

Transkriptionelle Regulationsmechanismen und Interaktionsstudien des plasticity related gene 1

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Beate Geist

aus Reinheim/ i.O.

Berlin

November 2010

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Juni 2005 bis Juni 2010 im Institut für Zell- und Neurobiologie, Centrum für Anatomie, Charité – Universitätsmedizin Berlin und unter der Leitung von Prof. Dr. Robert Nitsch angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

2. Gutachter: Prof. Dr. Robert Nitsch

Disputation am 24.2.2011

" Believe nothing just because a so-called wise person said it.
Believe nothing just because a belief is generally held.
Believe nothing just because it is said in ancient books.
Believe nothing just because it is said to be of divine origin.
Believe nothing just because someone else believes it.
Believe only what you yourself test and judge to be true. "

Gautama Buddha

ZUSAMMENFASSUNG.....	1
Abstract.....	3
1. EINLEITUNG	5
1.1. Die Genfamilie der „plasticity related genes“ (PRGs).....	5
1.2. Beschriebene Wirkmechanismen von PRGs	6
1.3. LPA-vermittelte Signalübertragungsvorgänge	8
1.4. Verwandtschaftsverhältnisse und Struktur der PRG-Familienmitglieder.....	10
1.5. Expression von PRG-1	11
1.6. Transkriptionelle Regulation von PRG-1	12
1.6.1. Die Genfamilie der Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktoren	13
1.6.2. bHLH-Transkriptionsfaktoren in der Neurogenese	14
1.6.2.1. bHLH-Transkriptionsfaktoren in der Neurogenese von <i>Drosophila</i>	14
1.6.2.2. bHLH-Transkriptionsfaktoren in der Neurogenese von Vertebraten.....	16
1.6.2.3. Expression und Regulation von Nex1/Math2	17
1.6.2.4. Funktionen des Transkriptionsfaktors Nex1	17
1.7. Zielstellung der Arbeit	19
2. MATERIAL & METHODEN	20
2.1. Material	20
2.1.1. Geräte	20
2.1.2. Chemikalien	21
2.1.2.1. Chemikalien	21
2.1.2.2. Radiochemikalien	22
2.1.3. Molekularbiologisches Material	22
2.1.3.1. Nukleotide	22
2.1.3.2. DNS- Größen & Mengenstandards.....	22
2.1.3.3. Enzyme	22
2.1.3.4. Oligonukleotide	22
2.1.3.5. Plasmide	24
2.1.3.6. BAC	25
2.1.3.7. Nukleinsäuren	25
2.1.4. Proteinbiochemisches Material	25
2.1.4.1. Proteinmarker.....	25
2.1.4.2. Antikörper	25

2.1.5.	Biologisches Material.....	26
2.1.5.1.	Verwendete Bakterienstämme	26
2.1.5.2.	Verwendete Zelllinien	27
2.1.5.3.	Verwendete Nager	27
2.2.	Methoden.....	27
2.2.1.	Molekularbiologische Methoden	27
2.2.1.1.	Anzucht von <i>E. coli</i>	27
2.2.1.2.	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	27
2.2.1.3.	Herstellung elektro-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	28
2.2.1.4.	Anlegen von Glycerinkulturen.....	28
2.2.1.5.	Hitze induzierte Transformation von <i>E. coli</i>	28
2.2.1.6.	Elektrotransformation von <i>E. coli</i>	29
2.2.1.7.	Mikrodialyse von DNS für Elektrotransformation	29
2.2.1.8.	Homologe Rekombination von DNS.....	29
2.2.1.9.	Sequenzspezifische Rekombination mittels FLP-Rekombinasen	30
2.2.1.10.	Isolation von Gesamt-RNS	31
2.2.1.11.	Isolation von mRNA	31
2.2.1.12.	Synthese von cDNS.....	31
2.2.1.13.	Isolation von Plasmid-DNS aus <i>E. coli</i>	31
2.2.1.14.	Phenol-Chloroform-Extraktion.....	32
2.2.1.15.	Ethanol- Natriumacetat-Fällung	32
2.2.1.16.	Kultivierung und Isolation von BAC-DNS.....	32
2.2.1.17.	Isolation superhelikaler-„covalent-closed-circular“ -(ccc)- BAC-DNS mittels Cäsiumchloridgradienten	33
2.2.1.18.	Vorbereitung der superhelikalen BAC-DNS für die Oozyteninjektion	34
2.2.1.19.	Isolation von genomischer DNS.....	34
2.2.1.20.	Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen.....	34
2.2.1.21.	„RNA Ligase mediated rapid amplification of cDNA ends“ RLM-RACE	35
2.2.1.22.	Spaltung von DNS mit Restriktionsendonukleasen	35
2.2.1.23.	Dephosphorylierung linearisierter Vektoren.....	35
2.2.1.24.	Ligation von DNS-Fragmenten	36
2.2.1.25.	Agarosegelelektrophorese von DNS	36
2.2.1.26.	Elution von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen.....	36
2.2.1.27.	Transfer von DNS auf Nylonmembranen	36
2.2.1.28.	Radioaktive Markierung von DNS-Sonden	37
2.2.1.29.	Hybridisierungen membrangebundener DNS mit DNS-Fragmenten	37
2.2.1.30.	Autoradiographische Analyse von Southern Blots.....	37
2.2.1.31.	Digoxigenin-Markierung von RNS-Sonden für <i>in situ</i> - Hybridisierung	37
2.2.1.32.	PCR zur Erzeugung von DNS-Fragmenten für Klonierungen	38
2.2.1.33.	PCR zur Genotypisierung der transgenen Tiere	38
2.2.1.34.	Nichtradioaktive DNS-Sequenzierung.....	38

