Gold wird mit 5 ml SOB-Medium mit einer Impföse angeimpft. Nach Inkubation bei 37°C im Brutschrank wird daraus eine Gross-

kultur angeimpft, indem 2 ml der Minikultur auf 200 ml SOB-Medium gegeben werden. Man lässt die Grosskultur etwa 3-4 h wachsen und stoppt das Wachstum bei einer OD von 0,6. Zur Messung der OD wird ein Photometer benutzt. Es wird auf eine Wellenlänge von 600 nm eingestellt und mit SOB-Medium auf den Wert null eingestellt. Dann wird die eigentliche Kultur in eine Küvette pipettiert und gemessen. Beim Erreichen einer OD von 0,6 wird die Kultur für etwa 10 min auf Eis gestellt und anschließend mit 4000 rpm 15 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird in 150 ml eiskaltem 10% Glycerin resuspendiert. Es wird noch einmal unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert und das Pellet erneut in 150 ml eiskaltem 10% Glycerin resuspendiert. Ein letztes Mal wird unter denselben Bedingungen zentrifugiert und das Pellet in so wenig wie möglich eiskaltem 10% Glycerin resuspendiert. Die Kultur wird à 70-100 µl in vorgekühlte Eppendorfggefäße aliquotiert, in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.1.5 Herstellung RbCl₂-kompetenter Bakterien

Es wird eine 2 ml-Kultur des *E.coli*- Stammes DH5α angeimpft. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht wird daraus eine 0,5-1%ige 100 ml-LB-Kultur angeimpft (500-1000 µl der 2 ml-Kultur). Man lässt die 100 ml-Kultur etwa 3 h wachsen bis eine OD von 0,45-0,5 erreicht ist und stellt sie anschliessend für 10 min auf Eis. Die Kultur wird mit 3400 rpm bei 0°C für 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 7,5 ml eiskaltem TFBI- Puffer resuspendiert, 1 h auf Eis inkubiert und mit 4300 rpm bei 0°C für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wird in 2 ml eiskaltem TFBII- Puffer resuspendiert. Die Kultur wird à 100 µl in vorgekühlte Eppendorfggefäße aliquotiert, in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.1.6 Plasmidpräparation durch alkalische Lyse

2.1.6.1 Minipräparation

Für Plasmidpräparationen aus Minikulturen (Minipräparationen) wird das Kit E.Z.N.A. Plasmid Minipröp Kit I der Firma Peqlab verwendet. Es basiert auf alkalischer Lyse.

Es werden etwa 1,5 ml einer Minikultur mit 4000 rpm bei RT 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet mit 250 µl der Lösung I resuspendiert. Lösung I enthält EDTA und RNAsen und muss daher immer kalt gestellt werden. EDTA komplexiert zweiwertige Kationen (Mg^{2+} , Ca^{2+}) die essentiell für die Stabilität der Bakterienzellwand sind; RNAsen beseitigen eventuelle Kontaminationen durch RNA. Anschliessend werden die Bakterien mit 250 µl der Lösung II lysiert. Dies geschieht durch NaOH (denaturiert DNA und Proteine) und SDS (löst die Phospholipid- und Proteinkomponenten der Zellwände). Hierbei ist eine Inkubationszeit von 1 min bei RT nach dem Mischen durch invertieren sehr wichtig, da möglichst viel Plasmid- DNA und möglichst wenig chromosomale DNA freigesetzt werden und die Plasmid- DNA nicht irreversibel denaturiert werden soll. Es sollte sich ein klares Lysat bilden. Nach 1 min wird das Gemisch mit 350 µl von Lösung III (Kaliumacetatpuffer) neutralisiert. Dies geschieht erneut durch invertieren. Es bildet sich ein weisses Präzipitat, welches aus Kaliumdodecylsulfat und Proteinen, chromosomaler DNA und bakteriellen Zellresten besteht. Das Präzipitat wird mit V_{max} bei RT für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wird nochmals zentrifugiert und das Pellet erneut verworfen. Der Überstand wird auf die Anionenaustauschersäule (DEAE) geladen und es wird 1 min bei V_{max} zentrifugiert: Die DNA bindet bei niedrigen Salzkonzentrationen. Die Säule wird mit 500 µl Hb- Puffer und mit 700 µl Waschpuffer gewaschen (beide hohe Salzkonzentrationen) um Spuren von RNA und Proteinen zu entfernen. Zum Schluss wird die gebundene Plasmid- DNA mit 50-100 µl Elutionspuffer (noch höhere Salzkonzentration) gelöst.

2.1.6.2 Maxipräparation

Für Plasmidpräparationen aus Grosskulturen (Maxipräparationen) wird das Kit „Nucleobond AX500“ der Firma Macherey-Nagel verwendet. Es basiert auf alkalischer Lyse.

Die Bakterien werden mit 5500 rpm bei 4°C für 20 min zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 12 ml von Lösung I (enthält EDTA und RNAsen: kalt stellen!) vorsichtig resuspendiert. Dabei ist wichtig, die Bakterien möglichst schonend zu pipettieren. EDTA komplexiert zweiwertige Kationen (Mg^{2+} , Ca^{2+}) die essentiell für die Stabilität der Bakterienzellwand sind; RNAsen beseitigen eventuelle Kontaminationen durch RNA.

Es werden 12 ml von Lösung II zugegeben und 6-8x invertiert (nicht vortexen, da sonst chromosomale DNA freigesetzt werden könnte!), wodurch die Bakterien lysiert werden. Lösung II enthält NaOH (denaturiert DNA und Proteine) und SDS (löst die Phospholipid- und Proteinkomponenten der Zellwände). Hierbei ist eine Inkubationszeit von maximal 5 min bei RT nach dem Mischen durch invertieren sehr wichtig, da möglichst viel Plasmid- DNA und möglichst wenig chromosomale DNA freigesetzt werden und die Plasmid- DNA nicht irreversibel denaturiert werden soll. Nach Zugabe von 12 ml der Lösung III (Kaliumacetatpuffer → kalt stellen!) wird erneut 6-8x invertiert bis eine homogene Suspension entsteht und dann 5 min auf Eis inkubiert. Es bildet sich ein weisses Präzipitat, welches aus Kaliumdodecylsulfat, Proteinen, chromosomaler DNA und bakteriellen Zellresten besteht. Das Präzipitat wird mit 8500 rpm bei 4°C 10 min abzentrifugiert. Der Überstand (Lysat) wird solange filtriert, bis die Lösung klar ist. Bevor das Lysat auf die Säule gegeben wird, wird diese 2x mit 6 ml von Lösung N2 äquilibriert. Nach der Adsorption der Plasmid- DNA an die Säule (geschieht bei niedrigen Salzkonzentrationen) wird 2x mit 16 ml von Lösung N3 gewaschen (geschieht unter hohen Salzkonzentrationen). Dabei werden Spuren von RNA und Proteinen entfernt. Mit 15 ml von Lösung N5 wird die Plasmid- DNA schliesslich eluiert (geschieht unter noch höheren Salzkonzentrationen). Anschliessend wird mit 0,7-0,8 Volumen Isopropanol für 30 min gefällt, mit 10.000 rpm (bei mehr bekommen die Falcon- Gefässe Risse) bei 4°C für 30-48 min zentrifugiert. Das DNA- Pellet wird mit 20 ml 75% Ethanol für 15 min bei RT gewaschen und nochmals unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das Pellet wird luftgetrocknet und in 50-100 µl resuspendiert.

2.1.7 DNA-Konzentrationsbestimmung

2.1.7.1 Konzentrationsbestimmung über ein Agarosegel

Diese Methode basiert auf der Mengenabschätzung von Bändern im Agarosegel. Aufgetragen wird ein Marker mit Bändern definierter DNA-Menge und DNA-Größe, sowie die zu bestimmende DNA-Lösung in verschiedenen Verdünnungen. Ein Band des Markers, das sich gut eignet, dient als Referenz. Dieses wird mit den Bändern der ver-

dünnten DNA verglichen und so die Konzentration der unverdünnten DNA-Lösung möglichst genau abgeschätzt.

2.1.7.2 Photometrische Messung

Diese Technik basiert auf der Absorption der Purine und Pyrimidine bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die zu bestimmende DNA-Lösung wird 1:400 verdünnt. Das Photometer wird als erstes mit Wasser auf den Wert Null eingestellt. Dann wird das Absorptionsmaximum der 1:400 Verdünnung gemessen. 1 OD entspricht 50 ng/µl.

2.1.8 Transformation

2.1.8.1 Elektroporation

Bei der Elektroporation werden die Zellen mit einem kurzen elektrischen Puls versetzt, wodurch sie für kurze Dauer permeabel werden und die DNA in die Zelle diffundieren kann.

Man taut die benötigten Zellaliquots elektrokompenter *E.coli*'s auf Eis auf und denaturiert den Ligationsansatz für 10 min bei 65°C, um die Ligase von der DNA zu entfernen. Diese könnte sonst die Transformationseffizienz herabsetzen. Dann werden 1 µl Ligationsansatz, 9 µl eiskaltes 10% Glycerin und 70 µl Bakteriensuspension zusammenpipettiert und kurz geschnickt, um Luftblasen zu entfernen. Alles wird auf Eis gelagert und pipettiert. Der Ansatz wird in eine Küvette pipettiert und mit folgenden Parametern elektroporiert: 1,4 kV; 50 µF; 125 Ω. Die Pulsdauer sollte bei 3-4 ms liegen. Wichtig ist, dass man direkt nach dem Puls 1 ml 37°C warmes SOC- Medium zugibt und resuspendiert. Die Zellen werden in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 37°C für 45-120 min inkubiert. Zwischendurch sollte man sie schwenken, da sich die Zellen sonst absetzen. Die Bakterien werden in variablen Volumina auf Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert und für 12-16 h bei 37°C inkubiert.

2.1.8.2 Hitzeschock

Durch einen Hitzeschock werden Bakterien für kurze Dauer für die Fremd-DNA permeabel. Diese kann in die Zelle hinein diffundieren.

100 µl kompetente Zellen werden für 15 min auf Eis aufgetaut. 10 µl des Ligationsansatzes werden zu den Zellen pipettiert (vorsichtig mischen!). Der Ansatz wird für 20 min auf Eis gestellt. Der Hitzeschock erfolgt für 1 min bei 42°C. Der Transformationsansatz wird für 2 min auf Eis gestellt und anschliessend in 900 µl vorgewärmtes LB-Medium überführt. Zur Regeneration werden die Zellen für 30 min bei 180 rpm und 37°C inkubiert. Die Bakterien werden in variablen Volumina auf Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert.

2.1.9 Sequenzierung

Mit der Sequenzierung von DNA-Molekülen wird die Firma SRD beauftragt. Man braucht hierfür etwa 1 µg DNA mit den entsprechenden Primern, sowie ein Formular, das man sich auf der Homepage der Firma herunterladen kann. Für die Sequenzierung sollte man mit 1-2 Tagen rechnen, je nach Andrang.

Der zu analysierende Bereich wird von beiden Sequenzenden ansequenziert, da die ersten 15-20 Basen relativ unsicher sind. Die Sequenzierung selbst basiert auf einem gelgestützten Verfahren nach Erzeugung basenspezifisch endender DNA-Populationen, die in einer nachfolgenden denaturierenden Polyacrylamidelektrophorese der Größe nach getrennt werden. Die Beendigung der Synthese des in die Reaktion gegebenen Stranges wird hierbei durch Zufügen von Didesoxynucleotiden erreicht, deren Einbau in die DNA zu einem Kettenabbruch aufgrund der fehlenden 3'OH-Gruppe führt.

2.1.10 Agarosegel- Elektrophorese

Die Agarosegel- Elektrophorese dient der Auftrennung von Nucleinsäuren verschiedener Größen. Je nach Größe der zu trennenden Fragmente können Gele mit verschiedener Agarosekonzentration hergestellt werden. Die Agarose wird zunächst in 0,5x TBE-Puffer (50 mM Tris, 41,5 mM Borsäure, 0,5 mM EDTA) durch Erhitzen gelöst. Man

setzt dann 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zu (Vorsicht, Ethidiumbromid ist hitzeempfindlich!) und giesst die Mischung in eine Gelkammer. Als Elektrophoresepuffer wird 0,5x TBE-Puffer mit 1 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Die DNA wird vor dem Beladen der Taschen mit Ladepuffer (50% Glycerin, 10 mM EDTA pH 8, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol FF) versetzt. Dieser wird 1fach eingesetzt. Die DNA wird bei 75-120 mA aufgetrennt. Da die aromatischen Ringe des Ethidiumbromids an die heteroaromatischen Ringe der Basen der Nucleinsäure binden, was zu einer Verstärkung der Fluoreszenz im Vergleich zur Hintergrundfärbung des Gels führt, können die DNA-Bänder auf einem UV-Tisch durch Anregung des Ethidiumbromids bei 254-366 nm und Emission bei 590 nm sichtbar gemacht werden.

2.1.11 DNA- Isolation aus Agarosegelen

2.1.11.1 DNA- Isolation aus Agarosegelen mit Glasmilch

Für die DNA-Isolation aus Agarosegelen mit Glasmilch wird das DNA-Isolation Kit der Firma Appli Chem verwendet.

Das Band wird aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Es wird ½ Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5.2) und 4,5 Volumen NaI zu dem Gelstück gegeben. Die Endkonzentration des NaI sollte 4 M sein. Der Ansatz wird für 2-5 min bei 55°C inkubiert, kurz gemischt und für weitere 1-2 min bei 55°C gelassen. Zu diesem Zeitpunkt sollte die Agarose komplett gelöst sein. Zu der Agarose : DNA : NaI Lösung wird die Glasmilch-Suspension gegeben. Es werden 6 µl für die ersten 2 µg DNA und ein zusätzlicher µl für jedes weitere ½ µg DNA eingesetzt. Der Ansatz wird gut gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, wobei alle 1-2 min gemischt werden sollte. Fragmente, die größer als 1000 bp sind, werden bei 55°C inkubiert, um die Bindungseffizienz der DNA an die Glasmilch zu erhöhen. Bei maximaler Geschwindigkeit wird dann die beladene Glasmilch für 10 sec abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Glaspellet wird mit Waschpuffer gewaschen. Dabei wird das 50fache Volumen der ursprünglich eingesetzten Glasmilch appliziert. Beim Resuspendieren des Glaspellets sollte vorsichtig pipettiert werden (besonders bei Fragmenten die größer als 15 kb sind!). Der Waschschrift wird mindestens zwei Mal wiederholt. Nachdem der Über-

stand das letzte Mal entfernt wurde, wird noch mal zentrifugiert und soviel wie möglich von dem Waschpuffer entfernt. Um die DNA zu eluieren, wird das Pellet mit sterilem destilliertem Wasser oder TE-Puffer (10 mM Tris pH 7,5-8,0; 1 mM EDTA) suspendiert und für 3-5 min unter gelegentlichem Mischen inkubiert. Der Ansatz wird für 30-45 sec bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert um die Glasmilch von der DNA zu trennen. Im Überstand befindet sich die DNA. Die Ausbeute kann durch erneute Elution um 10-15% gesteigert werden.

2.1.11.2 DNA- Isolation aus Agarosegelen über eine Säule

Für die DNA-Isolation aus Agarosegelen über eine Silicamembran wird das Kit Nucleo Spin Extract II verwendet.

Zunächst werden die Bänder mit einem sauberen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und das Gewicht der Gelstücke bestimmt. Für jede 100 mg werden 200 µl NT Puffer hinzu gegeben. Bei mehr als 2% igen Gelen wird die doppelte Menge NT Puffer appliziert. Der Ansatz wird für 5-10 min bei 50°C inkubiert, wobei alle 2-3 min gevortext werden sollte bis sich die Gelstücke komplett aufgelöst haben. Eine Nucleo Spin Extract II- Säule wird in ein Sammelgefäß gesteckt, mit der Lösung beladen, und anschliessend für 1 min bei 11 000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und die Säule erneut in das Sammelgefäss gesteckt. Um die DNA zu waschen, werden 600 µl NT3 Puffer auf die Säule gegeben und der Ansatz abermals für 1 min bei 11 000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Die Silicamembran wird dann getrocknet. Hierzu wird für 2 min bei 11 000 g zentrifugiert. Es ist darauf zu achten, dass die Säule beim Herausnehmen aus dem Sammelgefäss nicht mit dem Durchfluss in Kontakt kommt. Um restliches Ethanol des NT3 Puffers zu entfernen, wird die Säule für 2-5 min bei 70°C inkubiert. Dies ist wichtig, da das Ethanol Folgereaktionen inhibieren könnte. Für die Elution wird die Säule in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 15-50 µl Elutionspuffer beladen. Der Ansatz sollte für 1 min bei RT inkubiert und schliesslich ein letztes Mal für 1 min bei 11 000 g zentrifugiert werden. Die Ausbeute größerer Fragmente (>5-10 kb) kann durch die Verwendung von vorgewärmtem Elutionspuffer (70°C) gesteigert werden.

2.1.12 Polymerase- Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der Amplifikation von DNA-Abschnitten.

Eine PCR besteht aus einer variablen Anzahl an Zyklen. Jeder Zyklus wiederum besteht aus drei Temperaturstufen. Die erste Stufe dient der Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 94°C. Die Dauer der ersten Denaturierungs-Temperatur wird etwas länger als für die folgenden Zyklen gewählt, da die DNA zu Beginn der Reaktion eine komplexe Struktur aufweist. Hierbei ist Trennung von GC-reichen Abschnitten als besonders kritisch zu betrachten. Die zweite Stufe liegt deutlich unter der ersten und ermöglicht den Primern sich an die DNA anzulagern (Annealing). Die Annealing-Temperatur ist entscheidend für die Spezifität der PCR. Sie kann auch in einer Reaktion von Zyklus zu Zyklus variieren. Beispielsweise können die ersten Zyklen eine Annealing-Temperatur von 60°C bedeuten, die folgenden Zyklen nur 57°C und die letzten Zyklen nur 54°C. Eine PCR mit einer solchen Staffelung wird Touch-Down-PCR genannt. In der dritten Stufe wird die Temperatur wieder erhöht, um der Polymerase optimale Bedingungen für die Synthese des Stranges zu bieten. Sie ist spezifisch für die eingesetzte Polymerase. Sowohl die *Pfu*-, als auch die *Taq*-Polymerase arbeiten optimal bei einer Temperatur von 70-75°C. Ausserdem besitzt die *Pfu*-Polymerase neben ihrer 5'-3'- Polymerasefunktion noch eine 5'-3'- Exonuleasefunktion, welche es ihr erlaubt fehlerhaft eingebaute Nukleotide zu entfernen und durch korrekte zu ersetzen (proofreading-Funktion). In Tabelle 1 sind alle für eine PCR benötigten Komponenten und ihre eingesetzten Mengen in einer Übersicht dargestellt.

Volumen	Komponente	Endkonzentration
2 µl	10 mM each dNTP-Mix	200 µM
3 µl	10 µM forward Primer	300 nM
3 µl	10 µM reverse Primer	300 nM
x µl	DNA	
10 µl	10x Reaktionspuffer	1x
ad 98 µl	MilliQ-Wasser	
2 µl	Pwo-Polymerase	2 U

Tabelle 1: Zusammenstellung aller für eine PCR benötigten Komponenten

Als erstes wird das Programm programmiert und dann der Ansatz auf Eis zusammenpipettiert. Die Polymerase wird erst zugegeben, wenn der Block auf 94°C vorgeheizt ist, um unspezifische Amplifikationen zu verhindern. Dieses Verfahren wird *Hot-Start* genannt. Man kann eine so genannte Gradienten-PCR durchführen, um einen Temperaturabschnitt (Bsp. 50-60°C) für das Annealing zu testen. Dazu muss man dem Programm den Anfangs- und Endpunkt des Gradienten angeben. Dieser wird automatisch über den Heizblock von links nach rechts gesetzt. Das Verfahren ist auch für eine *Touch-Down* PCR möglich.

2.1.13 Präzipitation von DNA

Die Fällung von DNA wird mit Ethanol und Natriumacetat (5 M, pH 5,2-5,5) durchgeführt. Bei der Wahl des Salzes gibt es allerdings verschiedene Möglichkeiten. Ausser Natriumacetat eignen sich auch Ammoniumacetat, Lithiumchlorid und Natriumchlorid. Es werden 1/10 Volumen der Salzlösung und 2,5 Volumen Ethanol nacheinander zugegeben und gemischt. Der Ansatz wird nun entweder auf Eis oder bei -20°C für 15-30 min oder länger gelagert. Die gefällte DNA wird für 5 min bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert. Handelt es sich um geringe Mengen oder kleinere Fragmente, sollte der Zentrifugationsschritt 15 min betragen. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 1 ml 70% Ethanol (mit nucleasefreiem Wasser hergestellt!) gewaschen. Es wird noch mal für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wird in nucleasefreiem destilliertem Wasser resuspendiert.

Liegt die zu präzipitierende DNA in einem sehr großen Volumen vor (mehr als 500 µl), so kann auch mit Isopropanol gefällt werden, da nur das einfache Volumen eingesetzt wird. Die Zugabe einer Salzlösung ist in diesem Fall nicht nötig.

2.1.14 Direkte Aufreinigung von PCR-Produkten über eine Silicamembran

Diese Art der Aufreinigung wird mit dem Kit *Nucleo Spin Extract II* der Firma Macherey-Nagel durchgeführt.

Damit die DNA an die Silicamembran binden kann, wird ein Volumen der Probe mit zwei Volumen NT Puffer gemischt. Man steckt eine Säule in ein Sammelröhrchen. Damit die DNA binden kann, wird die Säule nun mit der Probe beladen und 1 min bei 11.000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und die Säule zurück in das Sammelröhrchen gesteckt. Um die Säule zu waschen, wird diese mit 600 µl NT3 Puffer beladen und erneut 1 min bei 11.000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und die Säule zurück in das Sammelröhrchen gesteckt. Die Silicamembran wird nun getrocknet, indem sie für 2 min bei 11.000 g zentrifugiert wird. Die Säule wird dann für 2-5 min bei 70°C inkubiert, um restliches Ethanol zu entfernen. Beim Herausnehmen aus dem Sammelröhrchen muss darauf geachtet werden, dass die Säule nicht mit dem Durchfluss in Kontakt kommt. Anschliessend wird die Säule in ein neues Eppendorfgefäß gesteckt und die DNA mit 15-50 µl Elutionspuffer gelöst. Dazu wird abermals 1 min bei 11.000 g zentrifugiert.

2.1.15 Restriktion

Die Restriktion von DNA-Molekülen wird durch Restriktionsenzyme durchgeführt. Diese schneiden das doppelsträngige Molekül sequenzspezifisch. Für einen Restriktionsansatz benötigt man ausser einer definierten Menge DNA und einer vom Hersteller angegebenen Menge an Enzym, den entsprechenden Puffer, um optimale Bedingungen für das Enzym zu schaffen. Gewöhnlich haben diese Puffer einen pH-Wert von 7,5-8,0 und beinhalten einen Tris- Puffer, MgCl₂, NaCl oder KCl, ein Sulphydrylreagenz zur Stabilisierung des Enzyms sowie ein divalentes Kation wie Mg²⁺, das für die Enzymaktivität essentiell ist. Der Puffer liegt meist 10x vor und muss im Restriktionsansatz schliesslich 1x vorliegen. Für einen 20 µl-Ansatz nimmt man demnach 2 µl Puffer. Der Ansatz wird für mindestens 2 h bei 37°C inkubiert. Optimal sind Inkubationen über Nacht. Dies ist jedoch nur möglich, wenn das Enzym keine Staraktivität besitzt, da es die DNA sonst unspezifisch schneiden könnte. Man kann auch mit zwei verschiedenen Enzymen gleichzeitig restringieren (Doppelverdau). Dies ist allerdings nur möglich, sollte eine Puffer-Lösung vorhanden sein, in der beide Enzyme eine möglichst hohe Aktivität besitzen. Prinzipiell werden Restriktionen zur Isolierung und Identifizierung von DNA-Fragmenten eingesetzt.

Beispiel für einen Restriktionsansatz:

5 μ l DNA

1 μ l Enzym

2 μ l Puffer

12 μ l steriles destilliertes Wasser

20 μ l

2.1.16 DNA- Modifikation

2.1.16.1 Phosphorylierung von 5'- Enden

Zu klonierende DNA-Fragmente können zur Verbesserung der Ligationseffizienz nach Restriktion am 5'-Ende phosphoryliert werden. Diese Reaktion wird von der T4 Polynukleotid Kinase katalysiert. Folgende Komponenten werden in einem 20 μ l- Reaktionsansatz pipettiert: DNA (1-20 pmol), 2 μ l 10x Reaktionspuffer (liegt dann im Ansatz 1x vor), 2 μ l 10 mM ATP (Endkonzentration 1 mM), nukleasefreies Wasser (auf 19 μ l auffüllen), 1 μ l T4 Polynukleotid Kinase (10 u). Der Ansatz wird für 20 min bei 37°C, dann zur Inaktivierung des Enzyms für 10 min bei 75°C inkubiert.

2.1.16.2 Dephosphorylierung von 5'- Enden

Die Dephosphorylierung von restringierten Vektoren wird durchgeführt, um eine Religation des Vektors bei der Ligation zu verhindern. Die Dephosphorylierung am 5'-Ende wird von einem Enzym Namens CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase) katalysiert, in dem eine Phosphatgruppe abgespalten wird. Man pipettiert folgende Komponenten in einen 20 μ l- Reaktionsansatz: DNA (1-20 pmol), 5 μ l 10x Reaktionspuffer für CIAP, nukleasefreies Wasser (auf 49 μ l auffüllen), 1 μ l CIAP (10 u). Der Ansatz wird für 20 min bei 37°C, dann zur Inaktivierung des Enzyms für 15 min bei 85°C inkubiert. Die Dephosphorylierung kann auch mit der Restriktion in einem Schritt

durchgeführt werden. Hierzu wird 1 μ l (10 u) Enzym zugegeben. Der Ansatz wird anschliessend für 15 min bei 85°C inkubiert.

2.1.17 Ligation

Eine Ligation ist die kovalente Verknüpfung von DNA-Fragmenten durch Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-Hydroxylgruppe des einen Terminus und der 5'-Phosphatgruppe des anderen Terminus. Die Reaktion wird von der T4-DNA-Ligase katalysiert. Für die Ligation von proteincodierenden Insert-Sequenzen mit Vektoren sollten verschiedene molekulare Verhältnisse getestet werden. Laut Literatur gilt jedoch ein molekulares Verhältnis von Insert zu Vektor von 3:1 als optimal. Das im Reaktionspuffer enthaltene ATP ist essentiell für die Reaktion. Der Reaktionspuffer liegt 10x vor und muss im Ansatz 1x vorliegen. Der Ansatz wird mit sterilem Wasser auf 20 μ l aufgefüllt und schliesslich über Nacht bei 16°C inkubiert.

2.2 Methoden der Zellkultur

2.2.1 Steriles Arbeiten

Um Kontaminationen zu vermeiden ist beim Umgang mit eukaryotischen Zellen steriles Arbeiten essentiell. Die Versuche werden fast ausnahmslos an einer sterilen Werkbank durchgeführt, die durch eine spezielle Luftzirkulation und UV-Licht einer bestimmten Wellenlänge steril gehalten wird. Ausserdem werden alle Gegenstände und Arbeitsflächen vor Gebrauch mit 70% Ethanol desinfiziert. Lösungen werden vor Gebrauch entweder für 20 min bei 120°C autoklaviert oder bei Hitzeempfindlichkeit sterilfiltriert.

2.2.2 Nährmedien

CHO-Zellen werden in Ham's F12 Medium kultiviert. Diesem wird vor Gebrauch 10% fötales Kälberserum (FCS) sowie 50 u Penicillin und 50 μ g Streptomycin zugegeben.

PC12-Zellen werden in DMEM 15% kultiviert. Man gibt vor Gebrauch 10% Pferdeserum, 5% fötales Kälberserum und 50 U Penicillin und 50 µg Streptomycin hinzu.

2.2.3 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Die Zellen werden bei 37°C aufgetaut und in 10 ml Medium (37°C) aufgenommen. Um das DMSO, welches als Frostschutzmittel zugegeben wurde, zu entfernen, zentrifugiert man die Zellen für 5 min bei 300 g. Das Zellpellet wird vorsichtig mit 5 ml Medium (37°C) resuspendiert und in einer Kulturschale mit 20 ml Medium (37°C) ausplattiert.

2.2.4 Passagieren

Um CHO-Zellen zu passagieren wird zunächst das Medium einer 80-90% konfluenten Kulturschale entfernt und die Zellen zweimal mit PBS (37°C) gewaschen. Die Zellen werden mit 2 ml Trypsin inkubiert, um sie von der Platte zu lösen. Trypsin (37°C) entfernt die Adhäsionsverbindungen der Zellen. Zusätzlich klopft man die Schale gegen einen festen Gegenstand. Nach 2-5 min wird die Reaktion durch Zugabe von 8 ml Medium (37°C) gestoppt (Zeit sollte möglichst nicht überschritten werden!). Der Boden der Kulturplatte wird mehrfach abgespült und 1 ml in einer neuen Schale mit 20 ml frischem Medium (37°C) ausplattiert. Zur Sicherheit (falls eine Platte kontaminiert wird) sollte man immer zwei Platten kultivieren. CHO-Zellen können in der Regel bei einer 1:10 Verdünnung nach 2-3 Tagen passagiert werden, allerdings ist zu bedenken, dass es sich um lebende Zellen handelt, die nicht immer mit der gleichen Geschwindigkeit wachsen. Generell werden die Zellen täglich unter dem Mikroskop beobachtet, um den richtigen Zeitpunkt für das Passagieren abzugreifen.

PC12-Zellen werden im Prinzip auf die gleiche Weise passagiert. Da die Zellen im Gegensatz zu den CHO-Zellen nur sehr schwach am Untergrund haften, ist es auch möglich diese ohne Trypsin von der Platte zu lösen. Dies hat allerdings den Nachteil, dass man die ein oder andere Zellen nicht löst. Dadurch werden die stärker haftenden PC12-Zellen auf Dauer ausselektiert und man kultiviert die eher schwach anheftenden Zellen. Für nachfolgende Versuche ist es jedoch wichtig, dass die Zellen gut haften. Es

ist daher zu empfehlen, auch hier mit Trypsin zu arbeiten. PC12-Zellen werden üblicherweise mit einer 1:3 Verdünnung passagiert.

2.2.5 Transfektion durch Elektroporation

Unter einer Transfektion versteht man das Einbringen von Fremd- DNA in eine Zelle. Hierfür gibt es verschiedene Verfahren. Die Elektroporation ist eine physikalische Methode. Durch einen elektrischen Puls wird die Membran kurzzeitig permeabilisiert und die DNA kann hinein diffundieren. Für eine Elektroporation von CHO-Zellen benötigt man die Zellen zweier 80-90% konfluenten Kulturschalen. Diese werden mit 50 μ g DNA transfiziert. Zunächst wird das alte verbrauchte Medium abgezogen und anschliessend zweimal mit PBS (37°C) gewaschen. Pro Platte wird mit 2 ml Trypsin/EDTA- Lösung (37°C) 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Zellen durch Abklopfen von der Unterlage gelöst. Durch Zugabe von 5 ml Kulturmedium (37°C) wird die Enzymreaktion gestoppt. Mit Hilfe einer Pipette werden die Zellen suspendiert und in ein 50 ml Falcon Tube überführt. Anschliessend sollte unter dem inversen Mikroskop kontrolliert werden, ob noch Zellen auf der Platte sind. Ist dies der Fall, wird die Platte erneut mit 5 ml Kulturmedium abgespült und die suspendierten Zellen in das Falcon Tube überführt. Die Zellen werden 1200 rpm für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 10 ml Elektroporationspuffer (37°C) aufgenommen, resuspendiert und ein zweites Mal bei 1200 rpm für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wird in 800 μ l Elektroporationspuffer (37°C) resuspendiert. In eine Elektroporationsküvette wird die Plasmid- DNA vorgelegt, die Zellsuspension zugegeben und vorsichtig gemischt (schwenken) und anschliessend elektroporiert. Für die Elektroporation werden folgende Bedingungen gewählt: Widerstand = 129 Ω ; Spannung = 420 V; Kapazität = 250 μ F. Die Pulsdauer sollte ungefähr 3,5 ms betragen. Anschliessend wird die Zellsuspension in ein 50 ml Falcon Tube mit 20 ml Recovery- Medium [Kultumedium mit 3 mM EGTA, 37°C] überführt und 30 min im Brutschrank inkubiert (37°C; 5% CO₂). Dabei darf der Deckel des Tubes nicht fest verschlossen werden, damit Gasaustausch stattfinden kann. Danach werden die transfizierten Zellen bei 1100 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 4 ml Kulturmedium (37°C) resuspendiert. Die Zellsuspension wird in

eine Kulturschale gegeben, in die bereits 20 ml Kulturmedium (37°C) vorgelegt wurden und über Nacht im Brutschrank inkubiert.

2.2.6 Beschichten von Deckgläsern

Damit die Zellen haften können, müssen die Deckgläser zuvor mit Poly-D-Lysin beschichtet werden. Dies gilt sowohl für CHO-Zellen, als auch für PC12-Zellen. Dazu werden die Deckgläser unter der sterilen Werkbank auf ein Stück Parafilm gelegt. Auf jedes Deckglas werden 100 µl Poly-D-Lysinlösung (4 µg/100 µl) pipettiert. Nach 30 min werden die Deckgläser mit sterilem Reinstwasser gewaschen (dreimal 2-5 min). Nach dem Waschen werden die Deckgläser in die Kammern der *Multiwell-Plate* gelegt und trocknen gelassen.

2.2.7 Ausplattieren der Zellen

Um Zellen immunocytochemisch zu analysieren, müssen diese auf Deckgläsern ausplattiert werden. Etwa 24 h nach Elektroporation sollten transfizierte CHO-Zellen ausplattiert werden. Das Ausplattieren nicht-transfizierter PC12-Zellen verläuft prinzipiell gleich. Um sie jedoch als Modell für neuronale Zellen nutzen zu können, werden sie drei Tage vor dem Ausplattieren mit NGF (bis zu 50 ng/ml möglich) inkubiert, um sie auszudifferenzieren.

Der Kulturüberstand wird vorsichtig abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS (37°C) sehr vorsichtig gewaschen. Pro Platte wird mit 2 ml Trypsin/ EDTA- Lösung 2 min bei 37°C inkubiert und die Zellen durch Abklopfen von der Unterlage gelöst. Mit 5 ml Ham's (37°C) werden die Zellen heruntergespült und in ein 50 ml Falcon- Gefäß überführt. Die Zellen werden bei 1200 rpm für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und in 3 ml Medium resuspendiert. Anschliessend wird die Zellzahl mit Hilfe eines Hämocytometers (Neubauer-Zählkammer) bestimmt. 50 µl der Zellsuspension werden mit 50 µl Kulturmedium verdünnt. Von dieser Verdünnung werden 50 µl mit 50 µl Trypanblaulösung gemischt. Das gereinigte und leicht angefeuchtete Deckglas wird auf die Zählkammer gedrückt, dabei müssen Newtonsche Ringe entstehen, damit die Tiefe der Zählkammer richtig eingestellt ist. Danach füllt man die Zellsuspension in

die Zählkammer. Lebende Zellen werden von dem Farbstoff nicht angefärbt, sie erscheinen hell in der blauen Lösung. Tote Zellen werden blau angefärbt (nicht mitzählen). Die Neubauerkammer besteht aus neun großen Quadraten. Jedes große Quadrat hat eine Fläche von 1 mm^2 und eine Tiefe von $0,1 \text{ mm}$, das entspricht einem Volumen von 10^{-4} ml . Es werden vier große Quadrate gezählt. Die Summe der Zellen wird mit 10^4 multipliziert, daraus ergibt sich die Zellzahl/ml. Für die Immuncytochemie mit CHO-Zellen wird eine Zellsuspension mit 20.000 Zellen/ml hergestellt. Die transfizierten CHO-Zellen werden auf die beschichteten Deckgläser ausplattiert (1 ml/Kammer) und über Nacht im Brutschrank inkubiert. PC12-Zellen werden in größerer Zahl (50.000 Zellen/ml) ausplattiert, da sie weniger gut haften und so viele Zellen durch die Fixierung und die nachfolgenden Schritte der Immuncytochemie weggespült werden können. Im Gegensatz zu den transfizierten CHO-Zellen können die PC12-Zellen beliebig lange in der Multiwell-Plate bis zur Fixierung kultiviert werden. Hierbei wird das Medium alle zwei Tage gewechselt. Bei jedem Mediumwechsel muss neues NGF hinzugegeben werden. Transfizierte CHO-Zellen sollten 48 h nach Elektroporation fixiert werden, da zu diesem Zeitpunkt üblicherweise die Menge des exprimierten Fusionsproteins am höchsten ist.

2.3 Immuncytochemie

2.3.1 Fixierung der Zellen

Der Haupteffekt der allen Fixativen zu Grunde liegt, ist die Denaturierung, Präzipitation beziehungsweise Vernetzung von Proteinen und deren Seitenketten. Durch die Polymerisation wird das biologische Material bis zu einem gewissen Punkt stabilisiert und das Zellinnere wird zum Beispiel für Antikörper zugänglich. Für die Immunfärbung ist dies unerlässlich. Dieser Effekt kann durch den Einsatz von Detergenzien verstärkt werden. Die Fixierung versetzt die Zellen in einen inaktiven Zustand. Alle Strukturen der Zellen bleiben jedoch erhalten. Dies ist wichtig, um später Proteine markieren und lokalisieren zu können. Zwei verschiedene Fixierungsmethoden finden im

Rahmen meiner Arbeit Verwendung: die Methanolfixierung und die Fixierung mit Paraformaldehyd.

Für die Methanolfixierung wird zunächst das Kulturmedium von den Deckgläschen abgesaugt und die Zellen kurz mit PBS (37°C) gespült. Anschliessend wird mit -20°C kaltem absolutem Methanol fixiert (7 Minuten, bei -20°C in der Tiefkühltruhe, Pasteurpipette vorkühlen). Alle folgenden Schritte werden bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Methanol wird abgesaugt und dreimal fünf Minuten mit PBS gespült.

Bei der Paraformaldehydfixierung werden die Deckgläschen in eine neue Multi-well gelegt, kurz mit PBS (37°C) gespült und anschliessend mit 4% Paraformaldehyd in PBS für 15 min fixiert. Die Zellen werden dann drei mal 5 min mit PBS gewaschen und für 20 min mit 0,1 % Triton X-100 permeabilisiert.

Nach der Fixierung können die CHO-Zellen bei 4°C wenige Tage zwischengelagert werden. Bei PC12-Zellen besteht die Gefahr, dass sich die ohnehin bereits schlechthaftenden Zellen lösen und weggespült werden. Alle weiteren Inkubationen werden in einer Petrischale durchgeführt. Generell sollte bei allen Schritten darauf geachtet werden, dass die Zellen beim Wechseln der Lösungen nicht trocken fallen.

2.3.2 Immunfärbung

Die Inkubationen werden in einer Petrischale durchgeführt. Dazu wird der Boden einer Petrischale mit Parafilm bedeckt. Die Deckgläschen werden nun auf den Parafilm gelegt und mit den Inkubationslösungen behandelt. Der hydrophobe Parafilm verhindert, dass die Inkubationslösungen von den Deckgläschen herunterlaufen. Vor der Inkubation mit dem ersten Antikörper inkubiert man für 20 min mit 5% BSA zur Blockierung unspezifischer Wechselwirkungen. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper findet über Nacht statt. Für Kolokalisationsstudien können verschiedene Erstantikörper gemeinsam appliziert werden. Vor Inkubation mit dem zweiten Antikörper wird dreimal mit PBS gewaschen und erneut für 20 min mit 5% BSA blockiert. Der Zweitantikörper wird gleichzeitig mit DAPI für 20 min appliziert. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der vor allem an AT-reiche Bereiche der DNA bindet und somit selektiv den Nukleus markiert. Bei Doppelmarkierungen erfolgt die Inkubation mit den Zweitantikörpern

nacheinander. Zwischen deren Applikation werden die Deckgläschen dreimal mit PBS gewaschen sowie für 20 min mit 5% BSA inkubiert. Die Deckgläschen werden anschliessend viermal mit PBS gewaschen und mit einem Tropfen Slow-Fading (25% Glycerin, 10% Mowiol, 2,5% DABCO, pH 8,5) eingedeckt. Nach 20 min ist das Polymer getrocknet, und die Deckgläschen können mit Lack umrandet werden.

2.3.3 Mikroskopische Analyse

Die Immunfärbungen werden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops analysiert und dokumentiert. Folgende Fluoreszenzfarbstoffe werden verwendet.

DAPI → Anregung bei 358 nm, Emission bei 461 nm

Cy3 → Anregung bei 550 nm, Emission bei 570 nm

Alexa 488 → Anregung bei 495 nm, Emission bei 519 nm

2.4 Materialien

2.4.1 Chemikalien

CyDyes	GE Healthcare
DABCO	Fluka, Neu-Ulm
DAPI	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DMEM	Invitrogen, Karlsruhe
Fetal Calf Serum	Invitrogen, Karlsruhe
Horse Serum	Invitrogen, Karlsruhe
NGF-β	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Tissue-Tek	Sakura, Zoeterwoude, Holland

Trypsin	Roche Applied Science, Mannheim
Trypsin/EDTA-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe

Alle übrigen verwendeten Chemikalien wurden bei den Firmen AppliChem (Darmstadt), Calbiochem (Schwalbach), Carl-Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Deisenhofen) und Merck (Darmstadt) bestellt. Die Puffer, Restriktionsenzyme und Größenstandards für molekularbiologisches Arbeiten stammen von MBI Fermentas.

2.4.2 Kits

DNA-Isolation Kit	AppliChem, Darmstadt
EZNA Miniprep Kit	peqlab, Erlangen
Nucleobond AX-500	Macherey-Nagel, Düren
Nucleospin Extract II	Macherey-Nagel, Düren

2.4.3 Zellen

CHO-Zellen	ATCC, Rockville, Maryland, USA
PC12-Zellen	DSMZ, Braunschweig
<i>E.coli</i> XL10 Gold	Invitrogen, Karlsruhe

2.4.4 Plasmide

pcDNA 3.1 B(-) myc/His	Invitrogen, Karlsruhe
pCMV-Sport6	RZPD, Berlin

2.4.5 Oligonucleotide

Alle Oligonukleotide wurden bei der Firma Biospring (Oberursel) bestellt.

PCR Homo Sapiens Rodgi homolog:

Forwardprimer 5'-aag cta gcc cac cat ggc cac cgt gat ggc agc g-3'

Reverseprimer 5'-taa agc ttg gga agg gtc tgt agc tcc agt-3'

PCR Mus musculus WD-repeat and FYVE domain containing 1:

Forwardprimer 5'-aag cta gcc cac cat gaa ttt tat caa gac cta-3'

Reverseprimer 5'-taa agc ttg ggt gtg gag aaa atc cag ttg c-3'

PCR Mus musculus LanC-like 2:

Forwardprimer 5'-aag cta gcc cac cat ggg cga gac cat gtc aaa-3'

Reverseprimer 5'-taa agc ttg gat cct tct gca aaa agc caa-3'

Sequenzierung Atlantin Konstrukt 1; DKFZp761B107 Konstrukt 1:

Forwardprimer 5'-agc cta ggc cgc gga cc-3'

Reverseprimer 5'-tgc ggc cgc act cga g-3'

Sequenzierung DKFZp761B107 Konstrukt 2:

Forwardprimer 5'-agc cta ggc cgc gga cc-3'

Reverseprimer 5'-tgc ggc cgc act cga g-3'

In-Fusion Dry Down PCR Homo Sapiens Rodgi homolog:

Forwardprimer 5'-gct cgg tac caa gct atg gcc acc gtg atg-3'

Reverseprimer 5'-ttg ttc tag aaa gct gaa ggg tct gta gct-3'

2.4.6 Antikörper

Erstantikörper:

α -Atlastin I (rabbit)	Dr. Georg Auburger
α -Atlastin II (rabbit)	Dr. Auburger
α -FLAG (mouse)	Sigma-Aldrich
α -HA (mouse)	Sigma-Aldrich
α -myc (mouse)	Hybridoma-Überstand
α -Synaptophysin (mouse)	Dr. Reinhard Jahn
α -Syntaxin 1 (mouse)	Synaptic Systems
α -58K Golgi (mouse)	abcam

Zweitantikörper:

α -mouse Cy3	Dianova
α -mouse Alexa 488	Molecular Probes
α -rabbit Cy3	Dianova

2.4.7 Zubehör und Geräte

Autoklav 1	Schütt
Autoklav 2	Fedegari autoclavi spa
Backofen	Ehret

Bechergläser	Witlab
Deckgläser	Roth, Karlsruhe
Digitalwaage	PB303, Mettler, Toledo, Schweiz
Electro Cell Manipulator	EMC600, BTX, San Diego
Elektrophorese Stromgerät	Microcomputer electrophoresis Power supply, Consort E443, Belgien
Elektroporationsküvetten	Ecu1011 mm, EQUIBIO, Ashford UK,; 4 mm, Peqlab, Biotechnologie GmbH
Falcongefäße	Sarstedt, Newton, USA
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Axiophot, Jena
Fotoapparat	Kodak
Gefrierschrank (-20°C)	Economic, Bosch
Gefrierschrank (-80°C)	Hera freeze, Thermoelektron Corporation, Langenselbold
Glaspipetten	Hirschmann EM techcolor, Deutschland
Glassflaschen	Schott
Heizplatte	RTC-basic, IKA Labortechnik, Staufen

Inkubator	Heraeos instruments
Inkubator steril	SteriCult incubator 200 forma Scientific inc., Ohio
Inverses Mikroskop	Axiover 200, Zeiss, Göttingen
Messzylinder	Witlab
Multi-wells	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrowelle	Alaska 900
Kulturschalen	Sarstedt, Newton, USA
Kühlschrank	Liebherr
pH-Meter	521, WTW, Weilheim
Photometer	LKB Boichrom, GE Healthcare Uppsala, Schweden
Pipetten	Pipettman, Gilson, France Reference, Eppendorf Vacu Petus 115 500 Qualilab, Beder und Hobein
Pipettenspitzen	Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hambug
Schüttler	WT12 Biometra
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Sonifier	250 Branson, Heusenstamm
Thermocycler	T-Gradient, Biometra, Göttingen

Sterile Klengen	Braun, Tüttlingen
Sterile Werkbank	Hera save, Heraeos instruments, Hanau
Thermomixer	Thermomixer comfort, Eppendorf
Tischzentrifuge	Spectrafuge Mini C1301, Labnet international inc., Woodbridge
Trichter	Witlab
UV-Tisch	Biometra, Göttingen
Vortexer	Vortex-Genie 2, scientific industries inc., New York
Wasserbad	GFL, Burgwedel 2219 Multitemp 2, LKB, Brommer
Zentrifugen und Rotoren	Centrikon H-401, Kontron instruments, Eching A.6.14 Kontron instruments, Eching Optima TLX Ultra centrifuge, Beckmann, Krefeld TLA-45, Beckmann, Krefeld Z360 K, Hermle, Wehingen, Cytosystem, Hermle, Wehingen Zentrifuge 5451C, Eppendorf, Hamburg Sigma 2K15, Rotor 12148

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung

3.1.1 Klonierungsstrategie

Die zu untersuchenden Proteine stammen aus der Ratte. Da die entsprechenden Gensequenzen nicht als Klon verfügbar waren, wurde ein humaner sowie zwei Maus-Klone der Firma RZPD verwendet.

<i>Originalprotein</i>	<i>bestellter Klon</i>
<i>Leucin zipper domain protein (Rattus norvegicus)</i>	<i>Homo sapiens Rodgi homolog (Rh-Protein)</i>
<i>WD repeat and FYVE domain containing 1 isoform 1 (Rattus norvegicus)</i>	<i>Mus musculus WD repeat and FYVE domain containing 1 (Wdfy1-Protein)</i>
<i>Testis specific adriamycin sensitivity protein (Rattus norvegicus)</i>	<i>Mus musculus LanC like-2 (Lcl2-Protein)</i>

Tabelle 2 Namen der Originalproteine und der bestellten Klone

Die drei bestellten Klone enthalten die den identifizierten Proteinen homologen Maus-, bzw. humanen Gene in dem Vektor pCMV- SPORT6. Da sich der proteincodierenden Sequenz in diesem Vektor keine genetische Information für ein Epitop zur späteren Detektion des entsprechenden Proteins anschliesst und kein Antikörper gegen das Protein verfügbar ist, müssen die Gene in einen geeigneten Expressionsvektor kloniert werden, um sie in Säugerzellen untersuchen zu können. Hierfür wird der Vektor pcDNA 3.1 B(-) myc/his gewählt. Er enthält eine *multiple cloning site*, gefolgt von der Sequenz für das myc-Epitop und einem Stopp-Codon. Mittels PCR-Amplifikation werden den codierenden Sequenzen unter Ausschluss der Stopp-Codons geeignete flankierende Schnittstellen angefügt. Die resultierenden Amplifikate, als auch der Vek-

tor pcDNA3.1 B(-) myc/his werden mit den Restriktionsenzymen *NheI* und *HindIII* geschnitten, gelelektrophoretisch aufgetrennt, aus dem Gel isoliert und miteinander ligiert.

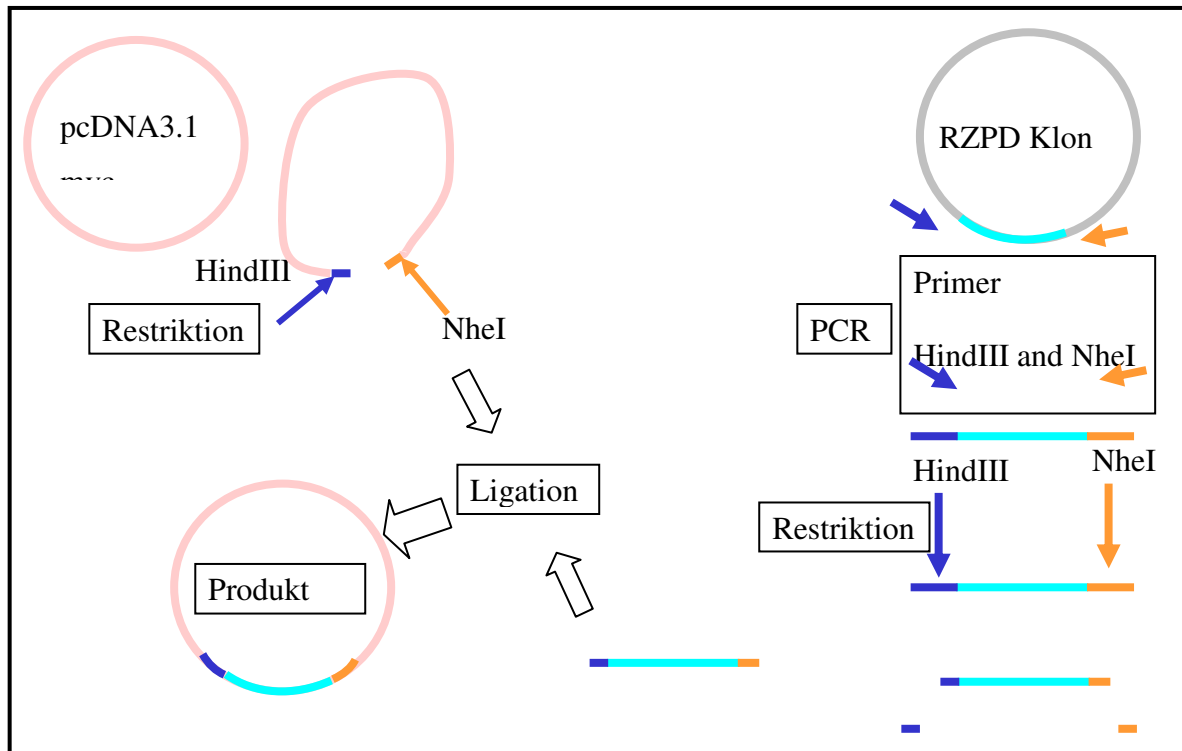


Abb. 5 Strategie zur Klonierung der drei neuen Proteine in den Expressionsvektor pcDNA 3.1 B(-) myc/his

Zur Überprüfung der Strategie werden die Klonierungen zunächst in-silico mit dem Programm *Clone Manager* durchgeführt. Die geplante Strategie mit den Restriktionsenzymen *NheI* und *HindIII* und den entsprechenden Primerpaaren konnte durch die in silico Klonierung bestätigt werden.

3.1.2 Präparation des Vektors für die Ligation

Um den Vektor pcDNA 3.1 B(-) myc/his in ausreichender Menge zu erhalten, muss dieser amplifiziert werden. Dazu werden elektrokompente *E.coli*-Bakterien des Stammes XL10-Gold mit dem Vektor mittels Elektroporation transformiert und anschliessend auf LB-Amp Platten ausplattiert. Mit den gepickten Klonen werden zunächst Minikulturen (5 ml) angeimpft, um zu überprüfen, ob die Bakterien das richtige

Plasmid enthalten. Aus diesen wird die Plasmid-DNA präpariert und analytisch mit dem Enzym *HindIII* für zwei Stunden bei 37°C restringiert. Das Restriktionsprodukt wird zur Überprüfung gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abbildung 6).