2.2.1.35.	Gelshift-Assay	38
2.2.2.	Proteinbiochemische Methoden	39
2.2.2.1.	Herstellung von Kernextrakten	39
2.2.2.2.	Herstellung von Gewebehomogenaten	40
2.2.2.3.	Bestimmung der Proteinkonzentration	40
2.2.2.4.	Vorbereitung der Proteinproben für die SDS-Polyacrylamidelektrophorese	40
2.2.2.5.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	40
2.2.2.6.	Membrantransfer von Proteinen	41
2.2.2.7.	Immunodetektion von Proteinen	41
2.2.2.8.	Immunpräzipitation	42
2.2.2.9.	Dual-Luziferase-Assays	43
2.2.3.	Zellkultur Methoden	44
2.2.3.1.	Kulturgefäße und Kulturbedingungen	44
2.2.3.2.	Kultivierung und Passagieren von HEK 293-Zellen	44
2.2.3.3.	Präparation primärer kortikaler Neurone	44
2.2.3.4.	Präparation primärer Astrozyten	45
2.2.3.5.	Transiente Transfektion mit FuGENE® Transfektionsreagenz	46
2.2.3.6.	Transiente Transfektion mit Effectene Transfektionsreagenz	46
2.2.4.	Immunhistologische Methoden	47
2.2.4.1.	Transkardiale Perfusionsfixierung von Nagern	47
2.2.4.2.	Anfertigung von Kryostatschnitten	47
2.2.4.3.	Anfertigung von Vibratomschnitten	47
2.2.4.4.	Fixierung kultivierter Einzelzellen	47
2.2.4.5.	<i>In situ</i> Hybridisierung auf Kryostatschnitten	48
2.2.4.6.	Immunhistologische Fluoreszenzfärbung	49
2.2.5.	Slice-Kultur und Elektroporationsbedingungen	49
2.2.6.	Statistische Verfahren	49
2.2.7.	<i>In silico</i> Analysen	50
2.2.7.1.	Internetquellen	50
2.2.7.2.	Computersoftware	50