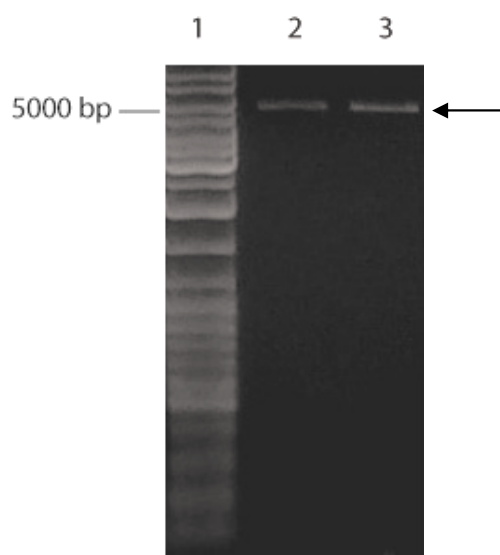


Abb. 6 Gelelektrophoretische Auftrennung des mit *HindIII* restringierten Vektors pcDNA 3.1 B(-) myc/his nach Minipräparation. (1) DNA-Marker (2) restringierte Vektor-DNA aus Minikultur 1 (3) restringierte Vektor-DNA aus Minikultur 2

Die beiden Bänder in Spur 1 und 2 im Agarosegel lassen sich als linearisierter Vektor pcDNA 3.1 B (-) myc/his identifizieren (Abbildung 6, Pfeil). Sie laufen bei einer Größe von ~5500 bp. Da die Kulturen das gewünschte Plasmid enthalten, werden nun Großkulturen (200 ml) angeimpft und die Plasmid-DNA erneut per Maxipräparation präpariert. Im letzten Schritt wird die DNA mit 100 µl sterilem MilliQ-Wasser gelöst. Zur Überprüfung werden die Produkte unverdünnt in einem Agarosegel aufgetrennt (Abbildung 7). In beiden Spuren ist der circulaire Vektor pcDNA 3.1 B(-) myc/his zu erkennen (Abbildung 7, Pfeil). In beiden Spuren ist ein sehr schwaches und ein sehr starkes Band zu sehen. Um eine definierte Menge des Vektors restringieren zu können, muss die Konzentration möglichst genau bestimmt werden. Hierfür wird eine Verdünnungsreihe hergestellt: 1:50; 1:100; 1:150; 1:200. In Abbildung 8 ist die gelelektrophoretische Auftrennung der Verdünnungsreihe der Plasmid-DNA aus Grosskultur 1 zu sehen (Pfeil). Die Konzentration der DNA aus Präparation 1 wird auf 27,6 µg/µl ge-

schätzt. Die Konzentration aus Präparation 2 wird auf 20,3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ geschätzt (nicht gezeigt). Um

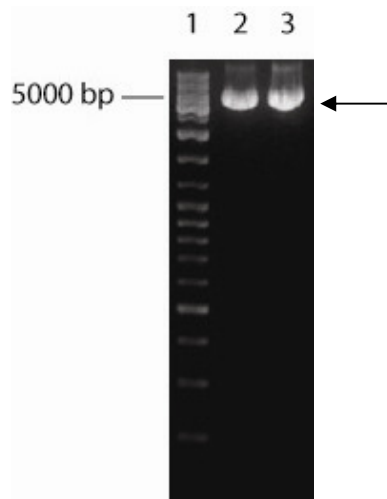


Abb. 7 Gelelektrophoretische Auftrennung des Vektors pcDNA 3.1 B(-) myc/his nach Maxipräparation. (1) DNA-Marker (2) Vektor-DNA aus Grosskultur 1 (2) Vektor-DNA aus Grosskultur 2

den Vektor später mit den Insert-Sequenzen ligieren zu können wird Vektor-DNA mit den Enzymen *NheI* und *HindIII* nacheinander restringiert. Im ersten Verdau werden 2 μg DNA mit 20 *units* des Enzyms *NheI* in dem Puffer 1x Tango bei 37°C über Nacht verdaut. Die DNA wird mit Ethanol gefällt und anschliessend mit 20 *units* des Enzyms *HindIII* erneut bei 37°C über Nacht verdaut. Um den restringierten Vektor aufzureinigen und von der entfernten Sequenz zu trennen, werden die geschnittenen Plasmide anschliessend in einem präparativen Agarosegel aufgetrennt (Abbildung 9, Pfeil) und mit Glasmilch heraus isoliert und aufgereinigt. Um später eine Religation des Vektors zu verhindern, wird dieser nun mit der alkalischen Phosphatase aus dem Kälberdarm dephosphoryliert. Für die Ligation wird die Konzentration der aufgereinigten DNA über ein analytisches Agarosegel abgeschätzt (Abbildung 10, Pfeil).

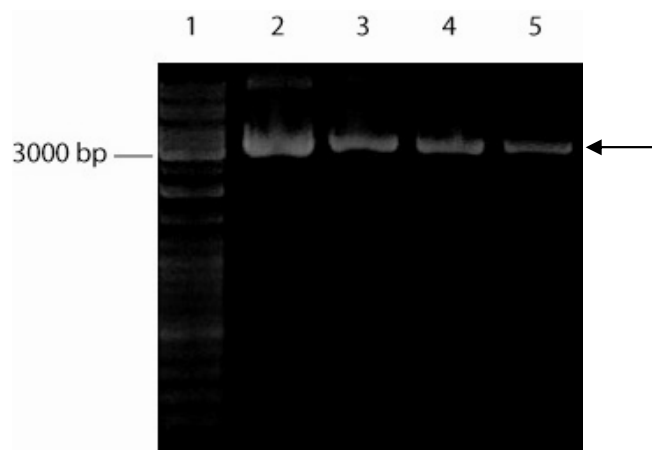


Abb. 8 Gelelektrophoretische Auftrennung einer Verdünnungsreihe des in Abbildung 2 in Spur 1 aufgetrennten circularen Vektors pcDNA 3.1 B(-) myc/his. (1) DNA-Marker (2) 1:50 (3) 1:100 (4) 1:150 (5) 1:200

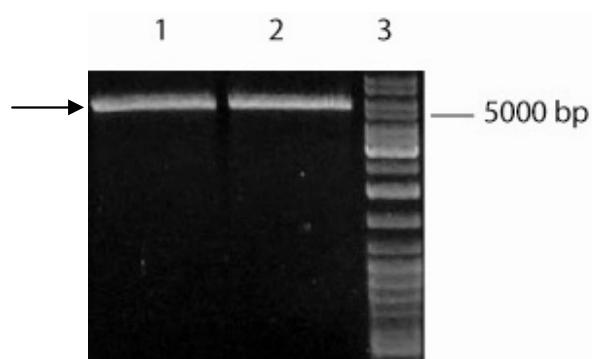


Abb. 9 Gelelektrophoretische Auftrennung des mit *NheI* und *HindIII* restringierten Vektors pcDNA 3.1 B (-) myc/his. (1) restringierter Vektor aus Präparation 1; (2) restringierter Vektor aus Präparation 2; (3) DNA-Marker

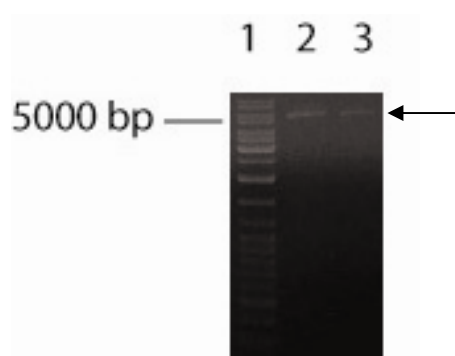


Abb. 10 Gelelektrophoretische Auftrennung des verdauten und dephosphorylierten Vektors pcDNA 3.1 B(-) myc/his vor der Ligation. (1) DNMarker; (2) restringierter Vektor aus Präparation 1; (3) restringierter Vektor aus Präparation 2

3.1.3 Präparation der Insert- Sequenzen für die Ligation

Von den drei bestellten Klonen wird zunächst eine Minikultur (5 ml) angeimpft, um zu überprüfen, ob sich das gewünschte Plasmid (pCMV SPORT6 mit entsprechender proteincodierender Sequenz) tatsächlich in den Bakterien befindet. Hierfür wird eine Plasmid-Minipräparation und eine analytische Restriktion durchgeführt. Das Produkt wird gelelektrophoretisch analysiert. Erwartungsgemäss sind die benötigten Plasmide auf dem Agarosegel zu sehen. Es wird nun für jeden Klon eine Großkultur (200 ml) angeimpft und eine Maxipräparation durchgeführt, um die Plasmide in ausreichender Menge zu erhalten. Hierbei wird die DNA im letzten Schritt mit 100 µl sterilem MilliQ-Wasser gelöst. Anschliessend wird die Konzentration über ein Agarosegel abgeschätzt. Hierzu wird eine Verdünnungsreihe hergestellt. In Abbildung 11 ist die gelelektrophoretische Auftrennung der in verschiedenen Verdünnungen aufgetragenen Plasmid-DNA des Rh-Klons zu sehen (Pfeil).

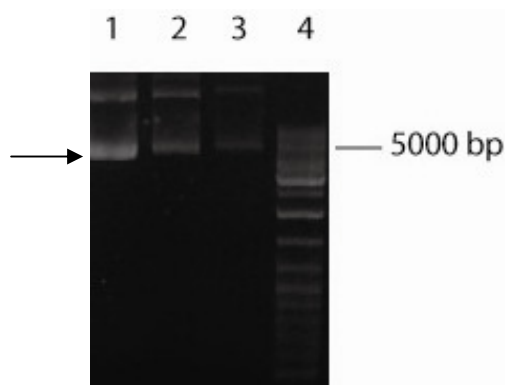


Abb. 11 Gelelektrophoretische Auftrennung einer Verdünnungsreihe der Plasmid-DNA des Rh-Klons; (1) 1:50; (2) 1:100; (3) 1:150; (4) DNA-Marker

Die DNA-Konzentrationen werden auf 7 µg/µl für Klon 1 (Rh-Protein) und 10,5 µg/µl für die beiden anderen Klone (Wdfy1-Protein und Lcl2-Protein) geschätzt (nicht gezeigt). Die aus den Großkulturen aufgereinigte Plasmid-DNA (pCMV-Sport6 mit der genetischen Information des entsprechenden Proteins) dient als Template für die PCR zur Amplifikation der drei Sequenzen. In die Forwardprimer wird eine *NheI* Schnittstelle und in die Reverseprimer eine *HindIII* Schnittstelle eingefügt. Ausserdem wird in die Forward-Primer die Translationsinitiations-Konsensussequenz CCACC zur Ver-

stärkung der Translation (Kozak, 1984) eingefügt. Das verwendete Programm ist in Tabelle 2 dargestellt.

Temperatur	Zeit	Wiederholung	Ereignis
95°C	5 min	1	Melting
95°C	30 sec	3	Melting
60°C	30 sec		Annealing
72°C	45 sec		Elongation
95°C	30 sec	3	Melting
57°C	30 sec		Annealing
72°C	45 sec		Elongation
95°C	30 sec	35	Melting
55°C	30 sec		Annealing
72°C	45 sec		Elongation
72°C	10 min	1	finale Elongation

Tabelle 2 PCR-Programm zur Amplifikation der proteincodierenden Sequenzen der neuen Proteine und Einführung von Restriktionsschnittstellen

Die verwendete *Pfu*-Polymerase hat eine *proofreading*-Funktion, welche es ihr ermöglicht, fehlerhaft eingebaute Nukleotide durch eine Exonukleaseaktivität wieder zu entfernen und anschliessend korrekt einzufügen. Die Amplifikation der proteincodierenden Insert-Sequenzen führt in allen drei Fällen zu Fragmenten, die in etwa den erwarteten Größen entsprechen (Abbildung 12): 1 und 2 (Wdfy1-Sequenz, grüner Pfeil) → ~950 bp; 3 und 4 (Rh-Sequenz, schwarzer Pfeil) → ~900 bp; 5 und 6 (Lcl2-Sequenz, roter Pfeil) → ~1300 bp. Die Ausbeute für das Lcl2-Amplifikat ist jedoch verschwin-

dend gering. Was die Sequenzen der anderenbeiden Proteine betrifft, so sind die entsprechenden Bänder zwar deutlich stärker, je

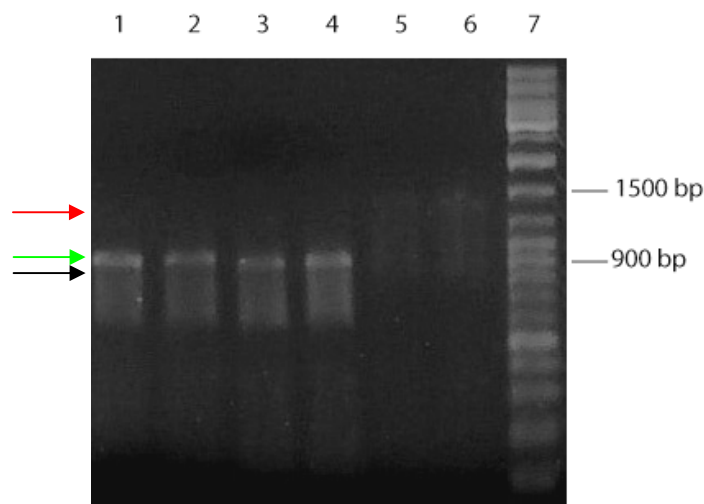


Abb. 12 Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte nach Amplifikation aller Sequenzen mittels *Pfu*-Polymerase. (1), (2) Wdfy1-Sequenz; (3), (4) Rh-Sequenz; (5), (6) Lcl2-Sequenz; (7) DNA-Marker

doch stellt auch dies kein zufrieden stellendes Ergebnis dar. Um die Ausbeute unter Erhalt der Genauigkeit der Fragmente zu optimieren, werden sowohl verschiedene PCR-Programme, als auch die *Taq*-Polymerase getestet. Die *Taq*-Polymerase besitzt keine *proofreading*-Funktion, gilt jedoch als das effizienter arbeitende Enzym.

Das Resultat mit der höchsten Ausbeute wird unter Verwendung der *Taq*-Polymerase erzielt. Allerdings entstehen unter Verwendung des obigen Programmes zunächst nur die richtigen Fragmente für die Rh-Sequenz (Abbildung 13, schwarzer Pfeil) und die Wdfy1-Sequenz (Abbildung 13, grüner Pfeil). Ausserdem fällt auf, dass in beiden Fällen weitere Produkte mit einer Größe von ca. 1600 bp entstehen. Um die Insert-Sequenz des Lcl2-Proteins erfolgreich zu amplifizieren, wird eine Temperaturgradienten-PCR unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Der Gradient für die Annealing-Temperaturen wird für 12 Ansätze von 75°C - 55°C gewählt. Das Ergebnis ist in Abbildung 14 dargestellt. Für die Ansätze 1-8 ergeben sich Fragmente der richtigen Größe (Abbildung 14, schwarze Pfeile) in ausreichender Menge. In Ansatz 9 ist zwar das richtige Produkt vorhanden, jedoch ist die entsprechende Bande sehr schwach. Ab An-

satz 10 sind Annealing-Temperaturen für das *Touch-Down*-Programm anscheinend zu niedrig, um

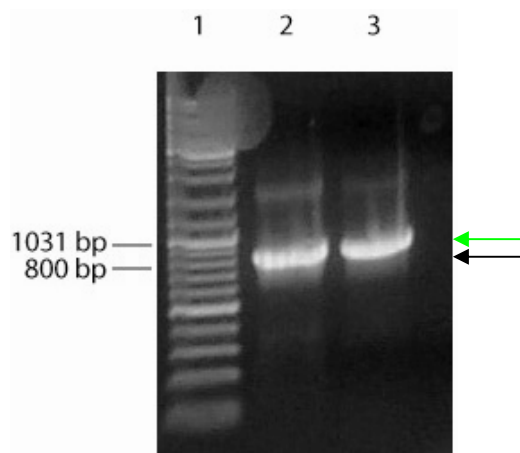


Abb. 13 Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte nach Amplifikation der Rh-Sequenz und der Wdfy1-Sequenz mittels *Taq*-Polymerase. (1) DNA-Marker, (2) Rh-Sequenz, (3) Wdfy1-Sequenz

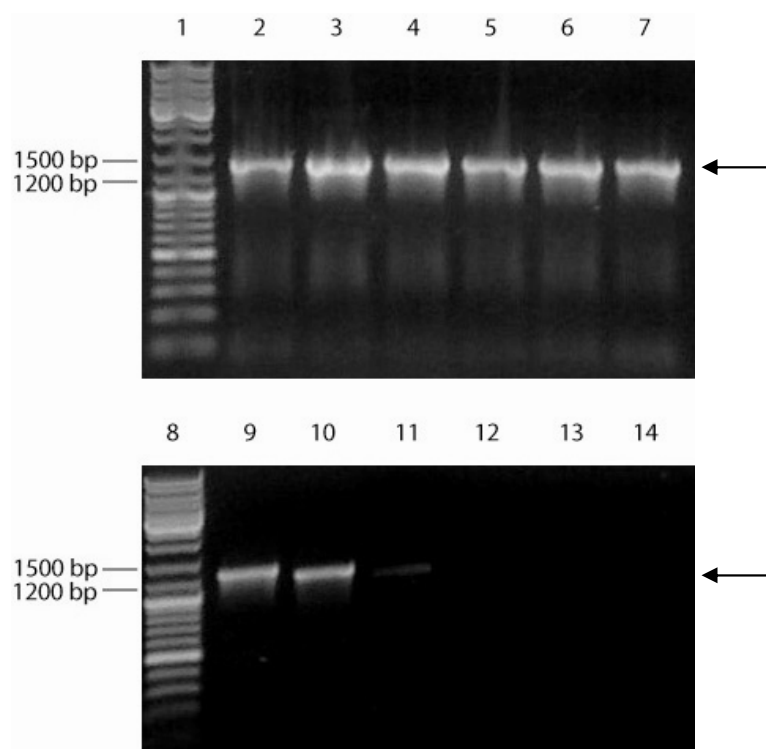


Abb. 14 Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte nach Amplifikation der Lcl2-Sequenz mittels *Taq*-Polymerase. Es wurde eine Temperaturgradienten-PCR durchgeführt: Annealing-Temperatur 75°C (Spur 1) – 55°C (Spur 12); (1), (8) DNA-Marker; (2)-(7) und (9)-(14) Lcl2-Sequenz

die Sequenz in ausreichender Form zu amplifizieren. Die Bande zu Ansatz 2 scheint am stärksten zu sein. Das entsprechende Amplifikat wird zusammen mit Produkten für die anderen Sequenzen mit Ethanol gefällt. Die DNA wird dann mit den Enzymen *NheI* und *HindIII* entsprechend dem Vektor restringiert (Doppelverdau). Es werden für die gesamte DNA je 20 units der Enzyme eingesetzt. Die Restriktionsansätze werden in einem präparativen Agarosegel aufgetrennt und über Glasmilch (DNA-Isolation Kit der Firma Appli Chem) aufgereinigt. Die DNA wird mit 24 µl eluiert. Um eine höhere Ligationseffizienz zu erzielen, werden die restringierten PCR-Produkte phosphoryliert. Um die Ligation ansetzen zu können, wird die Konzentration über ein Agarosegel abgeschätzt (Abbildung 15). Die Konzentrationen werden auf 100 ng/µl für die Wdfy1-Sequenz (Abbildung 15, grüner Pfeil), 50 ng/µl für die Lcl2-Sequenz (Abbildung 15, roter Pfeil) und 70 ng/µl für die Rh-Sequenz (Abbildung 15, schwarzer Pfeil) geschätzt. Im Vergleich dazu werden beispielsweise deutlich niedrigere Ausbeuten nach Durchführung einer Säulen-Aufreinigung (Nucleo Spin Extract II Kit der Firma Machery Nagel) aus dem Agarosegel erzielt.

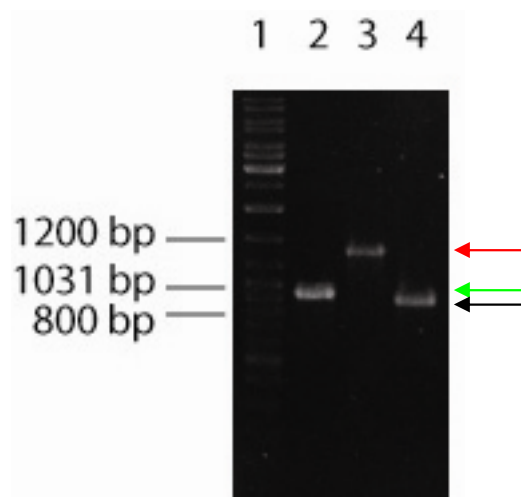


Abb. 15 Gelelektrophoretische Auftrennung der verdauten PCR-Produkte vor der Ligation. (1) DNA-Marker; (2) Wdfy1-Insertsequenz; (3) Lcl2-Insertsequenz; (4) Rh-Insertsequenz.

3.1.4 Ligation und Transformation

Für die Ligation wird ein molekulares Verhältnis von Insert zu Vektor von 3:1 getestet. Als Enzym wird die T4 Ligase verwendet. Die 20 µl-Ansätze werden über Nacht bei 16°C inkubiert. Anschliessend wird 1 µl des Ansatzes durch Elektroporation in *E.coli* transformiert. Es werden keine Klone gebildet. Daraufhin wurden die gleichen Ansätze mit Hitzeschock transformiert, jedoch gelang auch bei diesem Versuch die Klonierung nicht. Als nächstes werden sowohl Vektor, als auch Insert-Sequenzen mit den gleichen Restriktionsenzymen, jedoch einzeln restringiert, um in beiden Fällen eine Enzymaktivität von 100% zu gewährleisten. Die Dephosphorylierung des Vektors findet im Anschluss an die zweite Restriktion statt und nicht, wie zuvor, mit dem Verdau zusammen. Um die DNA jeweils für den nächsten Schritt aufzureinigen wird mit Ethanol gefällt, da hierbei deutlich weniger DNA verloren geht als durch eine Säulen-Aufreinigung. Unmittelbar vor der Ligation wird jedoch auch hier über ein präparatives Agarosegel und Glasmilch aufgereinigt. Hierbei entstehen Klone für alle drei Ligationen nach Transformation mittels Hitzeschock, nicht jedoch nach Elektroporation. Es werden insgesamt 27 Klone gepickt. Nach Anlegen von Flüssigkeits-Kulturen werden Plasmidpräparationen durchgeführt. Das Screening der Kolonien (Abbildung 16) findet nach Restriktion mit den Enzymen *SspI* und *BbsI* statt. Je Sequenz wird ein positiver Klon (Rh-Sequenz: Nummer 9 → blauer Kasten, Wdfy1-Sequenz: Nummer 18 → grüner Kasten, Lcl2-Sequenz: Nummer 21 → roter Kasten) ausgewählt und zum Sequenzieren gegeben. Hierbei werden die Klone auf Übereinstimmung mit der Originalsequenz und einen korrekten Leserahmen hin überprüft. Es stellt sich heraus, dass der Wdfy1-Klon (Abbildung 17) und der Lcl2-Klon (Abbildung 18) mit den Originalsequenzen übereinstimmen und bis zum myc-Epitop einen korrekten Leserahmen aufweisen. Die erstellten Konstrukte können daher für die Transfektion von CHO-Zellen benutzt werden. Abbildung 19 zeigt die jeweiligen Vektorkarten der erstellten Konstrukte. Klon Nummer 8 weist leider ein Stopp-Codon in der proteincodierenden Sequenz auf und kann daher nicht weiter verwendet werden (Abbildung 20).

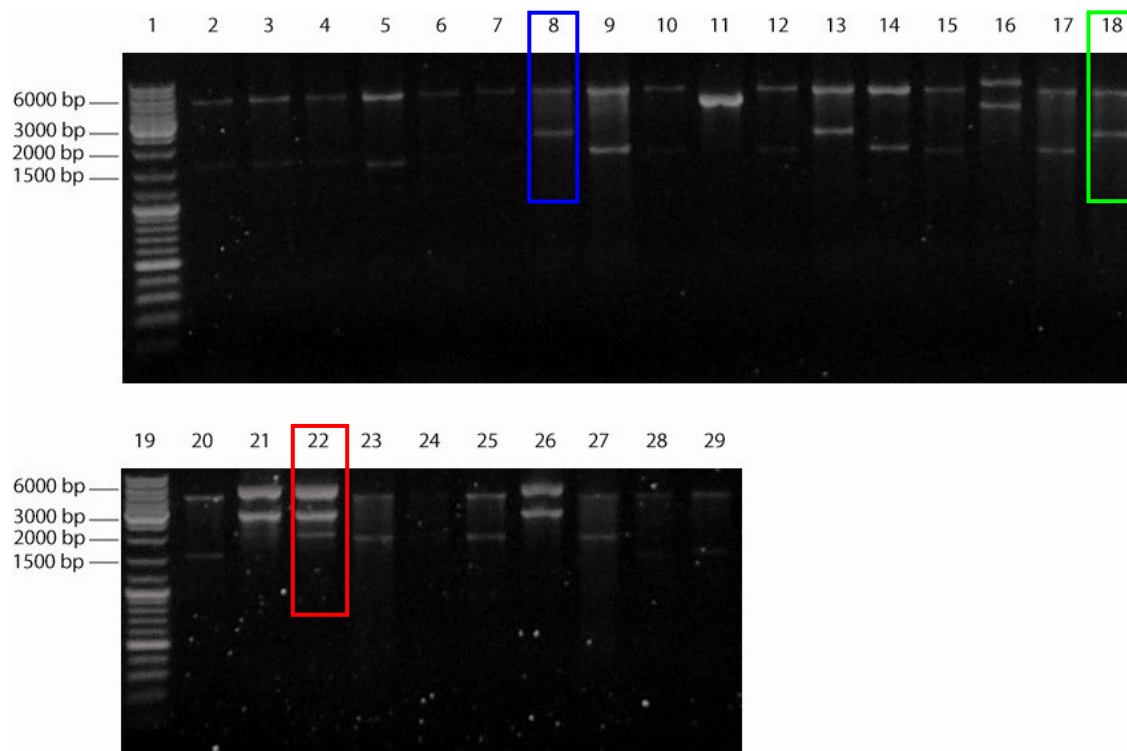


Abb. 16 Gelelektrophoretische Auftrennung der mit *SspI* und *BbsI* restringierten Klone nach Transformation in *E.coli*. (1) und (19) DNA-Marker; (2)-(11) Rh-Klone; (12)-(18) Wdfy1-Klone; (20)-(29) Lcl2-Klone.

```

901 ccaccatgaa tttatcaag acctatccag cccaccagaa cgcggtgtct gctatcatct
    >>.....ORF-1.....>
    m n f i k t y p a h g n r v s a i i
961 tcagcctgtc tgcgagtggt gtgatcagca ctggccaaga caagtgtgtg agctggatgt
    >.....ORF-1.....>
    f s l s a e w v i s t g h d k c v s w m
1021 gcaagcgcag ogggaatatg ctggcgcgc acttcttctc gtctgtggct tctgttttgc
    >.....ORF-1.....>
    c t r s g n m l g r h f f s s w a s c i
1081 agtatgatct ggacactcag cagcctttg ttggcgatta ctggggacag atcacccctgc
    >.....ORF-1.....>
    q y d l d t q h a f v g d y s g q i t l
1141 tgaagctgga gcagaacct tgttcagtta tcaagacct caagggacat gaaggtagca
    >.....ORF-1.....>
    l k l e q n t c s v i t t l k g h e g s
1201 tcgcctgcct ttggtgggac cctatccaac ggttactctt ctggggagca tccgacaaca
    >.....ORF-1.....>
    i a c l w w d p i g r l l f s g a s d n
1261 gcgtcatcat gtgggacatc gggggacgga aaggccggac actctctctt caaggccacc
    >.....ORF-1.....>
    s v i m w d i g g r k g r t l l l g g h
1321 atgacagagt gcagtcactg tgctactgc agctcacgag gcagctctgc tctgtctcgg
    >.....ORF-1.....>
    h d r v q s l c y l q l t r q l v s c s
1381 cagatgggtg cattgcagtg tggaaatgg atgttagcag agaagaggct cctcagtggt
    >.....ORF-1.....>
    a d g g i a v w n m d v s r e e a p q w
1441 tagaaagcga ctctgttcag aagtgtgagc agcccttctt ctggaatata aacagatgt
    >.....ORF-1.....>
    l e s d s c g k c e q p f f w n i k q m
1501 gggacacaaa gaccctgggc ttgaggcagc atcactgcag gaagtgtggg caggccgtct
    >.....ORF-1.....>
    w d t k t l g l r q h h c r k c g q a v
1561 gtgggaagtg cagcagcaag cggctccagtt accccgtcat gggttttgag ttccaggttc
    >.....ORF-1.....>
    c g k c s s k r s s y p v m g f e f q v
1621 gagttttgta ttctgtttac gactccatca aagatgagga cgggacttct ctagcaacat
    >.....ORF-1.....>
    r v c d s c y d s i k d e d r t s l a t
1681 ttcatgaagg aaaacataac atttccata tgtccatgga cattgcaagg ggactgatgg
    >.....ORF-1.....>
    f h e g k h n i s h m s m d i a r g l m
1741 tgacctgtgg gacagatcgt gttgtgaaga tatgggatat gactcctgtg gtgggctgca
    >.....ORF-1.....>
    v t c g t d r v v k i w d m t p v v g c
1801 gcctggcaac tggattttct ccacacccaa gctttctaga acaaaaactc atctcagaag
    >.....ORF-1.....>
    s l a t g f s p h p s f l e q k l i s e
1861 aggatctgaa tagcgcctgc gaccatcacc atcatcatca ttgagtttaa acggtctcca
    >.....ORF-1.....>>
    e d l n s a v d h h h h h h -

```

Abb. 17 Sequenzanalyse des positiven Wdfy1-Klons Nr. 18; die Proteinsequenz (grau unterlegt) bildet einen korrekten Leserahmen mit den Epitopen myc und his (beide rosa unterlegt)

```

1  ctagcccacc atgggcgaga ccatgtcaaa gagactcaag tccacctag gagaggcgga
   >>.....ORF-1.....>
   m g e t m s k r l k f h l g e a
61  gatggaggag cggtcgttcc ccaatccctt ccagactat gaagccgccc cctccgccc
   >.....ORF-1.....>
   e m e e r s f p n p f p d y e a a a s a
121 agggctcgcc gctggaagtg cggaggaaac cggccgtgtc tgcctctccc ccaccacgga
   >.....ORF-1.....>
   a g l a a g s a e e t g r v c p l p t t
181 agaccgggac ctccccttcc accctaacgg gaagattggt cccaacttca taaagcgtat
   >.....ORF-1.....>
   e d p g l p f h p n g k i v p n f i k r
241 ccagacccaa atcaaagatc tctgcagca gatggaggaa ggactgaaga cagcggaccc
   >.....ORF-1.....>
   i q t k i k d l l q q m e e g l k t a d
301 tcatgactgc tctgcatata ctggttggac aggcatagca cttttgtacc tgcagctgta
   >.....ORF-1.....>
   p h d c s a y t g w t g i a l l y l q l
361 ccgggtcact ggtgaccaga cctacctgct tgcacccctg gattactgga agagaacact
   >.....ORF-1.....>
   y r v t g d q t y l l r s l d y v k r t
421 ccgaaatttg agtggtcgca gagtcacttt cttttgtgga gatgctgggc ccttctgctg
   >.....ORF-1.....>
   l r n l s g r r v t f l c g d a g p l a
481 gggagctgtg atatatcata aactcaaaag tgaatgtgag tcccaggaat gcatacaaaa
   >.....ORF-1.....>
   v g a v i y h k l k s e c e s q e c i t
541 acttctacag atgcatagaa ctattgtctg tcaagagtca gagcttcttg atgaactgct
   >.....ORF-1.....>
   k l l q m h r t i v c q e s e l p d e l
601 gtatggacga gcaggatacc tgtatgcctt actgtacctg aacacagaga ttggccctgg
   >.....ORF-1.....>
   l y g r a g y l y a l l y l n t e i g p
661 cactgttggg gagacagcta ttaaagaggt agtcagtgtc attattgagt cgggaagag
   >.....ORF-1.....>
   g t v g e t a i k e v v s a i e s g k
721 tctatcaagg gaagaaagga aatctgagcg ctgccccctg ctctatcagt ggcacagaaa
   >.....ORF-1.....>
   s l s r e e r k s e r c p l l y q w h r
781 acaatagtgt ggagcagccc atggatggc tggcatctac tacatgctaa tgcagccaga
   >.....ORF-1.....>
   k q y v g a a h g m a g l y y m l m q p
841 agcaaaagtg gaccaagaaa ccttaaccga aatggtgaaa cccagcattg attatgtgcg
   >.....ORF-1.....>
   e a k v d q e t l t e m v k p s i d y v
901 ccataaaaaa ttccgatctg gaaattatcc atcatcatta agcaatgaaa cagatcgatt
   >.....ORF-1.....>
   r h k k f r s g n y p s s l s n e t d r
961 ggtccactgg tgccatggtg ctccaggagt catcccctg ctottacagg cataccaggt
   >.....ORF-1.....>
   l v h w c h g a p g v i h v i l q a y q
1021 ttttaaggag gaaaaatact tgaagagggc catggagtgt agcagatgta tttggcagcg
   >.....ORF-1.....>
   v f k e e k y l k e a m e c s d v i w q
1081 aggtctgctc cggaaagggt atggaatctg ccatggaacc tctggcaatg gctattcctt
   >.....ORF-1.....>
   r g l l r k g y g i c h g t s g n g y s
1141 tttgtccctt tatcgctga cgcaggataa gaagtatctc tatcgagctt gtaagtttgc
   >.....ORF-1.....>
   f i s l y r l t q d k k y l y r a c k f
1201 agagtgggtg ctgattacg gagcacatgg atgcccatt cctgacagac cttattcctt
   >.....ORF-1.....>
   a e w c l d y g a h g c r i p d r p y s
1261 ctttgaaggt atggctgggt ctgttcaact cttttctgac atcttgggtac cagagacagc
   >.....ORF-1.....>
   l f e g m a g a v h f l s d i l v p e t
1321 acggtttcca gcatttgaac ttggcttttt gcagaaggat ccaagctttc tagacaaaa
   >.....ORF-1.....>
   a r f p a f e i g f l q k d p s f l e q
1381 actcatctca gaagaggatc tgaatagcgc cgtcgaccat catcatcacc atcattgagt
   >.....ORF-1.....>
   k l i s e e d l n s a v d h h h h h h -

```

Abb. 18 Sequenzanalyse des positiven Lcl2-Klons Nr. 21. Die Proteinsequenz (grau unterlegt) bildet einen korrekten Leserahmen mit den Epitopen myc und His (beide rosa unterlegt)

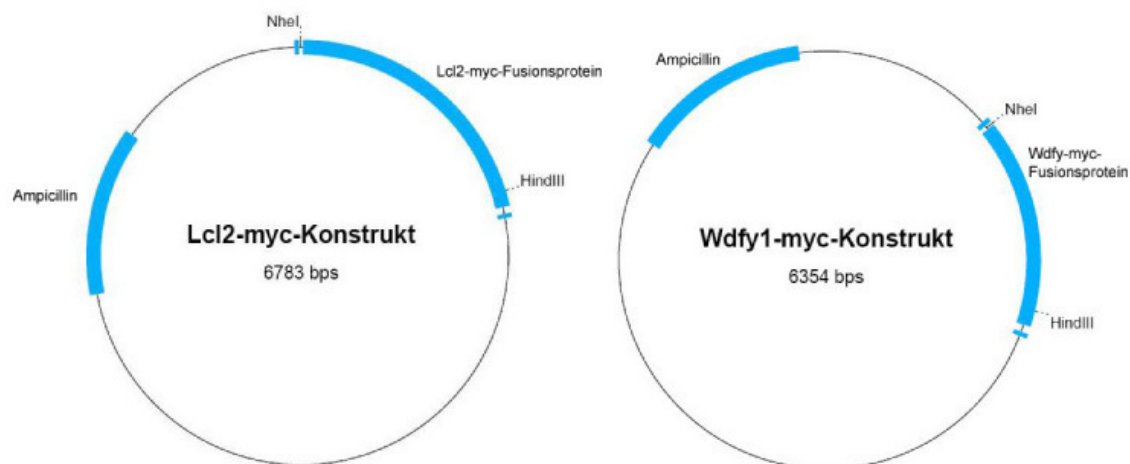


Abb. 19 Die Vektorkarten der erstellten Konstrukte: links das Lcl2-myc-Konstrukt; rechts das Wdfy1-myc-Konstrukt; beide Vektoren enthalten die entsprechende Fusionssequenz, ein Ampicillin-Resistenzgen, sowie Bindungsstellen für die Primer T7 und BGH

```

1  cgatcgcccg gggatatcgc caccatgggc gtgatcaagc cggacatgaa gatcaagctg
    >>.....ORF-1.....>>
    m g v i k p d m k i k l
61  cggatggagg ggcgctgaa cggccacaaa ttcgtgatcg agggcgacgg gaaaggcaag
    >.....ORF-1.....>
    r m e g a v n g h k f v i e g d g k g k
121  ccctttgagg gtaagcagac tatggacctg accgtgatcg agggcgcccc cctgcccctc
    >.....ORF-1.....>
    p f e g k q t m d l t v i e g a p l p f
181  gcttatgaca ttctcaccac cgtgttcgac tacggtaacc gtgtcttcgc caagtacccc
    >.....ORF-1.....>
    a y d i l t t v f d y g n r v f a k y p
241  aaggacatcc ctgactactt caagcagacc ttccccgagg gctactcgtg ggagcgaagc
    >.....ORF-1.....>
    k d i p d y f k q t f p e g y s w e r s
301  atgacatacg aggaccaggg aatctgtatc gctacaaaac acatcaccat gatgaagggt
    >.....ORF-1.....>
    m t y e d q g i c i a t n d i t m m k g
361  gtggaecgact gcttcgtgta caaaatccgc ttcgacgggg tcaacttccc tgctaatggc
    >.....ORF-1.....>
    v d d c f v y k i r f d g v n f p a n g
421  cgggtgatgc agcgcgaagac cctaaagtgg gagcccagta cggagaagat gtacgtgcgg
    >.....ORF-1.....>
    p v m q r k t l k w e p s t e k m y v r
481  gacggcgtac tgaagggcga tgtaatatg gcactgctct tggagggagg cggccactac
    >.....ORF-1.....>
    d g v l k g d v n m a l l l e g g g h y
541  cgctgcgact tcaagaccac ctacaaagcc aagaagggtg tgcagcttcc cgactaccac
    >.....ORF-1.....>
    r c d f k t t y k .....k v v q l p d y h
601  ttcgtggacc accgcatcga gatcgtgagc cagcaatgga ctacaacaa agtcaagctg
    >.....ORF-1.....>
    f v d h r i e i v s h d k d n k v k l
661  tacgagcagc ccgaagccca cagcggacta ccccgcagg cgggctaata gttctagaac
    >.....ORF-1.....>
    y e h a e a h s g l p r q a g -

```

Abb. 20 Sequenzanalyse des positiven Rh-Klons Nr. 9. Die Sequenz wird von einem Stopp-Codon unterbrochen

3.1.5 Vektorkarte

In Abbildung 21 ist die *Multiple Cloning Site* des Vektors pcDNA 3.1 B(-) myc/his dargestellt. Zum Inserieren aller drei Sequenzen werden die rosa markierten Restriktionsschnittstellen der Enzyme *NheI* und *HindIII* verwendet. Das Myc-Epitop befindet sich am C-terminalen Ende der Sequenz.

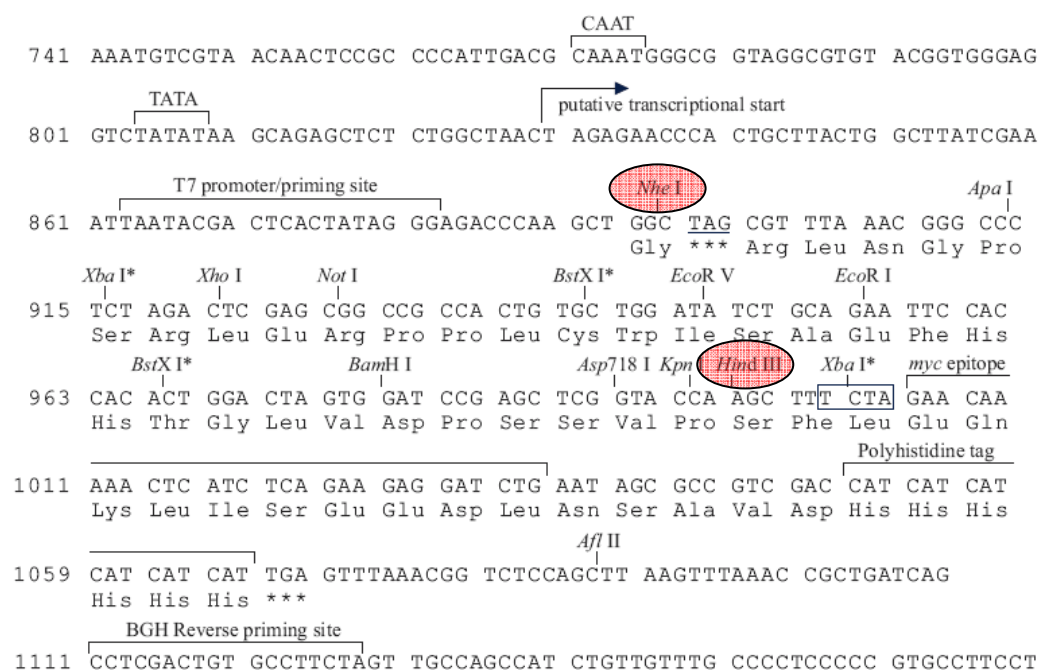


Abb. 21 Die *Multiple Cloning Site* des Vektors pcDNA 3.1 B(-) myc/his. Einkreist und rosa unterlegt sind die zum inserieren der proteincodierenden Sequenzen verwendeten Schnittstellen der Restriktionsenzyme *NheI* und *HindIII*. Die Sequenzen werden 5' über *NheI* und 3' über *HindIII* eingefügt.

3.1.6 In Fusion Dry Down PCR Cloning Kit

Für die Klonierung wird neben der oben beschriebenen Klonierungsstrategie auch das In Fusion Dry Down PCR Cloning Kit der Firma Clontech getestet. Dieses System erlaubt gemäß den Herstellerangaben das direkte Klonieren von PCR-Produkten in einen beliebigen linearisierten Vektor. Die eigentliche Klonierungsreaktion wird hierbei von einem speziellen In-Fusion Enzym katalysiert. Es handelt sich um eine Rekombinase und nicht um eine Ligase. Zunächst soll mit dieser Methode nur die Sequenz des Rh-Proteins in einen Expressionsvektor inseriert werden.

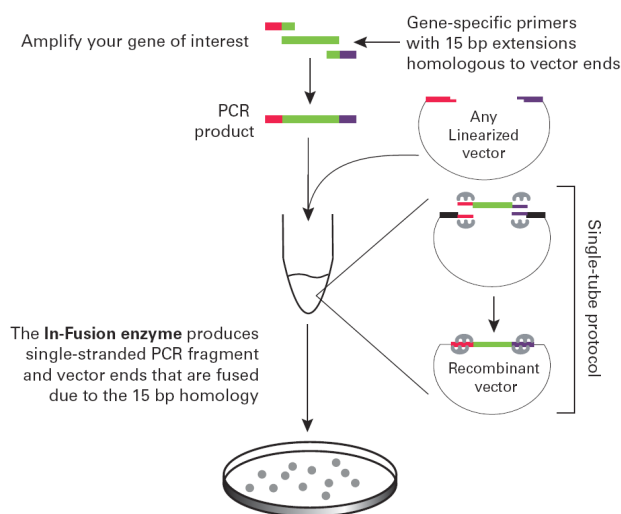


Abb. 22 Schematische Darstellung der Strategie zur Einfügung proteincodierender Sequenzen in einen Expressionsvektor mit dem „In-Fusion Dry Down PCR Cloning Kit“. Mit dem In-Fusion Enzym lassen sich PCR-Produkte direkt in einen beliebigen linearisierten Vektor inserieren.

3.1.6.1 Primer Design

Das Design und die Qualität der Primer sind für eine erfolgreiche Klonierung entscheidend. Wichtig ist, dass sich das zu inserierende Fragment 15 bp homologe Sequenz an beiden Enden mit den Linearisierungs-Stellen des Vektors teilt. Für die Klonierung wird der Vektor pcDNA 3.1 B(-) myc/his gewählt. Dementsprechend werden die Primer für die Amplifikation der proteincodierenden Sequenz mittels PCR designed.

3.1.6.2 Präparation des linearisierten Vektors

Um den Vektor pcDNA 3.1 B(-) myc/his zu linearisieren, werden 2 µg DNA mit 20 units des Enzyms *HindIII* restringiert. Da es für die Klonierungsreaktion wichtig ist, nur linearisierten Vektor einzusetzen, wird als Kontrolle 1 µl des Restriktionsproduktes per Hitzeschock in kompetente *E.coli*-Bakterien transformiert. Der Vektor scheint komplett verdaut zu sein, da sich keine Kolonien bilden.

Der verdaute Vektor (Abbildung 23, Pfeil) wird auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen und mit dem Kit Nucleo Spin Extract II über eine Säule aufgereinigt.

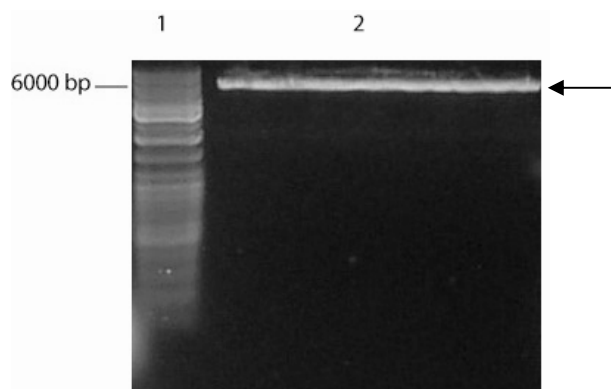


Abb. 23 Gelelektrophoretische Auftrennung des mit *HindIII* restringierten Vektors pcDNA 3.1 B(-) myc/his zur DNA-Isolation aus dem Agarosegel. (1) DNA-Marker; (2) verdauter Vektor pcDNA 3.1 B(-) myc/his

Die Konzentration der aufgereinigten DNA wird über ein Agarosegel abgeschätzt (Abbildung 24).

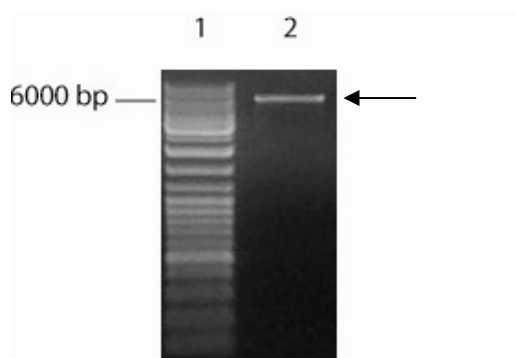


Abb. 24 Gelelektrophoretische Auftrennung des mit *HindIII* restringierten Vektors pcDNA 3.1 B(-) myc/his zur Konzentrationsbestimmung. (1) DNA-Marker; (2) verdauter Vektor pcDNA 3.1 B(-) myc/his

3.1.6.3 PCR- Amplifikation und Aufreinigung

Die zu inserierende Sequenz des Rh-Proteins wird per PCR amplifiziert. Hierzu sind vor-aliquotierte PCR-Gefäße mit einem Polymerase-Mix (*Taq*-Polymerase und eine geringe Menge einer Polymerase mit *proofreading*-Funktion), dNTPs, Puffer und einem speziellen Antikörper, der gewährleistet, dass die Polymerase erst bei 95°C mit der Synthese beginnen kann, im Kit enthalten. Nach dem Hinzufügen der Template-

DNA und der Primer wird das in Tabelle 2 dargestellte PCR-Programm durchgeführt. Zur Aufreinigung werden die Ansätze auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen (Abbildung 25).

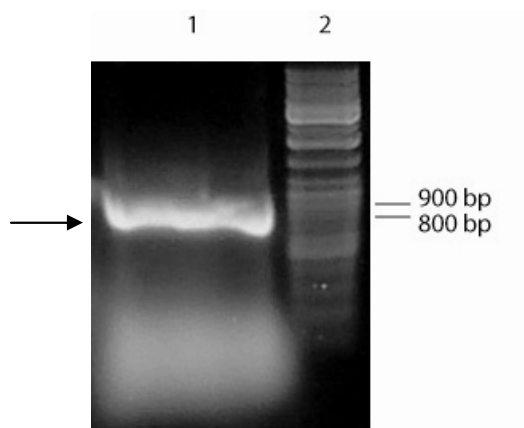


Abb. 25 Gelelektrophoretische Auftrennung des gesamten PCR-Ansatzes nach Amplifikation der Lcl2-Sequenz. (1) Lcl2-Sequenz; (2) DNA-Marker

Das Amplifikat hat eine Größe von ~800 bp (Abbildung 25, Pfeil). Dies entspricht in etwa der erwarteten Fragmentgröße (864 bp). Das Produkt wird über eine Säule aufgereinigt. Die Konzentration der aufgereinigten DNA wird über ein Agarosegel abgeschätzt (Abbildung 26).

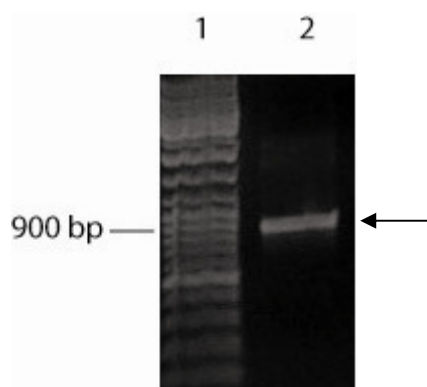


Abb. 26 Gelelektrophoretische Auftrennung des PCR-Produktes nach Aufreinigung über eine Säule. (1) DNA-Marker; (2) Lcl2-Sequenz

3.1.6.4 Klonierungsreaktion

PCR-Fragment und linearisierter Vektor werden in einem molaren Verhältnis von 2:1 gemischt. Im Anschluss an die Reaktion wird der Ansatz per Hitzeschock in kompetente *E.coli*-Bakterien transformiert. Diese werden auf ampicillinhaltigem LB-Medium ausplattiert. Leider können keine Kolonien herangezogen werden.

Zusammenfassung:

Es ist somit gelungen, durch PCR-basierte Amplifikation und Anfügen von Restriktionsschnittstellen die kodierenden Sequenzen von zwei cDNA's (Wdfy1 und Lcl2) in den Expressionsvektor pcDNA 3.1 B(-) myc/His gerichtet einzuklonieren. Dies eröffnet nun die Möglichkeit, diese Konstrukte in eukaryotischen Zellen zu exprimieren und die Fusionsproteine anhand der myc-Markierung immunocytochemisch nachzuweisen. Die Klonierung mit dem In-Fusion dry down PCR cloning kit hingegen ist nicht gelungen.

3.2 Sequenzanalyse der erhaltenen Konstrukte

In Kooperation mit einer anderen Arbeitsgruppe dieser Universität erhielt ich für mein Projekt Expressionskonstrukte zur Untersuchung der beiden Proteine Atlastin und DKFZp761B107. Diese sollten verschiedene Epitope zum Nachweis der Fusionsproteine enthalten. Die Resultate der Sequenz-Analysen zur Überprüfung der Leserahmen und Epitope sind.

Konstrukt	Übereinstimmung mit Originalsequenz	Epitop	Korrektter Leserahmen
Nr. 1	100%	HA	ja
Nr. 2	100%	eGFP	ja
Nr. 3	100%	-	-

Tabelle 4 Charakterisierung der erhaltenen Atlastin-Konstrukte nach Sequenzanalyse

Konstrukt	Übereinstimmung mit Originalsequenz	Epitop	Korrektter Leserahmen
Nr. 1	100%	HA	ja
Nr. 2	100%	FLAG	ja

Tabelle 5 Charakterisierung der erhaltenen DKFZp761B107-Konstrukte nach Sequenzanalyse

Die Expressionsvektoren enthalten alle einen CMV-Promotor für die Expression des Fusionsproteins in Säugerzellen.

3.3 Lokalisationsstudien

3.3.1 Vorhersage der Lokalisation

Neben den drei neuen Proteinen sollen auch Atlastin und DKFZp761B107 im Hinblick auf ihre zelluläre Lokalisation untersucht werden. Für alle Kandidaten wird vor Beginn der Experimente die zelluläre Lokalisation *in silico* vorhergesagt. Die verwendeten Programme sind jeweils in Klammern angegeben. Sie sind im Internet unter www.expasy.org zu finden. Für die Analyse wird nur die Aminosäuresequenz des Proteins benötigt.

Die neuen Proteine und DKFZp761B107 sind laut Vorhersage lösliche Proteine (SO-SUI, Hirokawa et al., 1998; Mitaku et al., 1999, 2002). Das Rh-Protein wird mit hoher Wahrscheinlichkeit im extrazellulären Raum gefunden, jedoch auch im Cytoplasma, im Zellkern und in Vesikeln des sekretorischen Systems (WoLF PSORT, Horton et al.2006). Das Wdfy1-Protein wird ebenfalls mit hoher Wahrscheinlichkeit im extrazellulären Raum gefunden, könnte jedoch auch in Mitochondrien eine Rolle spielen (WoLF PSORT, Horton et al.2006). Das Lcl2-Protein ist am wahrscheinlichsten im Cytoplasma finden, aber auch in Mitochondrien (WoLF PSORT, Horton et al.2006).

DKFZp761B107 findet man laut Vorhersage zu gleichen Anteilen im Zellkern und im Cytoplasma (WoLF PSORT, Horton et al.2006). Die membranäre Lokalisation von Atlastin über zwei Transmembrandomänen wird bestätigt. (WoLF PSORT, Horton et al.2006).

3.3.2 Transfektionen und Immuncytologie

Was die neuen Proteine betrifft, stehen für Wdfy1 und Lcl2 nach erfolgreicher Klonierung Konstrukte zur Transfektion und rekombinanten Expression in Säugerzellen zur Verfügung. Erste Studien mit dem Lcl2-Protein werden erfolgreich an CHO-Zellen durchgeführt. Atlastin und DKFZp761B107 werden ebenfalls mit den erhaltenen Konstrukten rekombinant in CHO-Zellen exprimiert und markiert. Die Transfektionen werden per Elektroporation durchgeführt. Ausserdem werden für Atlastin Expressions-

Studien an ausdifferenzierten PC12-Zellen gemacht. In diesem Zusammenhang wird auch getestet, ob Kolokalisation mit anderen endogenen Vesikelproteinen vorliegt.

3.3.2.1 Mus musculus LanC like 2

Das Konstrukt mit dem Lcl2-myc-Fusionsprotein wird per Elektroporation mit einer Pulsdauer von 4,85 ms in CHO-Zellen transfiziert und anschliessend mit einem Antikörper gegen das myc-Epitop immungefärbt. Die Transfektionseffizienz liegt bei 20%. Nach der Transfektion liegt die Zellzahl bei 2.820.000 Zellen/ml. Es werden 20.000 Zellen/ml ausplattiert. Für die anschliessende Immunfärbung werden die Zellen mit Methanol fixiert. Der Erstantikörper α -myc wird mit einer Konzentration von 5 μ g/ml eingesetzt, der Zweitantikörper α -mouse cy3 wird 1:700 verdünnt.

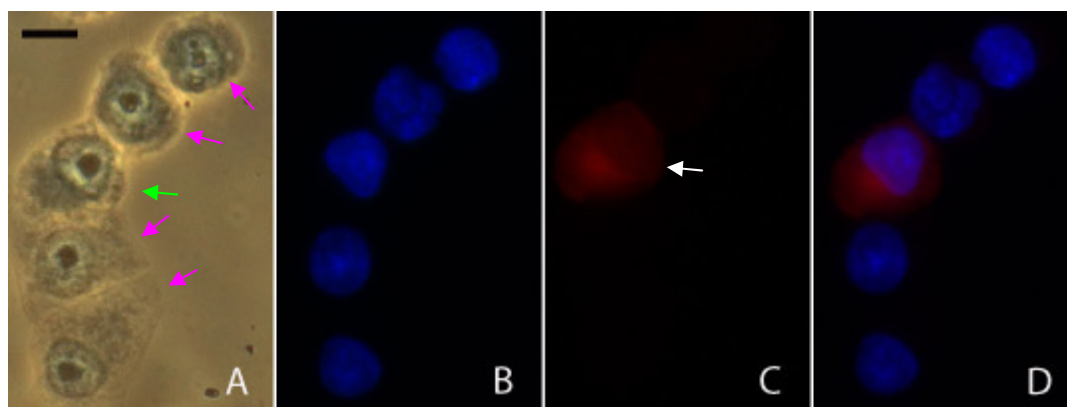


Abb. 27 Immunocytochemische Analyse des rekombinant exprimierten Lcl2-Proteins in CHO-Zellen. Gezeigt sind eine transfizierte Zelle und vier nicht-transfizierte Zellen. (A) Zellen im Phasenkontrast, (B) blau: mit DAPI gefärbte Zellkerne; (C) rot: Lcl2-myc-Fusionsprotein; (D) blau: DAPI-Färbung, rot: Lcl2-myc-Fusionsprotein; Balken 20 μ m

In Abbildung 27 ist die Immunocytochemische Analyse des rekombinant exprimierten Lcl2-Proteins dargestellt. Zu sehen sind eine transfizierte (A, grüner Pfeil) Zelle und vier nicht-transfizierte Zellen (A, rosa Pfeile). Die rote Färbung des Lcl2-myc-Fusionsproteins ist überall in der Zelle verteilt (C, weisser Pfeil), wobei sie in der Nähe des Zellkerns besonders intensiv zu sein scheint.

Zur Kontrolle werden einige der transfizierten Zellen nur mit dem zweiten Antikörper und DAPI inkubiert (Abbildung 28). Ausserdem werden mit dem Leervektor transfizierte Zellen mit dem ersten und zweiten Antikörper sowie mit DAPI inkubiert (Abbil-

dung 28). Als Kontrolle des ersten Antikörpers dienen die nicht-transfizierte Zellen in Abbildung 27. Weder Erst-, noch Zweitantikörper lassen ein unspezifisches Signal erkennen. Auch in der Kontrolle mit transfiziertem Leervektor sind nur die mit DAPI gefärbten Zellkerne zu sehen.

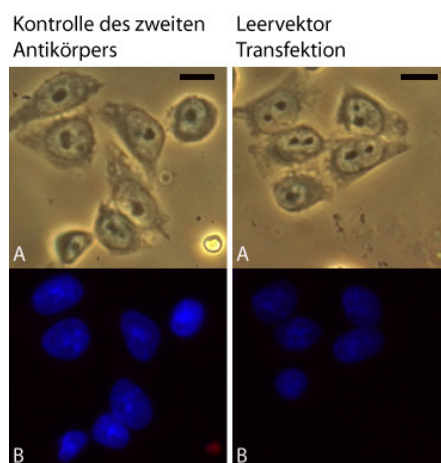


Abb. 28 Immunocytochemische Analysen zur Kontrolle: links transfizierte Zellen zur Kontrolle des 2. Antikörpers; rechts mock-transfizierte Zellen (A) Zellen im Phasenkontrast, (B) blau: DAPI-Färbung; Balken 20 µm

3.3.2.2 Atlastin

Für die Elektroporation wird das Atlastin-Konstrukt Nr. 1 mit HA-Epitop verwendet. Das Atlastin-HA-Fusionsprotein wird rekombinant in CHO-Zellen exprimiert und mit einem Antikörper gegen das HA-Epitop immungefärbt. Die Pulsdauer bei der Elektroporation beträgt 4,23 ms. Nach der Transfektion liegt die Zellzahl bei 1.530.000 Zellen/ml. Es werden 20.000 Zellen/ml ausplattiert. Für die anschließende Immunfärbung werden die Zellen mit Methanol fixiert. Die Antikörper werden wie folgt eingesetzt: Erstantikörper α -HA 10 µg/ml; Zweitantikörper α -mouse cy3 1:800.

Die Abbildung 29 zeigt die immunocytochemische Analyse des rekombinant exprimierten Proteins Atlastin in CHO-Zellen. CHO-Zellen wurden erfolgreich mit dem Atlastin-HA-Fusionskonstrukt transfiziert. Von den drei gezeigten Zellen sind zwei transfiziert (A; transfizierte Zellen: grüne Pfeile, nicht transfizierte Zelle: rosa Pfeil). Die Abbildung 30 zeigt eine transfizierte Zelle in einer vergrößerten Darstellung. Die Färbung

(Abbildung 29C, weisse Pfeile) ist nicht punktuell, sondern mit Ausnahme des Zellkerns fast in der ganzen Zelle verteilt. In der Nähe des Zellkerns sind jedoch Stellen zu erkennen die stärker leuchten als der Rest der Zelle (Abbildung 30B, weisser Pfeil).

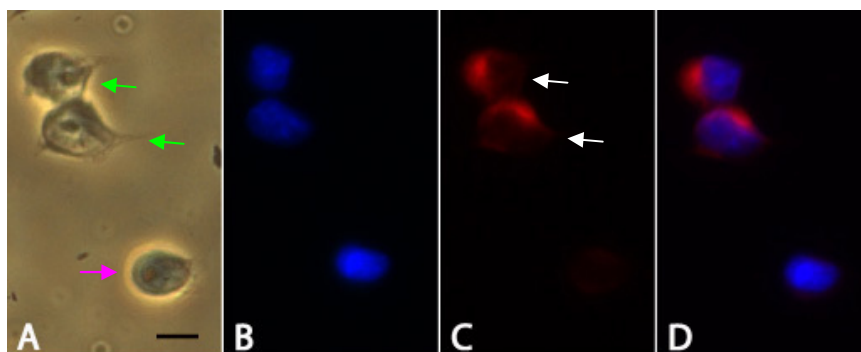


Abb. 29 Immuncytochemische Analyse des rekombinant exprimierten Proteins Atlastin in CHO-Zellen. Gezeigt sind zwei transfizierte Zellen und eine nicht-transfizierte Zelle. (A) Zellen im Phasenkontrast; (B) blau: DAPI-Färbung; (C) rot: Atlastin-HA-Fusionsprotein; (D) blau: DAPI-Färbung, rot: Atlastin-HA-Fusionsprotein; Balken 20 μm

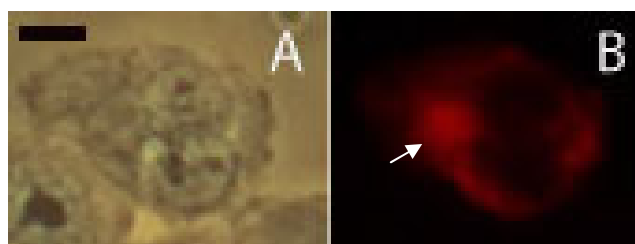


Abb. 30 Vergrößerte Darstellung einer transfizierten Zellen. (A) Zelle im Phasenkontrast; (B) blau: DAPI-Färbung; (C) rot: Atlastin-HA-Fusionsprotein; (D) blau: DAPI-Färbung, rot: Atlastin-HA-Fusionsprotein; Balken 20 μm

Um unspezifisches Binden der Antikörper auszuschliessen, müssen Kontrollen gemacht werden. Das schwach rote Leuchten der untransfizierten Zelle in der Abbildung 29 spiegelt das unspezifische Binden des ersten Antikörpers wieder. Es ist verschwindend gering und kann daher vernachlässigt werden. Um das Bindungsverhalten des zweiten Antikörpers zu prüfen, werden einige der elektroporierten Zellen nur mit dem zweiten Antikörper und DAPI behandelt. Das Ergebnis ist in Abbildung 31 zu sehen. Man sieht nur die blau gefärbten Zellkerne und kann also davon ausgehen, dass der Zweitantikörper gar nicht oder nur sehr gering unspezifisch bindet.

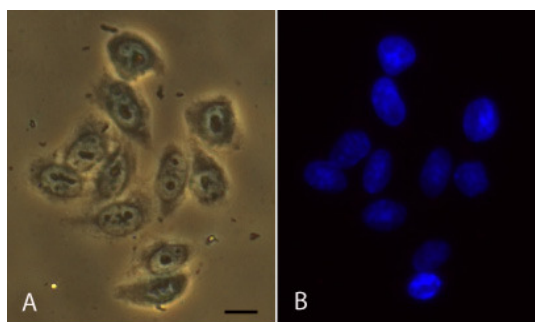


Abb. 31 Immuncytochemische Analyse elektroporierter CHO-Zellen zur Kontrolle des 2. Antikörpers α -mouse cy3. (A) Zellen im Phasenkontrast; (B) blau: DAPI-Färbung; Balken 20 μ m

Um die Lokalisation von Atlastin in axonalen Verzweigungspunkten und in axonalen Wachstumskegeln zu überprüfen werden durch NGF ausdifferenzierte PC12-Zellen als Modell neuronaler Zellen verwendet. Die Ausläufer ausdifferenzierter PC12-Zellen werden allgemein als Neuriten bezeichnet. Die Zellen werden nach dem Passagieren drei Tage mit 10 ng/ml NGF in der Kulturschale inkubiert. Am dritten Tag werden 40.000 Zellen/ml in eine Multi-well ausplattiert und 20 ng/ml NGF zugegeben. Um die PC12-Zellen weiter auszudifferenzieren wird nach zwei Tagen das Medium gewechselt und die Konzentration von NGF auf 30 ng/ml erhöht. Einen Tag später werden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert. Für die Färbung von Atlastin werden Antikörper gegen zwei verschiedene Epitope innerhalb des Proteins getestet. α -Atlastin I wird 500fach, α -Atlastin II 1000fach eingesetzt. Der Zweitantikörper α -mouse Cy3 wird 700fach verdünnt. Die Ergebnisse der immuncytochemischen Analyse sind in den Abbildungen 32 und 33 dargestellt. Zunächst fällt auf, dass beide Antikörper (α -Atlastin I und α -Atlastin II) den Zellkern markieren, was wahrscheinlich auf unspezifisches Binden der Antikörper zurückzuführen ist. α -Atlastin I markiert den Zellkern allerdings deutlich stärker. Der Zellkern wurde ausserdem in beiden Fällen mit DAPI gefärbt. Atlastin lässt nach Färbung mit α -Atlastin I eine punktuelle Verteilung entlang der Neuriten (Abbildung 32C, weisse Pfeile) und eine Anreicherung in den Wachstumskegeln (Abbildung 32C, grüne Pfeile) erkennen. Die Färbung mit α -Atlastin II zeigt ebenfalls eine punktuelle Verteilung (Abbildung 33C, weisse Pfeile).

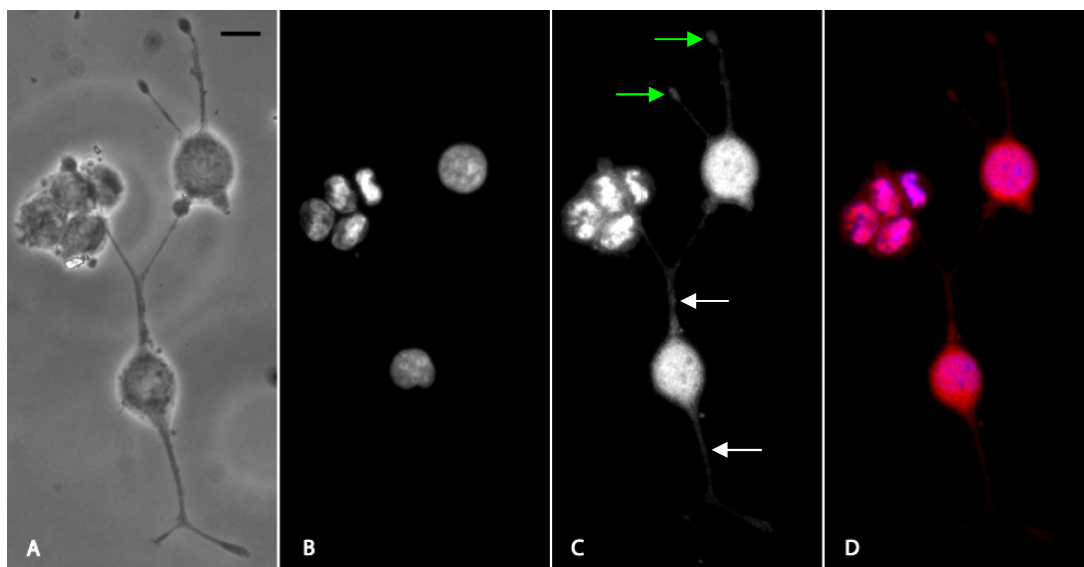


Abb. 32 Immunocytochemische Analyse des endogen exprimierten Proteins Atlastin in ausdifferenzierten PC12-Zellen. (A) Zellen im Phasenkontrast,; (B) DAPI-Färbung; (C) α -Atlastin I-Färbung; (D) blau: DAPI-Färbung, rot: α -Atlastin I-Färbung; Balken 10 μ m

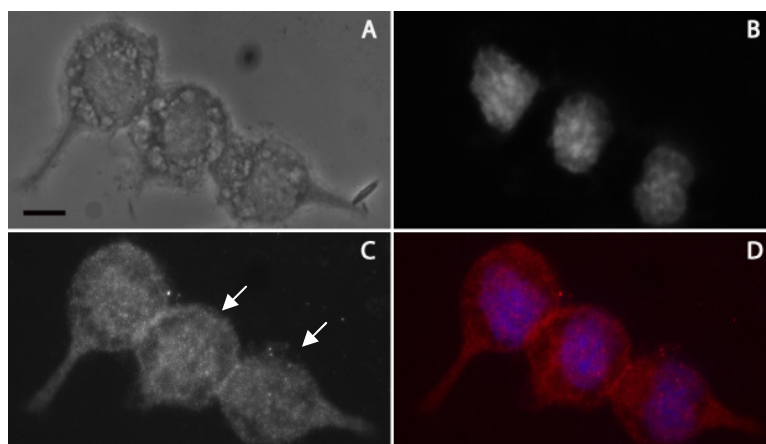


Abb. 33 Immunocytochemische Analyse des endogen exprimierten Proteins Atlastin in ausdifferenzierten PC12-Zellen. (A) Zellen im Phasenkontrast, (B) DAPI-Färbung; (C) α -Atlastin II-Färbung; (D) blau: DAPI-Färbung, rot: α -Atlastin II-Färbung; Balken 10 μ m

Zusätzlich werden für Atlastin Kolokalisationsstudien mit anderen endogen exprimierten Vesikelproteinen durchgeführt. Für die Doppelfärbungen werden die PC12-Zellen wie für die Einzelfärbung behandelt. Die Verdünnungen der Antikörper sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Doppelfärbung	Atlastin VAMP2	Atlastin 58K	Atlastin Synaptophysin	Atlastin Syntaxin
1.1.Antikörper	α -Atlastin I 1:500	α -Atlastin I 1:500	α -Atlastin I 1:1000	α -Atlastin I 1:1000
2.1.Antikörper	α -VAMP2 1:100	α -58K 1:50	α - Synaptophysin 1:150	α -Syntaxin 1:100
1.2.Antikörper	α -rabbit cy3 1:700	α -rabbit cy3 1:700	α -rabbit cy3 1:700	α -rabbit cy3 1:700
2.2.Antikörper	α -mouse Alexa 488 1:200	α -mouse Alexa 488 1:200	α -mouse Alexa 488 1:200	α -mouse Alexa 488 1:200

Tabelle 5 Zusammenstellung aller für die Kolkalisationsstudien verwendeten Antikörper, sowie die eingesetzten Verdünnungen

Die immunocytochemischen Analysen der endogen exprimierten synaptischen Vesikelproteine sind in den Abbildungen 34 bis 37 dargestellt. Atlastin ist immer rot dargestellt, das jeweilige andere Protein ist immer grün gefärbt und Zellkerne sind mit DAPI blau gefärbt. Abbildung 34 zeigt eine Doppelfärbung der Proteine Atlastin und VAMP2. Die stark rote Färbung des Zellkerns lässt sich wahrscheinlich auf unspezifisches Bindungsverhalten des Antikörpers zurückführen. Atlastin und VAMP2 liegen mit Ausnahme kleinerer Stellen in der ganzen Zelle verteilt vor. Beide Proteine sind entlang der axonalen Ausläufer (Abbildung 34-C und -D, gelbe Pfeile), und in den Wachstumskegeln (Abbildung 34-C und -D, weiße Pfeile) angereichert. Die Doppel-

färbung mit den Proteinen Atlastin und Synaptophysin ist in Abbildung 35 dargestellt. Atlastin zeigt eine ähnliche Verteilung wie in Abbildung 34. Synaptophysin scheint zwar auch überall in der Zelle präsent zu sein, liegt jedoch punktuell

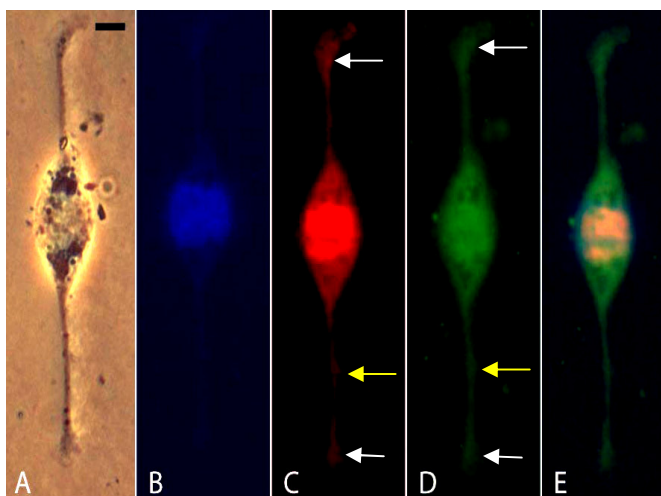


Abb. 34 Immunocytochemische Analyse der endogen exprimierten Proteine Atlastin und VAMP2 in ausdifferenzierten PC12-Zellen. (A) Zellen im Phasenkontrast; (B) DAPI-Färbung; (C) Atlastin (D) VAMP2 (E) Überlagerung von C und D; Balken 10 μ m

vermehrt perinukleär (Abbildung 35D, rosa Pfeile) sowie in den Wachstumskegeln und entlang der Ausläufer (Abbildung 35D, weiße Pfeile) vor. Abbildung 37 zeigt Doppelfärbungen der Proteine Atlastin und 58K. Hierbei handelt es sich um einen Marker für den Golgi-Apparat. Während Atlastin eine schwache diffuse Verteilung aufweist, zeigt 58K

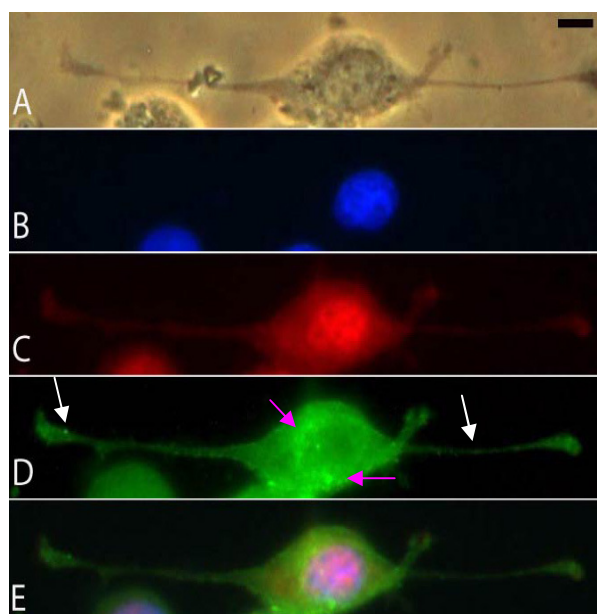
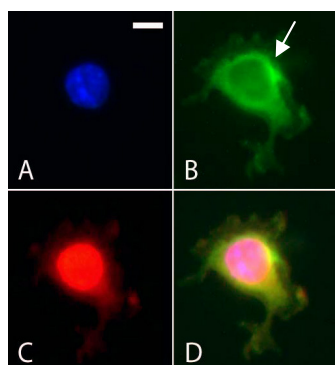


Abb. 35 Immunocytochemische Analyse der endogen exprimierten Proteine Atlastin und Synaptophysin in ausdifferenzierten PC12-Zellen. (A) Zellen im Phasenkontrast; (B) DAPI-Färbung; (C) Atlastin (D) Synaptophysin (E) Überlagerung von C und D; Balken 10 μ m



um den Zellkern herum eine Anreicherung (Abbildung 37-1D, weiße Pfeile). Dies ist zur Verdeutlichung noch mal in Abbildung 37-2 dargestellt (weiße Pfeile). Ein ähnliches Bild ergibt sich für die Doppelfärbung der Proteine Atlastin und Syntaxin (Abbildung 36). Auch Syntaxin ist perinukleär lokalisiert (Abbildung 36B, weißer Pfeil). Zusätzlich werden Kontrollen für die beiden Zweit-

Abb. 36 Immunocytochemische Analyse der endogen exprimierten Proteine Atlastin und Syntaxin in ausdifferenzierten PC12-Zellen. (A) DAPI-Färbung; (B) Syntaxin (C) Atlastin (E) Überlagerung von B und C; Balken 10 μ m

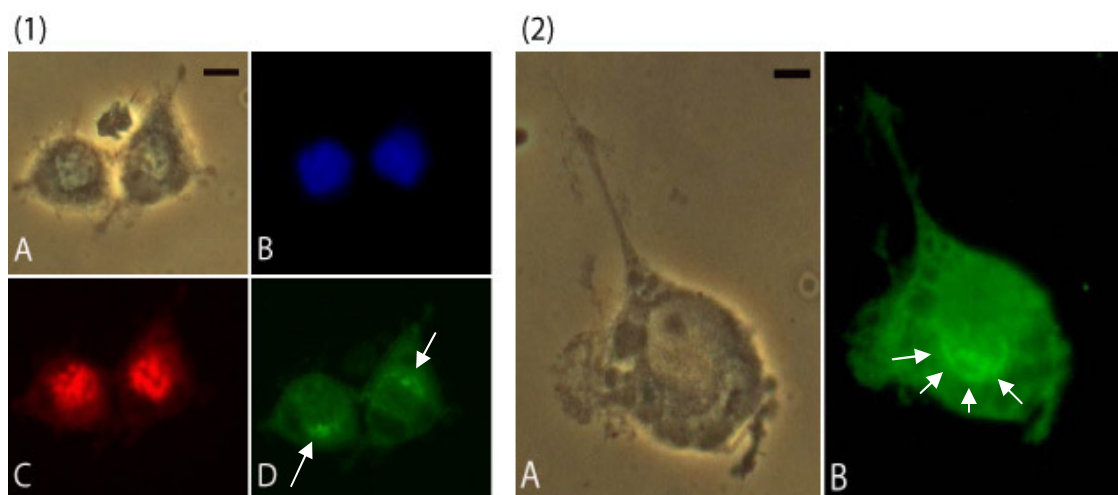


Abb. 37 Immunocytochemische Analyse der endogen exprimierten Proteine Atlastin und 58K in ausdifferenzierten PC12-Zellen. (1A) Zellen im Phasenkontrast; (1B) DAPI-Färbung; (1C) Atlastin (1D) 58K; (2A) Zellen im Phasenkontrast, (2B) 58K; Balken in beiden Teilen 10 μ m

antikörper α -rabbit cy3 und α -mouse Alexa 488 durchgeführt. Diese lassen kein unspezifisches Binden der Antikörper erkennen (nicht gezeigt).

3.3.2.3 Interaktionspartner von Atlastin

Das entsprechende Konstrukt wird durch Elektroporation in CHO-Zellen transfiziert und das Protein mit einem Antikörper gegen das FLAG-Epitop markiert. Die Pulsdauer beträgt 3,74 ms. Nach der Elektroporation beträgt die Zellzahl 1.870.000 Zellen/ml. Es werden 20.000 Zellen/ml ausplattiert. Nach der Methanolfixierung wird mit den An-

tikörpern α -FLAG (20 $\mu\text{g/ml}$) und α -mouse Cy3 (1:700) eine Immunfärbung durchgeführt. In Abbildung 38 ist die immunocytochemische Analyse des rekombinant exprimierten

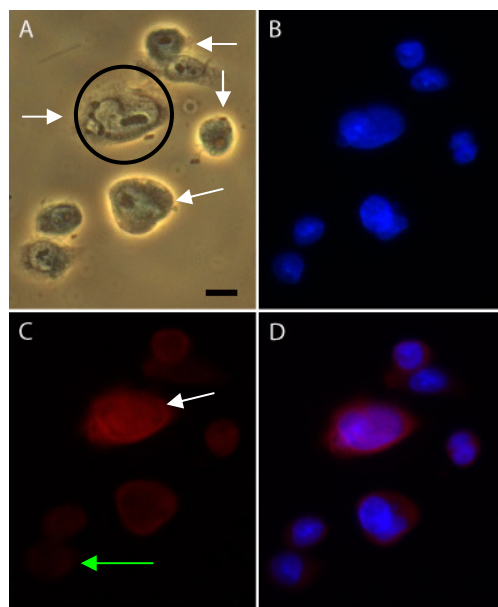


Abb. 38 Immunocytochemische Analyse des rekombinant exprimierten Proteins DKFZp761B107 in CHO-Zellen. Gezeigt sind vier transfizierte Zellen und drei nicht-transfizierte Zellen. (A) Zellen im Phasenkontrast, (B) blau: DAPI-Färbung; (C) rot: Atlasin-HA-Fusionsprotein bzw. unspezifischer Signal des ersten Antikörpers; (D) blau: DAPI-Färbung, rot: Atlasin-HA-Fusionsprotein bzw. unspezifischer Signal des ersten Antikörpers; Balken 20 μm

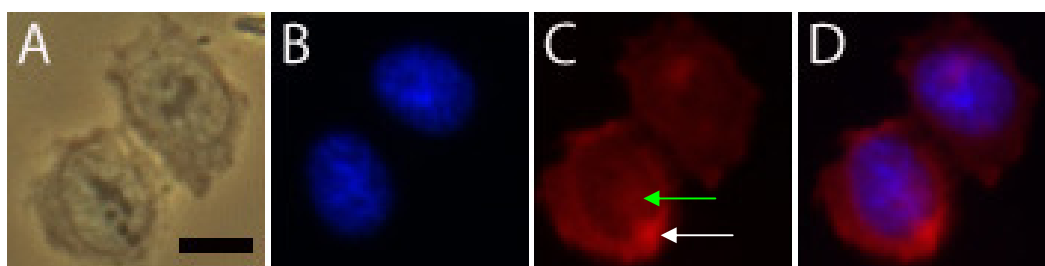


Abb. 39 Immunocytochemische Analyse des rekombinant exprimierten Proteins in CHO-Zellen. Gezeigt sind zwei transfizierte Zellen. (A) Zellen im Phasenkontrast, (B) blau: DAPI-Färbung; (C) rot: Atlasin-HA-Fusionsprotein; (D) blau: DAPI-Färbung, rot: Atlasin-HA-Fusionsprotein; Balken 20 μm

Interaktionspartners von Atlasin dargestellt. Von den sieben gezeigten Zellen sind vier transfiziert (Abbildung 38A, weiße Pfeile), eine davon sehr stark (zusätzlich schwarz umrandet). Das schwach rote Signal der nicht-transfizierten Zellen spiegelt die unspezifische Bindung des ersten Antikörpers wieder (Abbildung 38C, grüner Pfeil). Das

Protein ist diffus in der Zelle verteilt (Abbildung 38C, weißer Pfeil), wobei es perinukleär angereichert zu sein scheint. Zur Verdeutlichung sind in Abbildung 39 zwei transfizierte Zellen vergrößert dargestellt. Der weisse Pfeil markiert die Stelle der perinukleären Anreicherung. Weiterhin ist eine schwache Markierung des Zellkerns zu sehen (grüner Pfeil).

Zur Kontrolle der Spezifität des zweiten Antikörpers werden einige elektroporierte Zellen nur mit dem zweiten Antikörper und DAPI behandelt. Die Kontrolle des Zweitantikörpers in Abbildung 40 dargestellt. Ausser den mit DAPI markierten Zellkernen ist kein Signal zu sehen.

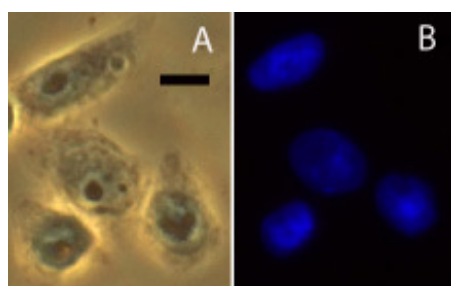


Abb. 40 Immunocytochemische Analyse elektroporierter CHO-Zellen zur Kontrolle des 2. Antikörpers α -mouse cy3. (A) Zellen im Phasenkontrast; (B) blau: DAPI-Färbung; Balken 20 μ m

3.4 In silico in situ Hybridisierung

Mit Hilfe des *Allen brain atlas* (Lein et. al., 2007) wird zusätzlich untersucht, in welchen Hirnarealen die Gene der neuen Proteine exprimiert werden. Es handelt sich um eine interaktive genomweite Datenbank der Genexpression im Mäusehirn. Daher Diese basiert in erster Linie auf in-situ Hybridisierungsdaten und detaillierten Referenzatlanten. Für die Untersuchung benötigt man die *gene ID* der entsprechenden Sequenz aus der Maus. Die Expressionsanalyse des Rh-Proteins (entsprechender Klon aus der Maus: Zugangsnummer: NP_573448, *gene-ID*: 66049) ist in Abbildung 41 dargestellt. Die weisse Färbung der Sagittalschnitte stellt die markierte mRNA, also Orte der Genexpression dar. Das Gen scheint in allen Hirnarealen relativ stark exprimiert zu werden. Die mRNA des Wdfy1-Proteins ist bei weitem nicht so abundant wie die des Rh-

Proteins (Abbildung 42). Der Großteil der Zellen scheint das Gen nur sehr schwach zu exprimieren. Etwas stärker ist die Expression in Neuronen des

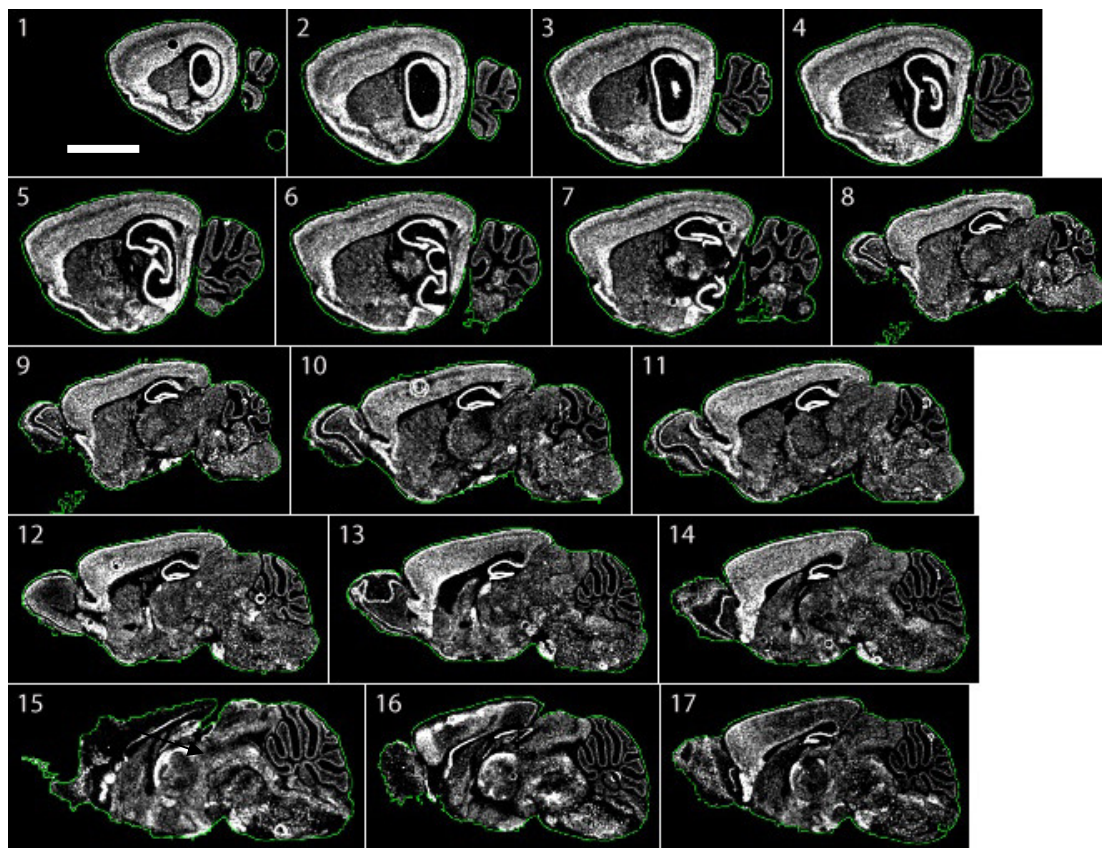


Abb. 41 Sagittalschnittserie von lateral (1) nach medial (17) durch das Gehirn der Maus zur Darstellung der Genexpression des Rh-Proteins. Orte der Genexpression sind weiß gefärbt. Die Abbildungen wurden der Datenbank entnommen; Balken 1 cm

Hippocampus (Abbildung 42, gelbe Pfeile und Umrandung), im Striatum (Abbildung 42, rote Pfeile), im Bulbus olfaktorius (Abbildung 42, rosa Pfeile) und in dem, zum sensorischen Teil des Mittelhirns gehörigen, Colliculus inferior (Abbildung 42, weisse Pfeile).

Das Gen des Lcl2-Proteins wird in weiten Teilen des Gehirns überhaupt nicht exprimiert. Es wird ebenfalls im Hippocampus exprimiert (Abbildung 43, gelbe Umrandungen). Es wird auch in olfaktorischen Gebieten, wie dem anterioren Nucleus olfaktorius (Abbildung 43, rote Pfeile), dem Piriformareal (Abbildung 43, rosa Pfeile) sowie dem Bulbus olfaktorius (Abbildung 43, blaue Umrandung) stark exprimiert. Ausserdem ist die mRNA in weiteren Gebieten des cerebralen Cortex abundant (nicht markiert):

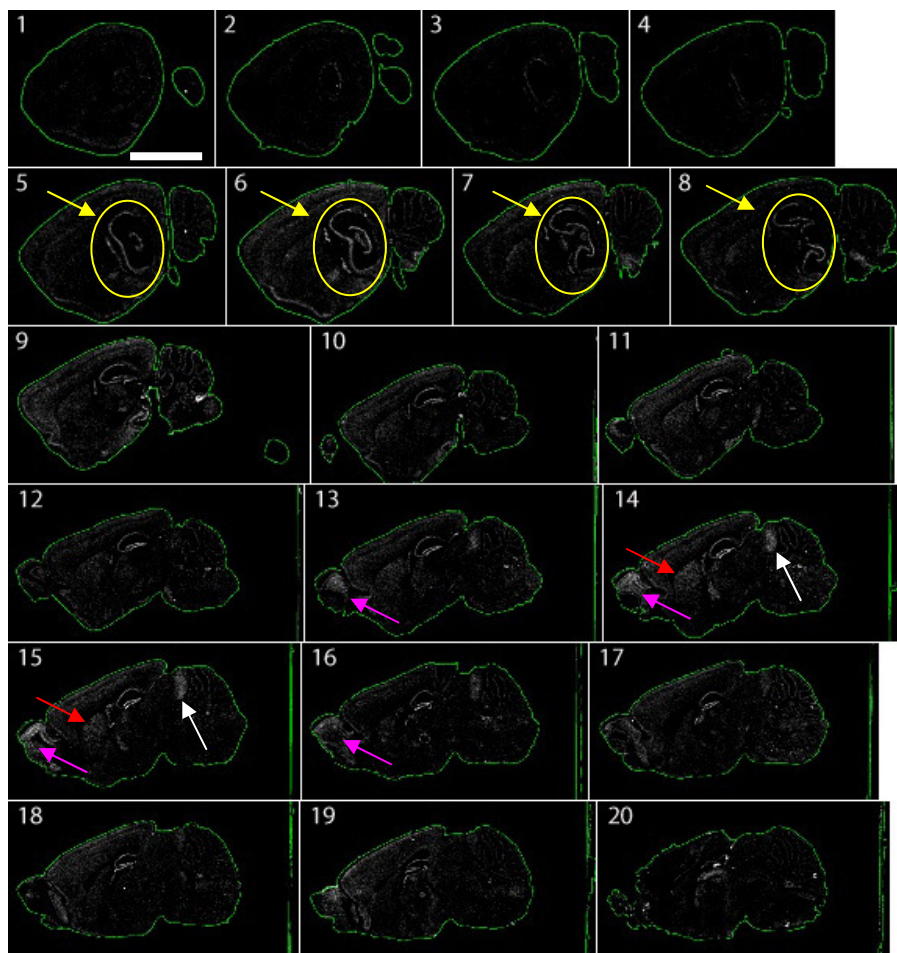


Abb. 42 Sagittalschnittserie von lateral (1) nach medial (20) durch das Gehirn der Maus zur Darstellung der Genexpression des Wdfy1-Proteins. Orte der Genexpression sind weiß gefärbt. Die Abbildungen wurden der Datenbank entnommen; Balken 1 cm

Orbital-Gebiet, somatomotorischer und somatosensorischer Teil, basolateraler und basomedialer Nucleus der Amygdala.

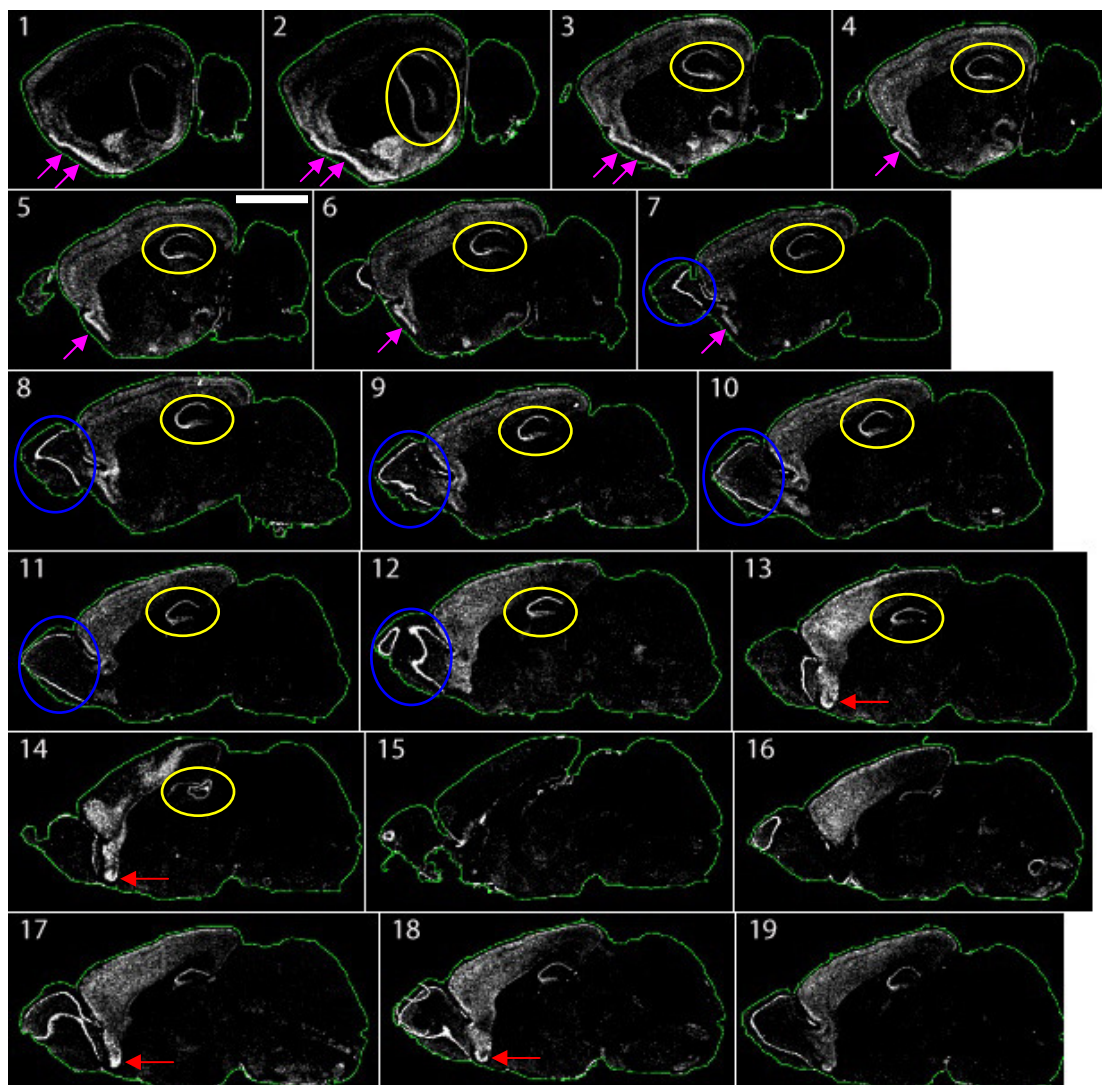


Abb. 43 Sagittalschnittserie von lateral (1) nach medial (19) durch das Gehirn der Maus zur Darstellung der Genexpression des Lcl2-Proteins. Orte der Genexpression sind weiß gefärbt. Die Abbildungen wurden der Datenbank entnommen; Balken 1 cm

4 Diskussion

Aufgrund der zentralen Bedeutung synaptischer Vesikel für die Informationsverarbeitung im Gehirn, versucht man dieses Schlüsselorganell und seine Funktionen im Detail zu verstehen. In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche Proteine, welche die Funktionen synaptischer Vesikel steuern, identifiziert und funktionell charakterisiert, so dass man ein grobes Bild davon hat, welche molekularen Vorgänge und Interaktionen an der Neurotransmitterfreisetzung beteiligt sind. Vieles wird jedoch noch nicht im Detail verstanden. Die Charakterisierung neu identifizierter Proteine ist Voraussetzung für ein detailliertes Verständnis der Prozesse, die dem Lebenszyklus synaptischer Vesikel zugrunde liegen. Hierbei liegt das Hauptaugenmerk zwar auf der Untersuchung hydrophober Membranproteine, jedoch könnten auch lösliche Proteine durchaus eine wichtige Funktion übernehmen. Ziel der Arbeit war es zum Einen erste Lokalisationsstudien zu den drei neuen Proteinen *leucin zipper domain protein*, *WD repeat and FYVE domain containing 1 isoform* und *testis-specific adriamycin sensitivity protein* durchzuführen. Desweiteren sollten die beiden Proteine Atlastin und DKFZp761B107 untersucht werden. Bei den ersten drei genannten Proteinen handelt es sich um neue Proteine. Bis auf DKFZp761B107, wurden alle Proteine in der Proteomanalyse synaptischer Vesikel von Jacqueline Burré 2006 identifiziert. DKFZp761B107 wurde in einer Hefe-2-Hybrid-Analyse als potentieller Interaktionspartner von Atlastin identifiziert. Für die drei neuen Kandidaten soll anhand der Ergebnisse in erster Linie die Frage erörtert werden, ob die Proteinfunktion im Zusammenhang mit synaptischen Vesikeln steht. Die Tatsache, dass die Proteine in einer Proteomanalyse synaptischer Vesikel identifiziert wurden, beantwortet diese Frage keineswegs. Es wurden auch zahlreiche Proteine gefunden, die allgemeine Aufgaben übernehmen. Für das Protein Atlastin liegen bereits Daten aus Lokalisations- und Funktionsstudien vor. Vieles deutet darauf hin, dass es sich um ein synaptisches Vesikelprotein handelt (Zhu et al., 2006). Die Befunde zur Lokalisation sollen im Rahmen des Projektes überprüft und die Frage geklärt werden, ob Atlastin mit DKFZp761B107 interagiert. Die Untersuchung von At-

lastin ist von besonderem Interesse, da es am Krankheitsbild der angeborenen spastischen Paraplegie maßgeblich beteiligt ist.

Zu Beginn der Arbeit stellte sich heraus, dass die Sequenzen der neuen Proteine nicht als Klone aus der Ratte verfügbar waren. Um mit den Originalsequenzen arbeiten zu können, hätte man zunächst die gesamte mRNA aus dem Rattenhirn isolieren, die entsprechenden cDNA's über RT-PCR herstellen und diese schließlich per PCR amplifizieren müssen. Die Alternative zu diesem Verfahren war, mit homologen Sequenzen aus einem anderen Organismus zu arbeiten. Diese Möglichkeit bringt einen gewissen Risikofaktor mit sich; da die Aminosäuresequenzen jedoch fast identisch sind, ist eine Konservierung der Funktion sehr wahrscheinlich. Zwei der drei neuen Proteine wurden als Klon aus der Maus und eines als humaner Klon bestellt.

Die Ziele der Arbeit (siehe Abschnitt 1.6) konnten nur teilweise erreicht werden. Von den drei neuen Proteinen wurde nur eines auf seine Lokalisation hin untersucht. Hierzu wurde es rekombinant in CHO-Zellen exprimiert und immunocytochemisch analysiert. Die Proteine Atlastin und DKFZp761B107 wurden ebenfalls rekombinant in CHO-Zellen exprimiert und immunocytochemisch analysiert. Zusätzlich wurden für Atlastin endogene Expressionsstudien mit Einzel - und Doppelfärbungen durchgeführt. Für alle drei neuen Proteine wurde *in silico* ermittelt, in welchen Gehirnarealen die entsprechenden Maus-Gene exprimiert werden.

4.1 Klonierung

Eine wichtige Voraussetzung für die Lokalisationsstudien mit den drei neuen Proteinen war die Herstellung von Konstrukten zur Expression in Säugerzellen. Dieses Zwischenziel meiner Arbeit wurde für die Proteine Wdfy1 und Lcl2 erreicht. Die proteincodierenden Sequenzen konnten in einem korrekten Leserahmen in den Expressionsvektor pcDNA 3.1 B(-) myc/his inseriert werden. Die Konstrukte konnten in Säugerzellen eingebracht werden und die entsprechenden Fusionsproteine, nach Expression unter einem CMV-Promotor mit einem Antikörper gegen das *Myc-tag*, immungefärbt bzw. in Western Blot detektiert werden. Das *c-Myc-tag* basiert auf der Interaktion eines Epitops und des Immunglobulins 9E10. Das *tag* wurde 1985 zum ersten Mal be-

schrieben und hat die Sequenz EQKLISEEDL. Über das Myc-tag können auch Protein-Interaktionen durch Immunpräzipitation nachgewiesen werden. Desweiteren kann das Myc-tag bei der Messung bestimmter Eigenschaften von Zellen mittels Durchflusszytometrie sehr nützlich sein. Auch lassen sich damit Proteine in Bakterien, Hefen und Insektenzellen nachweisen. Für die Proteinreinigung wird das tag selten genutzt, da man das Fusionsprotein über eine Absenkung des pH-Wertes eluiert und viele Proteine dadurch denaturiert werden. Der Vektor pcDNA 3.1 B(-) myc/his enthält im Anschluss an das Myc-tag auch ein Poly His-tag. Dieses Aminosäuremotiv besteht aus sechs Histidin-Resten und wird in erster Linie für die Affinitätsreinigung von Polyhistidin-getaggen rekombinanten Proteinen aus *E.coli* oder anderen prokaryotischen Expressionssystemen benutzt. Es kann jedoch auch zur Detektion von Proteinen über Anti-Poly-His-tag-Antikörper verwendet werden. Ausserdem besitzt der Vektor zur Sequenzierung Bindungsstellen für die Primer T7 und BGH, sowie Resistenz-Gene gegen Ampicillin und Neomycin.

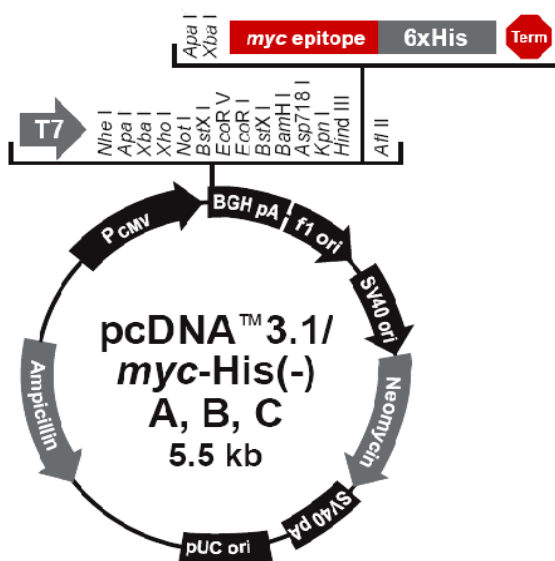


Abb. 44 Der Vektor pcDNA 3.1 B(-) myc/his. Er enthält den Promotor CMV, eine *multiple cloning site* mit den beiden Epitopen myc und His, sowie Resistenzgene gegen Ampicillin und Neomycin

Der im Ergebnisteil dargestellte Weg stellt den endgültigen Ablauf dar, aus dem schließlich positive Klone resultieren. Anfänglich wurde zur Restriktion des Vektors und der PCR-Produkte ein Doppelverdau durchgeführt. Die Ligationsansätze wurden per Elektroporation in *E.coli* transformiert. Unter diesen Bedingungen ergaben sich

keine Klone. Als kritische Schritte werden der Doppelverdau und die Transformation per Elektroporation vermutet. Das Enzym *HindIII* hat unter den verwendeten Pufferbedingungen laut Hersteller eine Aktivität von nur 50-100%. Dies sollte zwar bei entsprechender Inkubationsdauer der Ansätze ausreichen, ist jedoch nicht optimal. Transformation von *E.coli* mit Ligationsansätzen per Elektroporation hat sich bereits in vorangehenden Experimenten als schwierig erwiesen. Zunächst wurde eine Transformation durch Hitzeschock getestet, wodurch jedoch keine Änderung erzielt wurde. Um herauszufinden, welchen Einfluss die Art der Restriktion auf die Klonierung hat, wurden sowohl Vektor, als auch PCR-Produkte einzeln verdaut. Unter diesen Voraussetzungen werden nach Hitzeschock-Transformation der Ligationsansätze Klone gebildet, nicht jedoch nach Elektroporation. Scheinbar waren demnach beide Faktoren, Doppelverdau und Elektroporation, für das Misslingen des Experimentes entscheidend gewesen. Um sicher eine erfolgreiche Restriktion durchzuführen, ist also eine 100%ige Aktivität beider Enzyme notwendig. Dies ist nur unter den für das Enzym vorgesehenen Pufferbedingungen gewährleistet. Was die Transformation betrifft, so gilt das Verfahren mittels Hitzeschock als das Effizientere. Das heißt, dass im Schnitt weniger Zellen durch den Schock sterben, als durch Elektroporation. Doch warum lassen sich die Bakterien mit aufgereinigten Plasmiden per Elektroporation problemlos transformieren, mit Ligationsansätzen jedoch nicht? Dies liegt daran, dass in Ligationsansätzen die Menge an Vektoren meist sehr gering ist, während davon auszugehen ist, dass aufgereinigte Vektoren hochkonzentriert vorliegen.

Bei der Amplifikation der Insert-Sequenzen mittels PCR wurden zwar auf Anhieb die richtigen Produkte amplifiziert, jedoch waren die entsprechenden Bänder sehr schwach, besonders für das Lcl2-Fragment. Die relativ schlechte Ausbeute lässt sich auf die *Pfu*-Polymerase zurückführen, da mit dem gleichen Programm und einer rekombinanten *Taq*-Polymerase deutlich stärkere Bänder erzielt wurden. Wie sich jedoch herausstellte, wird dieser Vorteil der rekombinanten *Taq*-Polymerase durch ungenaue Polymerisation der Nukleotide ausgeglichen. Wie lassen sich die Schwierigkeiten bei der Amplifikation der dritten Sequenz erklären? Die Sequenz des Lcl2-Proteins wird erst mit höheren Annealing-Temperaturen amplifiziert. Ein Grund hierfür könnte die hohe Schmelztemperatur des Primers sein. Im Gegensatz zu den Primern für die beiden

anderen Sequenzen wurden Forward- und Reverseprimer erst bei Temperaturen über 60°C denaturiert.

Die codierende Sequenz des Rh-Proteins konnte leider nicht korrekt in den Vektor pcDNA 3.1 B(-) myc/his eingefügt werden. Der Grund dafür besteht in einem Stopp-Codon, das die Aminosäuresequenz des Proteins unterbricht. Dieses entstand wahrscheinlich durch die Amplifikation der Insert-Sequenz mit der rekombinanten *Taq*-Polymerase. Dieses Enzym katalysiert Template-abhängig die Polymerisation von Nukleotiden in 5'→3'-Richtung, hat jedoch keine 3'→5' Exonuklease-Aktivität, die das Entfernen fehlerhaft eingebauter Nukleotide ermöglicht. Auch die Strategie, die Sequenz über das In Fusion dry down PCR cloning kit zu inserieren, ist fehlgeschlagen. Obwohl alle Angaben und Empfehlungen des Herstellers befolgt wurden, kam es nicht zu Bildung von Kolonien nach der Transformation. Um das Konstrukt mit der korrekt inklonierten Sequenz zu erhalten, ist es daher zu empfehlen, die in Abschnitt 3.1.1 beschriebene Strategie zu befolgen. Hier könnten zunächst weitere Klone analysiert werden. Diese müssen zwangsläufig auch das Stopp-Codon enthalten. Hierbei spielt der Zeitpunkt des fehlerhaften Einbaus während der PCR-Amplifikation eine Rolle. Wurden die fehlerhaften Nukleotide beispielsweise in einem der ersten Zyklen eingebaut, so tragen vermutlich die meisten DNA-Fragmente das Stopp-Codon. Umgekehrt besteht die Möglichkeit, daß ein großer Teil der Fragmente das Stopp-Codon nicht trägt, falls der fehlerhafte Einbau in einem der letzten Zyklen der PCR-Amplifikation erfolgte. Da das Sequenzieren von DNA mit einem zusätzlichen Kostenfaktor verbunden ist, liegt es nahe, das entsprechende PCR-Programm zu optimieren und die codierende Sequenz des Proteins erneut zu amplifizieren. Hier könnte man zum Beispiel die *Taq*-Polymerase in Kombination mit der *Pfu*-Polymerase einsetzen und die Zyklenzahl des entsprechenden PCR-Programms erhöhen. Auf diese Weise sollten zwei wichtige Faktoren gewährleistet sein; Zum Einen sorgt die 3'→5'-Exonuklease-Aktivität der *Pfu*-Polymerase für sofortiges Austauschen fehlerhaft eingebauter Nukleotide und gewährleistet somit die Voraussetzung für einen korrekten Leserahmen. Zum Anderen sollte durch die Kombination von *Taq*-Polymerase und einer erhöhten Zyklenzahl eine hohe Ausbeute relativ sicher sein.

4.2 Transfektion und Immuncytochemie

Für die rekombinante Expression der Proteine werden CHO-Zellen verwendet. Da es sich um Säugerproteine handelt, sollten Säugerzellen die beste Wahl sein. In den meisten Fällen werden die Proteine dann so modifiziert und gefaltet, wie sie sollen. Für erste Lokalisationsstudien eignen sich CHO-Zellen aufgrund ihrer Größe sehr gut, ausserdem lassen sie sich, im Gegensatz zu PC12-Zellen, leicht transfizieren. Es handelt sich also nicht um Überexpressionen, sondern um heterologe Expressionen. Um die Fremd-DNA in die Säugerzellen zu bringen, werden diese elektroporiert. Bei dieser physikalischen Transfektionsmethode werden die Zellen mit nackter DNA traktiert. Es gibt auch die Möglichkeit, DNA über Viren in die Zellen einzuschleusen. Virale Expressionssysteme bieten den Vorteil, bis zu 100% der Zellen infizieren zu können, während andere Transfektionsmethoden sich meist mit Erfolgsraten im Bereich von 10-20% begnügen müssen. Dies ist zwar für die Arbeit im Labor positiv, stellt jedoch vom Sicherheitsaspekt ein großes Problem dar. Während der Vorgang mit Expressionsplasmiden meist unproblematisch verläuft und die entsprechenden Arbeiten in einem S1-Labor durchführbar sind, müssen Experimente mit Viren, bis auf wenige Ausnahmen, in einem S2-Labor durchgeführt werden. Durch Mutation, Rekombination und Kontamination können während der Arbeit Wildtyp-Viren entstehen, die sich dann unter Umständen unkontrolliert vermehren und verbreiten. Ein weiterer Vorteil ist, neben der hohen Transfektionsrate, die Tatsache, dass Viren häufig auch hohe Expressionsraten haben. Bestimmte Viren, zum Beispiel Retroviren, können sich selbstständig in das Genom des Wirtes einlagern, eine Tatsache, die für die Herstellung stabil transfizierter Zellen nützlich ist. Andererseits ist die Herstellung von Konstrukten oft schwieriger, da virale Genome meist erheblich größer sind, als Plasmid-Expressionsvektoren. Ausserdem ist die DNA-Menge, die einbaubar ist, begrenzt. Neben der Elektroporation gibt es zahlreiche andere Methoden, um nackte DNA in Säugerzellen zu befördern. Sie bringen alle den Nachteil einer relativ geringen Transfektionseffizienz mit sich. Der Anteil an transfizierten Zellen ist sehr stark vom Zelltyp und den jeweiligen Bedingungen abhängig. Um Zellen zu transfizieren, sollte man sich zuvor kundig machen, welche Methode sich bei vergleichbaren Versuchen und Zelllinien bereits bewährt hat. Für meine Arbeit bot sich die Elektroporation an, da sie sich

erstens für die Transfektion von CHO-Zellen bewährt hat und zweitens ein entsprechendes Elektroporationsgerät verfügbar war. Ein Nachteil dieser Methode ist die größere Menge an DNA und Zellen, die beispielsweise im Vergleich zur Calciumphosphat-Transfektion benötigt wird.

Leider wurden nicht alle geplanten Experimente erfolgreich beendet. Für das Rh-Protein (Mausklon des *leucin zipper domain proteins*) beispielsweise konnte kein Konstrukt zur Expression in Säugerzellen hergestellt werden. Da ein geeigneter Expressionsvektor die notwendige Voraussetzung der Lokalisationsstudien ist, konnten diese Experimente auch nicht durchgeführt werden. Für das Wdfy1-Protein wurde zwar ein Konstrukt hergestellt, das entsprechende Fusionsprotein ließ sich jedoch nach Transfektionsversuchen nicht nachweisen. Hierfür gibt es verschiedene mögliche Ursachen. Da die Zellen für die Immunfärbung genau wie Zellen, die mit dem Lcl2-Konstrukt transfiziert worden sind (Versuch verlief erfolgreich), behandelt wurden, und dennoch kein Fusionsprotein zu sehen war, ist davon auszugehen, dass die Plasmide gar nicht von den Zellen aufgenommen wurden. Warum gab es Probleme bei der Transfektion? Diese Problematik lässt sich an dieser Stelle leider nicht eindeutig klären. Die Pulsdauer für die Elektroporation lag bei 4,26 ms, was der Norm entspricht. Es ist auch möglich, dass eine sehr niedrige Transfektionseffizienz vorlag und die wenigen transfizierten Zellen an Folgeerscheinungen des elektrischen Pulses oder aus anderen stressbedingten Gründen starben. Das Experiment ist unter möglichst stressfreien Bedingungen für die Zellen zu wiederholen. Für die Zellen sollten auch vor der Elektroporation optimale Bedingungen angestrebt werden. Standardmäßig werden 50µg DNA zum transfizieren eingesetzt. Es besteht auch die Möglichkeit zu testen, ob die Verwendung von mehr oder weniger als 50µg DNA sich positiv auf den Ausgang des Versuchs auswirkt. Ausserdem könnte man die Menge der verwendeten Zellen erhöhen. Im Rahmen des Projektes ergaben sich unerwartete Probleme bei der Klonierung der neuen Proteine, so dass sich aus zeitlichen Gründen keine Experimente mehr anschliessen konnten. Die Proteine werden dennoch anhand der in silico-Daten diskutiert. Es wird darauf hingewiesen, dass die hierbei erwähnten Aspekte eher spekulativer Natur sind und nicht auf experimentellen Befunden zur Lokalisation basieren.

Was Atlastin und DKFZp761B107 betrifft, so kam es ebenfalls aus zeitlichen Gründen nicht zu Kollokalisationsstudien der beiden Proteine zum Nachweis der Interaktion. Die Arbeit mit den erhaltenen Konstrukten erwies sich als besonders mühselig. Einer der Vektoren (Atlastin-Nr.3; Abschnitt 3.2) enthielt nicht das angegebene Epitop zur Markierung des Proteins. Ein anderes Plasmid (Atlastin-Nr.2; Abschnitt 3.2) funktionierte aus unerklärlichen Gründen nicht. Die erfolgreiche Transfektion von CHO-Zellen und anschließende Immunfärbung der beiden Proteine erfolgte zu einem relativ späten Zeitpunkt des Projektes. Auch die Nachweise aller untersuchter Proteine, sowohl aus CHO-, als auch aus PC12-Zellen, mittels Western Blot Analyse erfolgte mangels Zeit nicht mehr.

4.3 Leucin zipper domain protein

Das *leucin zipper domain protein* enthält gemäß der Vorhersage verschiedene konservierte Domänen (siehe Abschnitt 1.4.1). Hervorzuheben ist vor allem das *leucin zipper* Motiv, das in Proteinen vorkommt, die an der Regulation der Genexpression beteiligt sind. Das Motiv ermöglicht eine Interaktion mit der DNA. Sollte das Protein eine solche Funktion ausüben, könnte es sich um ein neuronenspezifisches Protein handeln, es könnte aber auch in anderen Zellen vorkommen. Auch die BAR- Domäne, die ähnlich wie die FYVE- Domäne in Endocytoseprozesse und einige Schritte des intrazellulären Transports involviert ist, könnte eine Rolle für das Protein spielen. Das Vorkommen dieser Domäne könnte im Zusammenhang mit einer synaptischen vesikelspezifischen Funktion stehen, impliziert diese aber nicht zwangsläufig, da die erwähnten Prozesse auch in anderen Zelltypen, ausser Neuronen, eine Rolle spielen. Die anderen Domänen lassen offen, ob das Protein eine synaptische vesikelspezifische Funktion, eine andere neuronenspezifische Funktion oder eine vom Zelltyp unabhängige Aufgabe übernimmt. Gemäß der Vorhersage ist es ein lösliches Protein, dass man im extrazellulären Raum, im Cytoplasma, im Zellkern und in Vesikeln des sekretorischen Systems findet. Die Lokalisation im extrazellulären Raum, sowie in Vesikeln des sekretorischen Systems untermauern die Annahme, das Protein sei an Endocytoseprozessen beteiligt. Die *in silico in situ* Hybridisierungsdaten zeigen, dass das Gen in nahezu allen Hirnarealen

relativ stark exprimiert wird. Dies deutet auch auf eine allgemeine zelluläre Funktion des *leucin zipper domain proteins* hin.

4.4 WD repeat and FYVE domain containing 1 isoform 1

Aufgrund der Vorhersage konservierter Domänen sind für dieses Protein eine Vielzahl von Funktionen denkbar. Interessant ist, daß WD- haltige Proteine meist durch Koordination von Multiproteinkomplex- Assemblaten agieren. Sie sind an einer Menge zellulärer Funktionen beteiligt. Das Vorkommen einer Myosin- Domäne deutet auf eine Motorfunktion des Proteins hin. Es gibt jedoch auch Proteine ohne Motorfunktion, die eine solche Domäne aufweisen. Die Ubiquitin- Domäne wird für eine Vielzahl molekularer Vorgänge genutzt, abhängig von der subzellulären Lokalisation, der Proteinart und der Art der kovalenten Bindung (Larsen and Wang, 2002). Die RING- Domäne lässt vermuten, dass das Protein am proteasomalen Abbau- Weg beteiligt ist. Hierbei könnte die intrinsische E3 Ubiquitin- Ligaseaktivität der Domäne die Substratspezifität für die Ubiquitinierung bestimmen. In der Proteomanalyse synaptischer Vesikel aus dem Rattenhirn, die von Jaqueline Burré durchgeführt wurde, identifizierte man das Proteasom als Bestandteil dieses Kompartiments. Desweiteren enthält das Protein wahrscheinlich eine FYVE-Domäne, die Phosphatidylinositol-3-Phosphat binden kann, was auf eine Funktion im endosomalen *targeting* hindeutet. Die Analyse der konservierten Domänen lässt keine Spezifizierung der Proteinfunktion auf Neurone allgemein oder synaptische Vesikel zu. Die durchgeführten Homologie-Studien lassen ebenfalls keine tiefergehenden Hypothesen über die Funktion des Proteins zu. Weitere *in silico*-Studien sagen voraus, dass es sich um ein lösliches Protein handelt, das extrazellulär bzw. mitochondrial, lokalisiert ist. Die Möglichkeit, das Protein im extrazellulären Raum zu finden, lässt sich mit der Vorstellung in Einklang bringen, dass es eine Rolle im endosomalen *targeting* spielt. Die *in silico in situ*- Hybridisierungsdaten lassen offen, ob es sich um ein neuronenspezifisches Protein handelt oder nicht, da es in fast allen Regionen des Gehirns schwach exprimiert wird. Deutlich stärker wird das Gen in Teilen des Hippocampus, des Striatums und den Colliculi inferiores exprimiert. Um,

basierend auf diesen Daten, Spekulationen zur Funktion des Proteins machen zu können, müsste man zunächst klären, um welche Typen von Neuronen es sich handelt. Hierzu könnte man in situ Hybridisierungen mit Sonden gegen jeweils einen bestimmten Neuronentyp (Bsp.: glutamaterge Neurone) durchführen. Würde die entsprechende mRNA beispielsweise nur in cholinergen Neuronen detektiert, so wäre eine Beteiligung an diesem Syntheseweg wahrscheinlich.

Berücksichtigt man alle Aspekte, so ist nicht von einer speziellen Funktion im Zusammenhang mit synaptischen Vesikeln auszugehen. Vielmehr könnte das Protein an allgemeinen zellulären Prozessen beteiligt sein, die nicht nur in Neuronen stattfinden, sondern auch in anderen Zelltypen.

4.5 Testis specific adriamycin sensitivity protein

Das testis-specific adriamycin sensitivity protein wurde wie die beiden anderen neuen Proteine erstmals in einer Proteomanalyse synaptischer Vesikel identifiziert (Burré et al., 2006). Es war daher zu untersuchen, ob dem Protein im Lebenszyklus dieses Organells eine Aufgabe zukommt. Eine weitere Alternative ist, dass es keine vesikelspezifische Funktion übernimmt und dennoch in der Proteomanalyse synaptischer Vesikel identifiziert wird. Die entsprechende cDNA für das humane LANCL2 wurde bereits identifiziert und charakterisiert (Mayer et al., 2001) Es handelt sich um ein Mitglied der eukaryotischen LanC-ähnlichen Proteinfamilie. Diese Proteine enthalten alle die LanC-ähnliche Domäne. Die Lantibiotika Synthetase Komponente C ist in Prokaryoten an der Synthese der antibiotisch wirksamen Peptiden beteiligt. Lantibiotika enthalten die seltenen Thioether- Aminosäuren Lanthionin und / oder Methyllanthionin (Schnell et al., 1988). Diese seltenen Aminosäuren bilden intramolekulare Ringstrukturen aus. Im Gegensatz zu Peptidantibiotika wie Gramicidin S werden Lantibiotika aus ribosomal gebildeten Vorläuferproteinen durch posttranslationale Modifikation gebildet. Dieser ribosomale Biosynthesemechanismus wurde durch die Identifizierung und Sequenzierung der Strukturgene bewiesen, die für die entsprechenden Vorläuferproteine kodieren (Banerjee et al., 1988; Buchmann et al., 1988). Die Vorläuferpeptide werden durch drei verschiedene Proteine modifiziert. Zunächst dehydratisieren die etwa 1000

Aminosäure großen LanB-Proteine bestimmte Serin- und Threonin- Reste. Die LanB-Proteine sind vermutlich mit der Membran assoziiert. (Engelke et al., 1992; Gutowski-Eckel et al., 1994; Peschel et al.;1996). Dann sorgen die LanC-Proteine für die Thioetherbildung und die korrekte Faltung der modifizierten Peptide (Meyer et al., 1995; Kupke und Götz , 1996). LanC- Proteine bestehen aus etwa 400 Aminosäuren in alternierenden hydrophoben und hydrophilen Segmenten. Nach Beendigung der Modifikationen des Propeptids wird das Leaderpeptid durch eine subtilisinähnliche Serinprotease LanP an einer konservierten Schnittstelle abgespalten. Das fertige Peptid wird entweder vor oder nach der Abspaltung in den extrazellulären Raum transportiert. Bei der Synthese bestimmter Lantibiotika werden die ersten beiden nicht von LanB- und LanC- Enzymen durchgeführt. Stattdessen codieren die entsprechenden Gencluster für ein einzelnes Modifikationsenzym, das vermutlich für die Thioetherbildung und die Dehydratisierung verantwortlich ist. Der C-Terminus dieser etwa 1000 Aminosäure großen LanM- Proteine weist Ähnlichkeiten zu den LanC- Proteinen auf, während das N-terminale Segment keine Ähnlichkeiten zu den LanB-Proteinen besitzt (Siezen et al.,1996). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu LanC wird für LANCL2 eine Rolle als Komponente in einem peptidmodifizierenden Komplex vermutet (Mayer et al., 2001). Es könnte ebenfalls die erwähnten peptidmodifizierenden Funktionen ausführen. Entweder nur die Thioetherbildung oder zusätzlich die Dehydratisierung bestimmter Peptide. Doch welche Peptide werden modifiziert? LANCL2 wird im Gehirn und den Testis exprimiert, Organe die durch Blut-Gewebe-Barrieren abgetrennt sind. Es wäre denkbar, dass LANCL2 ebenfalls an der Synthese antimikrobieller Peptide beteiligt und somit für die Immunüberwachung dieser Organe wichtig ist. Diese Hypothese wurde bereits für LANCL1 aufgestellt (Mayer et al., 2001). Lokalisationsvorhersagen deuten darauf hin, daß das Protein löslich ist und seine Funktion im Cytoplasma ausübt. Dies lässt sich durchaus mit der Vorstellung eines Antibiotika-synthetisierenden Enzyms in Einklang bringen. Andererseits könnte das Protein auch in Mitochondrien anzutreffen sein. Hierbei könnte es zum Beispiel bei der Bildung der Thioetherbindung zwischen Cytochrom C und der prosthetischen Gruppe Häm involviert sein. Die Immunfärbung bestätigt, dass es sich um ein lösliches Protein handelt, das im Cytoplasma lokalisiert ist. Eine Alternative wäre, dass LANCL2 im Cytoplasma an der Bildung von

Thioetherbindungen, bzw. der Dehydratisierung von anderen Proteinen, ausser von Antibiotika, beteiligt ist. Die Ergebnisse der *in silico* Hybridisierung sind auch hier nicht besonders aussagekräftig, da anhand der vorliegenden Daten nicht klar wird, in welchen Neuronentypen die Transkripte vorkommen.

4.6 **Atlastin und DKFZp761B107**

Die Immunfärbung des rekombinant exprimierten Proteins in CHO-Zellen bestätigt eine membranäre Lokalisation nicht eindeutig. Atlastin scheint überall in der Zelle verteilt zu sein, was auf eine cytosolische Lokalisation hindeutet. In Zellkernnähe liegt es jedoch akkumuliert vor. Diese perinukleäre Färbung könnte eine Lokalisation des Proteins in den Membranen oder im Lumen des Golgi-Apparates bedeuten. Atlastin ist ein bekanntes Membranprotein mit zwei Transmembrandomänen und seine Lokalisation im Golgi-Apparat konnte bereits gezeigt werden (Zhu et al., 2003). Wieso liegt das Protein auch in anderen Zellregionen vor? Es ist vorstellbar, daß die Expression des Gens unter dem im Vektor enthaltenen CMV-Promoter sehr stark verlaufen ist, so daß das Protein im Überschuss in der Zelle vorhanden ist und nur ein Teil der Proteinkopien korrekt lokalisiert werden kann. Es ist logisch, daß in einem zellulären Kompartiment nicht unendlich viele Proteine Platz finden. Überschüssige Exemplare würden sich auf diese Weise in anderen Bereichen der Zelle verteilen, in denen das Protein unter natürlichen Bedingungen nicht vorkommen würde. Um diese Problematik zu klären und um Atlastin in axonalen Ausläufern nachzuweisen, wurden Immunfärbungen des endogenen exprimierten Proteins in ausdifferenzierten PC12-Zellen gemacht. Die Färbungen zeigen zwar keine perinukleäre Lokalisation, bestätigen also Atlastin nicht als Protein des Golgi-Apparates, demonstrieren jedoch eindeutig das Vorkommen in axonalen Ausläufern und Wachstumskegeln. Ausserdem deutet die schwache punktuelle Verteilung auf eine vesikuläre Lokalisation hin. Desweiteren wird die membranäre Lokalisation durch eine eindeutig punktuelle Markierung des Proteins demonstriert. Die Funktion und die molekularen Mechanismen von Atlastin sind noch nicht eindeutig geklärt. Es spielt wahrscheinlich bei der Axonbildung und Verlängerung während der neuronalen Entwicklung eine Rolle (Zhu et al., 2006). Steht die zelluläre

Lokalisation im Einklang mit der vermuteten Funktion des Proteins? Synaptische Vesikel, die an der Ca^{2+} -regulierten Exocytose beteiligt sind, werden lokal regeneriert. Das heißt, sie stammen nicht direkt vom Golgi-Apparat. Von diesem werden zwar auch Vesikel abgeschnürt und entlang des Axons zur präsynaptischen Endigung transportiert, verschmelzen aber dann ohne Neurotransmitterfreisetzung mit der präsynaptischen Membran. Diese Form der Exocytose dient zum Beispiel der Freisetzung bestimmter Proteine in den extrazellulären Raum oder der Einlagerung von Membranproteinen in die präsynaptische Membran. Diese Proteine können zum Beispiel Transporter für Neurotransmitter sein. Es ist also durchaus möglich, dass Proteine, die ihre Aufgabe in axonalen Endigungen ausführen auch im Golgi-Apparat gefunden werden. Generell müssen alle Proteine synaptischer Vesikel auf dem Weg zu ihrem Bestimmungsort den Golgi-Apparat passieren. Andererseits könnte Atlastin auch im Golgi-Apparat eine andere Funktion ausüben als in axonalen Wachstumskegeln. Gesehen in diesen Fall, könnten diese Atlastinproteine jedoch nicht von den Atlastinmolekülen der Axonbildung unterschieden werden. Topologische Ähnlichkeiten mit den zwei mitochondrialen Proteinen Mfn1 und Mfn2 deuten auf eine Rolle für Atlastin in Membranfusionsprozessen zwischen endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparat hin. Mfn1 und Mfn2 vermitteln mitochondriale Fusionen (Chen et al., 2005). Es wäre auch möglich, dass Atlastin die Axonbildung auf die gleiche Weise vermittelt wie die Membranfusionsprozesse im Zellsoma. Lokalisationsstudien deuten jedoch auf einen anderen Mechanismus hin (Zhu et al., 2006). Aufgrund der Doppelfärbungen wird die Kollokalisierung mit anderen endogen exprimierten synaptischen Vesikelproteinen, VAMP2, Synaptophysin und Syntaxin, in vesikulären Strukturen entlang der axonalen Ausläufer und in den Wachstumskegeln gezeigt. Diese drei Proteine sind bekannte integrale Membranproteine synaptischer Vesikel. Sie übernehmen wichtige Aufgaben bei exocytotischen Transmitterfreisetzungen. Die Kollokalisierungen mit Atlastin als Protein bestätigen dieses als Protein synaptischer Vesikel. Für Synaptophysin und Syntaxin sind ausserdem deutlich perinukleäre Markierungen erkennbar, die auf eine Lokalisation im Golgi-Apparat hindeuten. Diese Proteine sind wahrscheinlich zum Zeitpunkt der Fixierung auf dem Weg zu ihrem Bestimmungsort gewesen. Die Doppelfärbung mit dem Protein 58K zeigt eine starke perinukleäre Färbung des Golgi-Markers, jedoch keine

Lokalisation mit Atlastin. Die unterschiedlichen Färbungen bestätigen Atlastin zwar als membranäres Protein synaptischer Vesikel, können aber leider nicht zur Klärung der molekularen Mechanismen des Proteins beitragen. Die Immunfärbung des rekombinant exprimierten Proteins DKFZp761B107 in CHO-Zellen deutet auf ein lösliches Protein mit cytoplasmatischer Lokalisation hin. Um den Zellkern ist es besonders stark angereichert und scheint sogar im Zellkern vorzukommen. Man kann aufgrund der perinukleären Anreicherung jedoch nicht ohne weiteres auf eine Funktion von DKFZp761B107 im Golgi-Apparat schließen. Als lösliches Protein könnte es zu einer Anreicherung im Lumen dieses Kompartiments kommen. Fast alle Proteine müssen auf dem Weg zu ihrem Bestimmungsort den Golgi-Apparat passieren. Bei der Betrachtung von Färbungen bei rekombinant exprimierten Proteinen ist immer zu bedenken, daß es durch Expression unter dem CMV-Promotor zu einem Überschuss an Proteinen kommen kann, der mit den natürlichen zellulären Verhältnissen nicht vergleichbar ist. Dieser Aspekt ist auch bei der Interpretation der Tatsache zu berücksichtigen, dass DKFZp761B107 im Zellkern vorkommt. Anhand der Befunde kann eine Interaktion des Proteins weder bestätigt, noch ausgeschlossen werden. Um die Interaktion mit Atlastin genauer zu untersuchen sind Doppelfärbungen beider Proteine notwendig. Hierzu kam es aus zeitlichen Gründen im Rahmen meiner Diplomarbeit leider nicht mehr.

4.7 Ausblick

Zunächst sollten die Lokalisationsstudien der drei neuen Proteine in CHO-Zellen beendet werden. CHO-Zellen eignen sich zwar für erste Versuche gut, da sie recht groß sind und sich relativ leicht transfizieren lassen, stammen jedoch aus den Ovarien chinesischer Hamster. Es ist davon auszugehen, daß man aussagekräftige Resultate nur dann erhält, wenn die Proteine in ihrer natürlichen Umgebung untersucht werden, also in dem Zelltyp, in dem sie gefunden wurden. Um die subzelluläre Lokalisation genau zu bestimmen, ist es daher sinnvoll, neuronale Zellen mit den entsprechenden Konstrukten zu transfizieren und die rekombinant exprimierten Proteine nach Immunfärbung mit konfokaler Lasermikroskopie zu analysieren. Mit dieser Technik erhält man hoch aufgelöste Bilder, sowie dreidimensionale Rekonstruktionen. Die Haupteigen-

schaft dieses Verfahrens ist die Fähigkeit, scharfe Bilder von relativ dicken Präparaten in unterschiedlichen Tiefen zu produzieren. Um mehr über die Proteine zu erfahren, sollten sich immunhistochemische Analysen von Hirnschnitten anschliessen. Zuvor müssten entsprechende Antikörper gegen die Proteine generiert werden. Auch die Durchführung von in situ Hybridisierungen sollten weitere Aufschlüsse über Erkenntnisse zu Proteinen liefern. Gelangt man aufgrund der Befunde zu der Annahme, dass den neuen Kandidaten bedeutende Aufgaben zu Nervenzellen zukommen, würde man die Gene zunächst per siRNA in einem geeigneten Organismus herunterregulieren. Auch die Aufreinigung der Proteine über das His-tag bietet Möglichkeiten für weitere funktionelle Studien.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die, den neuen Proteinen *WD repeat and FYVE domain containing 1 isoform 1* und *testis specific adriamycin sensitivity protein* homologe, cDNA-Sequenzen aus der Maus in den Expressionsvektor pcDNA 3.1 B(-) myc/His inseriert. Mit der Klonierung wurde der Grundstein für wichtige Lokalisations- und Funktionsanalysen gelegt. So konnten für das *testis specific adriamycin sensitivity protein* basierend auf dem hergestellten Konstrukt erste Lokalisationsstudien in CHO-Zellen durchgeführt werden. Es handelt sich mit großer Wahrscheinlichkeit um ein lösliches Protein.

Atlastin wurde ebenfalls rekombinant in CHO-Zellen exprimiert. Ausserdem wurde anhand endogener Expressionsstudien in PC12-Zellen die Kollokalisierung mit den Proteinen Synaptobrevin, Synaptophysin, Syntaxin 1 und 58K untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass es sich um ein Membranprotein handelt. Ausserdem wird die zelluläre Lokalisation in vesikulären Strukturen entlang axonaler Ausläufer, sowie in Wachstumskegeln bestätigt.

Weiterhin wurde DKFZp761B107 durch rekombinante Expression in CHO-Zellen auf seine Lokalisation hin analysiert. Die vorliegenden Resultaten deuten darauf hin, dass auch dieses Protein löslich ist. Eine Interaktion mit Atlastin hingegen gilt es in weiterführenden Experimenten zu zeigen.

6 Literaturverzeichnis

Arata, Y., Nishi, T., Kawasaki-Nishi, S., Shao, E., Wilkens, S., Forgac, M. (2002): Structure, subunit, fraction and regulation of the coated vesicle and yeast vacuolar (H⁺)-ATPases. *Biochem. Biophys. Acta* 1555: 71-74

Archer, D.A., Graham, M.E., Burgoyne, R.D. (2002): Complexin regulates the closure of the fusion pore during regulated vesicle exocytosis. *J. Biol. Chem.* 277: 18249-52

Augustin, I., Rosenmund, C., Südhof, T.C., Brose, N. (1999): Munc13-1 is essential for fusion competence of glutamatergic synaptic vesicles. *Nature* 400(6743):457-61

Augustin, I., Korte, S., Rickmann, M., Kretschmar, H., Südhof, T.C., Herms, J.W., Brose, N. (2001): The cerebellum-specific Munc13 isoform Munc13-3 regulates cerebellar synaptic transmission and motor learning in mice. *J. Neurosci.* 21(1):10-7

Bajjalieh, S.M., Frantz, G.D., Weimann, J.M., McConnell, S.K., and Scheller, R.H. (1994): Differential expression of synaptic vesicle protein 2 (SV2) isoforms. *J. Neuroscience* 14: 5223-5235

Banerjee, S., and Hansen, J.N. (1988): Structure and expression of a gene encoding the precursor of subtilin, a small protein antibiotic. *J. Biol. Chem.* 263, 9508-9514

Barker, L.A., Dowdall, M.J., Whittaker, V.P. (1972): Choline metabolism in the cerebral cortex of guinea pigs. Stable-bound acetylcholine. *Biochem. J.* 130: 1063-75

Betz, A., Ashery, U., Rickmann, M., Augustin, I., Neher, E., Südhof, T.C., Rettig, J., Brose, N. (1998): Munc13-1 is a presynaptic phorbol ester receptor that enhances neurotransmitter release. *Neuron* 21(1):123-36

Betz, A., Thakur, P., Junge, H.J., Ashery, U., Rhee, J.S., Scheuss, V., Rosenmund, C., Rettig, J., Brose, N. (2001): Functional interaction of the active zone proteins Munc13-1 and RIM1 in synaptic vesicle priming. *Neuron* 30(1):183-96

Bock, J.B., Matern, H.T., Peden, A.A., Scheller, R.H. (2001): A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature* 409: 839-41

Brose, N., Hofmann, K., Haza, Y., Südhof, T.C. (1995): Mammalian homologues of *Caenorhabditis elegans* unc-13 gene define novel family of C₂-domain proteins. *J. Biol. Chem.* 270: 25273-80

Brose, N., Rosenmund, C., Rettig, J. (2000): Regulation of transmitter release by unc-13 and its homologues. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10:303-311

Buchman, G.W., Banerjee, S., and Hansen, J.N. (1988): Structure, expression, and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. *J. Biol. Chem.* 263, 16260-16266

Buckley, K.M., Kelly, R.B. (1985): Identification of a transmembrane glycoprotein specific for secretory vesicles of neural and endocrine cells. *J. Cell Biol.* 100: 1284-1294

Burré, J., Beckhaus, T., Schägger, H., Convey, C., Hofmann, S., Karas, M., Zimmermann, H., Volkandt, W. (2006): Analysis of the synaptic vesicle proteome using three gel-based protein separation techniques. *Proteomics* 6: 6250-62

Chen, H., Chan, D.C. (2005): Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Hum. Mol. Genet.* 14: 283-289

Dietrich, D., Kirschstein, T., Kukley, M., Pereverzev, A., von der Brélie, C., et al. (2003): Functional specialization of presynaptic Cav2.3 Ca²⁺ channels. *Neuron* 39: 483-96

Dunaevsky, A., Connor, E.A. (2000): F-actin is concentrated in nonrelease domains at frog neuromuscular junctions. *J. Neurosci.* 20: 6007-12

Duncan, R.R., Betz, A., Shipston, M.J., Brose, N., Chow, R.H. (1999): Transient, phorbol ester-induced DOC2-Munc13 interactions in vivo. *J. Biol. Chem.* 274(39):27347-50

Engelke, G., Gutowski-Eckel, Z., Hammelmann, M., and Entian, K.-D. (1992): Biosynthesis of the lantibiotic nisin: Genomic organization and membrane localization of the NisB protein. *Appl. Env. Microbiol.* 58, 3730-3734

Fernandez, I., Arac, D., Ubach, J., Gerber, S.H., Shin, O., et al. (2001): Three-dimensional structure of the synaptotagmin 1 C2B-domain: synaptotagmin 1 as a phospholipid binding machine. *Neuron* 32: 1057-69

Gengyo-Ando, K., Kitayama, H., Mukaida, M., Ikawa, J. (1996): A murine neural-specific homolog corrects cholinergic defects in *Caenorhabditis elegans* unc-18 mutants. *J Neurosci.* 16(21):6695-702

Geppert, M., Archer, B.T., Südhof, T.C. (1991): Synaptotagmin II: a novel differentially distributed form of synaptotagmin. *J. Biol. Chem.* 266: 13548-52

Gutowski-Eckel, Z., Klei, C., Siegers, K., Hammelmann, M., and Entian, K.-D. (1994): Growth phase-dependant regulation and membrane localization of SpaB, a protein involved in biosynthesis of the lantibiotic subtilin. *Appl. Env. Microbiol.* 60, 1-11

Hata, Y., Slaughter, C.A., Südhof, T.C. (1993): Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin. *Nature* 366: 347-51

Hirokawa T., Boon-Chieng S., and Mitaku S. (1998): SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics*, 14 378-9

Horton, P., Park, K.J., Obayashi, T., Nakai, K. (2006): Protein subcellular localization prediction with WoLF PSORT. *Proceedings of Asian Pacific Bioinformatics Conference: APBC 06: 39-48*

Hosaka, M., Südhof, T.C. (1998a): Synapsin III, a novel synapsin with an unusual regulation by Ca^{2+} . *J. Biol. Chem.* 273: 13371-74

Hosaka, M., Südhof, T.C. (1998b): Synapsin I and II are ATP-binding proteins with differential Ca^{2+} -regulation. *J. Biol. Chem.* 273: 1425-29

Hosaka, M., Südhof, T.C. (1999): Homo- and heterodimerization of synapsins. *J. Biol. Chem.* 274: 16747-53

Hosaka, M., Hammer, R.E., Südhof, T.C. (1999): A phospho-switch controls the dynamic association of synapsins with synaptic vesicles. *Neuron* 24: 377-87

Hosono, R., Hekimi, S., Kamiya, Y., Sassa, T., Murakami, S., Nishiwaki, K., Miwa, J., Taketo, A., Kodaira, K.I. (1992): The unc-18 gene encodes a novel protein affecting the kinetics of acetylcholine metabolism in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurochem.* 58(4): 1517-25

Jahn, R., and Südhof, T.C. (1999): Membrane fusion and exocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 863-911

Janz, R., Hofmann, K., Südhof, T.C. (1998): SVOP, an evolutionarily conserved synaptic vesicle protein, suggests novel transport functions of synaptic vesicles. *J. Neurosci.* 18: 9269-81

Janz, R., Südhof, T.C. (1999): SV2C is a synaptic vesicle protein with an unusually restricted localization: anatomy of a synaptic vesicle protein family. *Neuroscience* 94: 1279-90

Johnston, P.A., Südhof, T.C. (1990): The multisubunit structure of synaptophysin. Relationship between disulfide bonding and homooligomerization. *J. Biol. Chem.* 265: 8869-73

Kao, H.T., Porton, B., Czernik, A.J., Feng, J., Yiu, G., et al. (1998): A third member of the synapsin gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 4667-72

Koenig, J.H., Ikeda, K. (1996): Synaptic vesicles have two distinct recycling pathways. *J. Cell Biol.* 135: 797-808

Kozak, M. (1984): Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 25; 12(2): 857-72

Kupke, T., and Götz, F. (1996): Expression, purification, and characterization of EpiC, an enzyme involved in the biosynthesis of the lantibiotic epidermin, and sequence analysis of *Staphylococcus epidermidis* epic mutants. *J. Bacteriol.* 178, 1335-1340

Laage, R., Langosch, D. (1997): Dimerization of the synaptic vesicle protein synaptobrevin (vesicle-associated membrane protein) II depends on specific residues within the transmembrane domain. *Eur. J. Biochem.* 249: 540-46

Larsen, C.N., Wang, H. (2002): The ubiquitin superfamily: members, features, and phylogenies. *J. Proteome. Res.* 1: 411-19

Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N, Ayres M, Bensinger A, Bernard A, Boe AF, Boguski MS, Brockway KS, Byrnes EJ, Chen L, Chen L, Chen TM, Chin MC, Chong J, Crook BE, Czaplinska A, Dang CN, Datta S, Dee NR, Desaki AL, Desta T, Diep E, Dolbeare TA, Donelan MJ, Dong HW, Dougherty JG, Duncan BJ, Ebbert AJ, Eichele G, Estin LK, Faber C, Facer BA, Fields R, Fischer SR, Fliss TP, Frensley C, Gates SN, Glatfelder KJ, Halverson KR, Hart MR, Hohmann JG, Howell MP, Jeung DP, Johnson

RA, Karr PT, Kawal R, Kidney JM, Knapik RH, Kuan CL, Lake JH, Laramée AR, Larsen KD, Lau C, Lemon TA, Liang AJ, Liu Y, Luong LT, Michaels J, MorganJJ, Morgan RJ, Mortrud MT, Mosqueda NF, Ng LL, Ng R, Orta GJ, Overly CC, Pak TH, Parry SE, Pathak SD, Pearson OC, Puchalski RB, Riley ZL, Rockett HR, Rowland SA, Royall JJ, Ruiz MJ, Sarno NR, Schaffnit K, Shapovalova NV, Sivisay T, Slaughterbeck CR, Smith SC, Smith KA, Smith BI, Sodt AJ, Stewart NN, Stumpf KR, Sunkin SM, Sutram M, Tam A, Teemer CD, Thaller C, Thompson CL, Varnam LR, Visel A, Whitlock RM, Wohnoutka PE, Wolkey CK, Wong VY, Wood M, Yaylaoglu MB, Young RC, Youngstrom BL, Yuan XF, Zhang B, Zwingman TA, Jones AR. (2007): Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* 445(7124):168-76

Li, C., Takei, K., Geppert, M., Daniell, L., Stenius, K., et al. (1994): Synaptic targeting of rabphilin-3A, a synaptic vesicle Ca^{2+} /phospholipids-binding protein, depends on rab3A/3C. *Neuron* 13: 85-98

Li, L., Chin, L.S., Shupliakov, O., Brodin, L., Sihra, T.S., et al. (1995b): Impairment of synaptic vesicle clustering and synaptic transmission, and increased seizure propensity, in synapsin I-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 9235-39

Littleton, J. (2001): Receptor regulation as a unitary mechanism for drug tolerance and physical dependence-not quite as simple as it seems. *Addiction* 96(1): 87-101 review

Maruyama, I.N., Brenner, S. (1991): A phorbol ester/diacylglycerol-binding protein encoded by the unc-13 gene of *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(13):5729-33

Maycox, P.R., Deckwerth, T., Hell, J.W., Jahn, R. (1988): Glutamat uptake by brain synaptic vesicles. Energy dependence of transport and functional reconstitution in proteoliposomes. *J. Biol. Chem.* 263: 15423-28

Meyer, C., Bierbaum, G., Heidrich, C., Reis, M., Süling, J., Iglesias-Wind, M.I., Kempter, C., Molitor, E., and Sahl, H.-G. (1995): Nucleotide sequence of the lantibiotic Pep5 biosynthetic gene cluster and functional analysis of PepP and PepC: evidence for a role of PepC in thioether formation. *Eur. J. Biochem.* 232, 478-489

Mayer, H., Pongratz, M., Prohaska, R. (2001): Molecular cloning, characterization, and tissue-specific expression of human LANCL2, a novel member of the LanC-like protein family. *DNA Seq.* 12(3): 161-6

Mitaku S., Hirokawa T. (1999): Physicochemical factors for discriminating between soluble and membrane proteins: hydrophobicity of helical segments and protein length. *Protein Eng.* 11

Mitaku S., Hirokawa T., and Tsuji T. (2002): Amphiphilicity index of polar amino acids as an aid in the characterization of amino acid preference at membrane-water interfaces. *Bioinformatics*, 18 608-16

Morales, M., Colicos, M.A., Goda, Y. (2000): Actin-dependent regulation of neurotransmitter release in central synapses. *Neuron* 27: 539-50

Neeb, A., Koch, H., Schurman, A., Brose, N. (1999): Direct interaction between the ARF-specific guanine nucleotide exchange factor msec7-1 and presynaptic Munc13-1. *Eur. J. Cell. Biol.* 78(8):533-8

Orita, S., Naito, A., Sakaguchi, G., Maeda, M., Igarashi, H., Sasaki, T., Takai, Y. (1997): Physical and functional interactions of Doc2 and Munc13 in Ca²⁺-dependent exocytotic machinery. *J Biol Chem.* 272(26):16081-4

Pang, D.T., Wang, J.K., Valtorta, F., Benfenati, F., and Greengard, P. (1988): Protein tyrosine phosphorylation in synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85(3):762-6

Perin, M.S., Fried, V.A., Mignery, G.A., Jahn, R., and Südhof, T.C. (1990): Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C. *Nature* 345: 260-63

Pevsner, J., Hsu, S.C., Braun, J.E., Calakos, N., Ting, A.E., Bennett, M.K., Scheller, R.H. (1994): Specificity and regulation of a synaptic vesicle docking complex. *Neuron* 13: 353-61

Porton, B., Kao, H.T., Greengard, P. (1999): Characterization of transcripts from the synapsin III gene locus. *J. Neurochem.* 73(6):2266-71

Pyle, J.L., Kavalali, E., Piedras-Renteria, E.S., Tsien, R.W. (2000): Rapid reuse of readily releasable pool vesicles at hippocampal synapses. *Neuron* 28: 221-31

Rehm, H., Wiedenmann, B., Betz, H. (1986): Molecular characterization of synaptophysin, a major calcium-binding protein of the synaptic vesicle membrane. *EMBO J.* 5(3):535-41

Rhee, J.S., Betz, A., Pyott, S., Reim, K., Varoqueaux, F., Augustin, I., Hesse, D., Südhof, T.C., Takahashi, M., Rosenmund, C., Brose, N. (2002): Beta phorbol ester- and diacylglycerol-induced augmentation of transmitter release is mediated by Munc-13s and not by PKCs. *Cell* 108: 121-33

Richards, D.A., Guatimosim, C., Betz, W.J. (2000): Two endocytic recycling routes selectively fill two vesicles pools in frog motor nerve terminals. *Neuron* 27: 551-59

Rizo, J., and Südhof, T.C. (2002): SNAREs and Munc18 in synaptic vesicle fusion. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 641-653

Rosahl, T.W., Geppert, M., Spillane, D., Herz, J., Hammer, R.E., et al. (1993): Short term synaptic plasticity is altered in mice lacking synapsin I. *Cell* 75: 661-70

Rosahl, T.W., Spillane, D., Missler, M., Herz, J., Selig, D.K., et al. (1995): Essential functions of synapsins I and II in synaptic vesicle regulation. *Nature* 375: 488-93

Schnell, N., Entian, K.-D., Schneider, U., Götz, F., Zähler, H., Kellner, R., and Jung, G. (1988): Prepeptide sequence of epidermin, a ribosomally synthesized antibiotic with four sulphide-rings. *Nature* 333, 276-279

Scranton, T.W., Iwata, M., Carlson, S.S. (1993): The SV2 protein of synaptic vesicles is a keratan sulphate proteoglycan. *J. Neurochem.* 61:29-44

Shirataki, H., Kaibuchi, K., Sakoda, T., Kishida, S., Yamaguchi, T., et al. (1993): Rabphillin-3A, a putative target protein for smg p25A/rab3A small GTP-binding protein related to synaptotagmin. *Mol. Cell Biol.* 13: 2061-68

Siezen, R.J., Knipers, O.P., and De Vos, W.M. (1996): Comparison of lantibiotic gene clusters and encoded proteins. *Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 69, 171-184

Söllner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., et al. (1993): SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 326: 318-24

Stadler, H., Tsukita, S. (1984): Synaptic vesicles contain an ATP-dependent proton pump and show 'knob-like' protrusions on their surface. *EMBO J.* 3: 3333-37

Südhof, T.C., Czernik, A.J., Kao, H., Takei, K., Johnston, P.A. (1989): Synapsins: mosaics of shared and individual domains in a family of synaptic vesicle phosphoproteins. *Science* 245: 1474-80

Südhof, T.C., and Jahn, R. (1991): Proteins of synaptic vesicles involved in exocytosis and membrane recycling. *Neuron* 6(5): 665-677 review

Südhof, T.C. (1995): The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* 375(6533):645-53. Review.

Tellam, J.T., McIntosh, S., James, D.E. (1995): Molecular identification of two novel Munc-18 isoforms expressed in non-neuronal tissues. *J. Biol. Chem.* 270(11):5857-63

Thomas, L., Hartung, K., Langosch, D., Rehm, H., Bamberg, E., Franke, W.W., and Betz, H. (1988): Identification of Synaptophysin as hexameric channel protein of the synaptic vesicle membrane. *Science* 242, 1050-1053

Ubach, J., Zhang, X., Shao, X., Südhof, T.C., Rizo, J. (1998): Ca^{2+} binding to synaptotagmin: How many Ca^{2+} ions bind to the tip of a C_2 -domain? *EMBO J.* 17: 3921-30

Van der Voorn, L., und Ploegh, H.L. (1992): The WD-40 repeat. *FEBS. Lett.* 307: 131-134

Varoqueaux, F., Sigler, A., Rhee, J.S., Brose, N., Enk, C., Reim, K., Rosenmund, C. (2002): Total arrest of spontaneous and evoked synaptic transmission but normal synaptogenesis in the absence of Munc13-mediated vesicle priming. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99(13):9037-42

Voets, T., Toonen, R.F., Brian, E.C., de Wit, H., Moser, T., et al. (2001): Munc18-1 promotes large dense-core vesicle docking. *Neuron* 31: 581-91

Wang, Y., Okamoto, M., Schmitz, F., Hofmann, K., Südhof, T.C. (1997a): RIM: a putative Rab3 effector in regulating synaptic vesicle fusion. *Nature* 388: 593-98

Wang, Y., Sugita, S., Südhof, T.C. (2000): The RIM/NIM family of neuronal C₂ domain proteins. Interactions with Rab3 and a new class of Src homology 3 domain proteins. *J. Biol. Chem.* 275: 20033-44

Wang, Y., Südhof, T.C. (2003): Genomic definition of RIM proteins: evolutionary amplification of synaptic regulatory proteins. *Genomics* 81: 126- 37

Xu, X.Z., Wes, P.D., Chen, H., Li, H.S., Yu, M., Morgan, S., Liu, Y., Montell, C. (1998a): Retinal targets for calmodulin include proteins implicated in synaptic transmission. *J. Biol. Chem.* 273: 31297-31307

Zhang, W., Benson, D.L. (2001): Stages of synapse development defined by dependence on F-actin. *J. Neurosci.* 21: 5169-81

Zhu, P., Patterson, A., Lavoie, B., Stadler, J., Shoeb, M., Patel, R., Blackstone, C. (2003): Cellular Localization, Oligomerization, and Membrane Association of the Hereditary Spastic Paraplegia 3A (SPG3A) Protein Atlastin

Zhu, P., Sonderblom, C., Tao-Cheng, J., Stadler, J., Blackstone, C. (2006): SPG3A protein atlastin-1 is enriched in growth cones and promotes axon elongation during neuronal development. *Hum. Mol. Genet.* 15(8):1343-53

7 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
AP	Adapterprotein
ARF	Auxin response factor
ARP	Actin related protein
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
BAC	Benzyl-dimethyl-n- Hexadecylammoniumchlorid
BAR-Domäne	Bin/ Amphiphysin/ Rvs- Domäne
C	Cytosin
Ca	Calcium
CaMK	Calcium/Calmodulin- dependent protein kinase
cDNA	Complementary DNA
CHO	Chinese hamster ovary
CIAP	Calf intestine alkaline phosphates
CIC-3	Voltage-gated Cl channel 3
CMV	Cytomegalievirus
CSP	Cysteine string protein

C2-Domäne	calcium binding domaine
DAPI	4' 6- Diamidino- 2-Phenylindoldihydrochlorid
DEAE	Diethylaminoethyl
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate; Nukleotide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
Doc	3 α ,12 α -Dihydroxy-5 β -cholansäure
dSDS	Double SDS
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Elongation factor
ERC	Endocytic recycling compartment
ESI	Electrospray ionization
E.Z.N.A.	Plasmid MiniPrep Kit
FBP	Fructosebisphosphat
FYVE	Fab1, YOTB/ZK632.12, Vac1 and EEA1- Domäne
G	Guanin
GABA	γ - Aminobuttersäure
GAP	GTPase-activating protein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase

GDI	Guanine nucleotide dissociated inhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanin nucleotide exchange factor
GTP	Guanosintriphosphat
HA	Hämagglutinin
Hb	Hämoglobin
his	Histidin
HSP	Hereditary spastic paraplegia
KCl	Kaliumchlorid
Lan	Lantibiotic synthetase component
LANCL	LanC-like
Lcl2	LanC-like protein 2
LB	Luria-Bertani
LC	Liquid chromatography
LDH	Lactatdehydrogenase
LZD	Leucin zipper domain
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat

Mfn	Mitofusins
MS	Massenspektrometrie
Munc	Mammalian unc
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NAD/ NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NaOH	Natriumhydroxid
NEF	Nerve growth factor
NSF	N-ethylmaleimide- sensitive fusion protein
N ₂	Stickstoff
OD	Optische Dichte
OH	Hydroxyl
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PC 12	Pheochromocytoma cells 12
PDZ	PSD-95, DlgA, ZO-1
PFK	Phosphofruktokinase
pfu	pyrococcus furiosus Bakterium
PGK	Phosphoglyceratkinase

PKA	Proteinkinase A / cAMP dependent protein kinase
RbCl ₂	Rubidiumchlorid
Rh	Rhadopsin
RIM	Rab interacting molecule
RNA	Ribonukleinsäure
RNAsen	Ribonukleinase
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SCAMP	Secretory carrier- associated membrane protein
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	Short interfering RNA
SM protein	Sec1/Munc18- like protein
SNAP	Soluble NSF attachment protein
SNARE	SNAP receptor
SPG3A	Early onset hereditary spastic paraplegia
src Kinasen	Tyrosin Kinasen Familie
Svap	Synaptic vesicle associated protein
SVOP	SV2 related protein
SV2	Synaptic vesicle protein 2
T	Tyrosin

taq	Termus aquaticus Bakterium
TBE	Tris- Borat- EDTA
TE	Tris- EDTA- Puffer
TFB	
Thy- 1	Thymus cell antigen
TSAS	Testis specific adriamycin sensitivity protein
UNC 18	Uncoordinated protein
UV	Ultraviolett
vATPase	Vacuolar ATPase
VAMP	Vesicle-associated membrane protein
VAP	Vesicle associated protein
VILIP	Visinin-like protein
WD	Tryptophan/Aspartat
WDFY1	WD repeat and FYVE domain containing 1 isoform 1
Wdfy1	WD repeat and FYVE domain containing 1
ZnT-3	Zink Transporter 3

A	Ampère
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
Da	Dalton
F	Farat
g	Gramm
g	Zentrifugenbeschleunigung
h	hour bzw. Stunde
k	Kilo
l	Liter
m	Milli
m	Meter
M	Molar
min	minutes bzw. Minuten

mol	Stoffmenge Mol
μ	Mikro
n	Nano
Ω	Ohm, elektrischer Widerstand
p	Pico
sec	second bzw. Sekunde
rpm	rounds per minute
V	Volt
V _{max}	maximale Geschwindigkeit

Danksagung

Die Diplomarbeit wurde in den Räumlichkeiten des Arbeitskreises Neurochemie der Johann Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt am Main angefertigt und von Herrn Prof. Dr. Walter Volknandt betreut.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Walter Volknandt und Herrn Prof. Dr. Herbert Zimmermann für die Vorgabe des Themas und der notwendigen Mittel während des letzten Jahres.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Georg Auburger für die Bereitstellung der Expressionsvektoren.

Bei Dr. Jaqueline Burré bedanke ich mich für die Betreuung meiner Arbeit.

Besonderer Dank geht an Matthias Stanke und Marco Morciano, die mich mit ihrer Hilfe und stetiger Ansprechbarkeit bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Für die Unterstützung in der Immunocytochemie danke ich David Langer.

Dank auch an Alena Bundschuh für die nützlichen Tipps bei der Klonierung.

Ein Lob und mein Dank gehen ebenfalls an Sandra Ullsperger, die als Praktikantin ihre engagierte Mitarbeit bewies.

Dem gesamten Arbeitskreis Neurochemie möchte ich meinen Dank für die Kooperation und eine angenehme Arbeitsatmosphäre aussprechen.

Ein großer Dank gebührt Nastaran Ghadimi für das Korrekturlesen dieser Arbeit und Thomas Schmiegelow für die technische Beratung.

Meiner Familie, insbesondere Eveline Barrera, danke ich für die fortwährende Unterstützung während des Studiums und meiner Diplomarbeit.

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die Diplomarbeit selbstständig verfasst und keine anderen, als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Frankfurt am Main, den 19. März 2007

(Michael Barrera Estevez)