3. RESULTATE:	51
3.1. Generierung eines PRG-1-BAC- Reportermausmodells.....	51
3.1.1. Herstellung von BAC-Konstrukten zur Generierung einer PRG-1-BAC-Linie.	51
3.1.2. Identifizierung von PRG-1-BAC-Klonen.....	51
3.1.3. Modifizierung des BAC-Klons mittels Rekombination.....	52
3.1.3.1. Rekombinationsstrategie	52
3.1.3.2. Generierung von Homologieboxen und der Reportergensequenz.....	53
3.1.3.3. Subklonierung der Amplifikate in den Rekombinationsvektor pNEO	54
3.1.3.4. Modifikation des BAC durch homologe Rekombination	54
3.1.4. Generierung der Nachkommen (FO-Generation)	55
3.1.5. Phänotypisierung der erzeugten Transgene	56
3.1.5.1. Nachweis der YFP mRNS via <i>in situ</i> -Hybridisierung.....	56
3.1.5.2. Lokalisation des YFP Reporterproteins mittels Immunhistologie.....	57
3.2. PRG-1 Promotoranalyse.....	60
3.2.1. Ermittlung des Transkriptionsstartpunkts von PRG-1	60
3.2.1.1. „RNA Ligase mediated Rapid amplification of cDNA ends“ (RLM-RACE)-Analyse.....	60
3.2.1.2. PCR-Analyse muriner cDNS	61
3.2.2. Ermittlung von Regionen mit transkriptionsstimulierender Aktivität in der Promotorregion von PRG-1.....	62
3.2.2.1. Klonierung von Promoter-Deletionskonstrukten.....	63
3.2.2.2. Dual-Luziferase-Assays (DLR) in primären Rattenzellen mit humanen Promoter- Deletionskonstrukten	63
3.2.2.3. Dual-Luziferase-Assays in primären Mauszellen mit murinen Promoter-Deletionskonstrukten	64
3.2.2.4. Neuronale Expression von GFP mediiert durch den identifizierten Minimalpromoter in organotypischen Slice-Kulturen.....	65
3.2.2.5. Identifizierung von DNS-Proteinkomplexen auf Sequenzabschnitten des identifizierten Minimalpromoters.....	66
3.2.3. Einfluß des Transkriptionsfaktors Nex1 (Math2/NeuroD6) auf die Transkription von PRG-1	67
3.2.3.1. Klonierung Nex1-Expressionsvektor und Kontrollvektoren	67
3.2.3.2. Dual-Luziferase-Assays von PRG-1 Promotor-Deletionskonstrukten unter Nex1 Einfluß in HEK 293-Zellen.....	68
3.2.3.3. Dual-Luziferase-Assays von PRG-1 Promotor-Deletionskonstrukten unter Nex1-Einfluß in Neuronen.....	70
3.3. Auswirkungen der Nex1 Defizienz auf die PRG-1 Protein Synthese.....	71
3.3.1. Western-Blot Analyse von Nex1-KO-Mäusen	71
3.3.2. Untersuchungen zur Lokalisationen von PRG-1 in Nex1-KO-Mäusen	71
3.4. Generierung polyklonaler Peptidantikörper gegen PRG-1 und PRG-2.....	73

3.4.1. Epitopauswahl.....	73
3.5. Suche nach möglichen Interaktionspartnern von PRG-1	75
3.5.1. Two-Hybrid-Screen.....	75
3.5.2. Koimmunpräzipitation in HEK 293 exprimierter, rekombinanter Proteine.....	76
3.5.3. Koimmunpräzipitation von NSF/PRG-1 aus Maushirnhomogenaten.....	77
3.5.4. Immunhistologische Kolokalisation von NSF und PRG-1.....	78
4. DISKUSSION	79
4.1. PRG-1-BAC-YFP Reportermaus.....	79
4.2. Promoteranalyse von PRG-1	80
4.3. Transkriptionelle Regulation von PRG-1 durch Nex1	84
4.4. Untersuchung der PRG-1 Expression in Nex1 defizienten Mäusen.....	85
4.5. Identifizierung möglicher Interaktionspartner von PRG-1	87
4.6. Ausblick auf weiterführende Studien.....	90
5. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	91
6. PUBLIKATIONEN UND POSTERPRÄSENTATIONEN.....	93
6.1. Publikationen	93
6.2. Konferenzbeiträge durch Posterpräsentationen	94
7. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	95
8. LEBENS LAUF.....	96
9. LITERATURVERZEICHNIS:.....	97
10. DANKSAGUNG.....	106

Zusammenfassung:

Die Informationsübertragung im ZNS verläuft über synaptische Verbindungen und kann durch diese moduliert werden. Plasticity related gene 1 (PRG-1) wurde kürzlich als Modulator der exzitatorischen Informationsübertragung an Synapsen beschrieben. Gemäß des derzeit postulierten Mechanismus verändert das postsynaptisch lokalisierte PRG-1 den Gehalt an bioaktiven Lipiden im synaptischen Spalt und moduliert auf diese Weise die Signalweiterleitung über die präsynaptisch lokalisierten LPA₂-Rezeptoren.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Mausmodell erzeugt, welches das Reportergen „yellow fluorescent protein“ (YFP) unter Kontrolle von Elementen des nativen PRG-1 Promoters exprimiert. Die Expression des Reporters im erzeugten Mausmodell wird durch 200 kb kotransferierte genomische Sequenz, die den Transkriptionsstart von PRG-1 umschließt, gesteuert. Nachfolgende immunhistologische Untersuchungen dokumentierten, daß die gewählten 200 kb Sequenz ausreichen, um sowohl die gehirnspezifische Expression von YFP, als auch die PRG-1 spezifische Expression des Reporterproteins in diversen Neuronentypen zu steuern.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der transkriptionellen Regulation von *prgl*. Mittels RLM-Race wurde erstmals dokumentiert, daß die Transkription von PRG-1 über multiple Transkriptionsstartorte initiiert wird. Ein weiter stromaufwärts gelegener Transkriptionsstart, der vorab publiziert wurde, konnte mittels PCR-Analyse bestätigt werden. Mittels Reporterassays von Deletionskonstrukten in primären kultivierten Neuronen bzw. Astrozyten, konnte die Sequenz eines Minimalpromoters identifiziert werden, der eine ca. vierzigfache transkriptionelle Stimulation in Neuronen erzeugt. Die Funktionalität des identifizierten Minimalpromoters konnte durch Elektroporation eines Reporterkonstrukts in organotypische Sliceulturen dokumentiert werden.

Mittels EMSA wurde der identifizierte Minimalpromoter untersucht und Sequenzabschnitte identifiziert, an denen DNS-Proteinkomplexe nachgewiesen werden konnten. *In silico* Analysen ermittelten konservierte Bindemotive für die Transkriptionsfaktoren SP1 und CREB. Im Anschluß konnte die nachgewiesenen DNS/Proteinkomplexe spezifisch durch Konsensusoligonukleotide der Sequenz von SP1 und CREB kompetetiert werden.

Eine Nex1 mediierte transkriptionelle Regulation von PRG-1 war zu Beginn dieser Studie bekannt. Mittels Kotransfektionen eines Nex1-Expressionsvektors wurde nachgewiesen, daß kein signifikanter Einfluß von Nex1 auf den identifizierten Minimalpromoter vorliegt, so daß ein neuartiger Regulationsmechanismus von PRG-1 beschrieben wurde.

Mittels Western Blot Analysen konnte keine Veränderung des PRG-1 Gehalts in

Gesamthirnhomogenaten von Nex1 defizienten Mäusen festgestellt werden.

Lokalisationsveränderungen von PRG-1 konnten durch Untersuchungen der im Rahmen dieser Arbeit erzeugten Reportermaus ausgeschlossen werden. Eine weitere Zielstellung dieser Arbeit war die Identifikation möglicher Interaktionspartner von PRG-1. Durch den „Yeast Two-Hybrid Screening Service at DKFZ“ wurde ein Two-Hybrid-Screen durchgeführt, der NSF als möglichen Interaktionspartner prognostizierte. Diese Interaktion konnte durch Immunpräzipitationen von in HEK 293-Zellen überexprimierten affinitätsmarkierten Proteinen bestätigt werden. Nachfolgend konnte NSF auch aus Gesamthirnhomogenaten durch an Protein A-Sepharose gekoppelte PRG-1 Antikörper präzipitiert werden, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurden.

Abstract:

Transmission of information in the CNS is processed via synaptic connections and is modulated. The protein plasticity related gene 1 (PRG-1) was recently described as modulator of excitatory synaptic transmission. According to the current postulated mechanism, the postsynaptic expressed PRG-1 modifies the concentration of bioactive lipids in the synaptic cleft and modulates thereby the signal transmission via the presynaptic localized LPA₂-receptors. In the present study a mouse model was generated expressing the reporter gene yellow fluorescent protein (YFP) under control of elements from the native PRG-1 promoter. Expression of the reporter was controlled by a 200 kb cotransfected sequence, encompassing the transcription start site of *prg1*.

Immunohistologic analysis of the generated reporter mouse documented that the chosen 200 kb sequence stretch was effectual to confer strict neuronal expression of YFP. Additional all regulation elements necessary for the intraneuronal expression pattern of PRG-1 seem to be present on the transferred sequence stretch.

Another aim was the analysis of *prg1* transcriptional regulation. Using RLM-race it could be shown that transcription of *prg-1* is initiated at multiple start points. Another transcription start point localized further upstream which was previously published from our group could be confirmed with PCR-analysis.

Reporter gene-assays of deletion constructs in primary cultivated neurons and astrocytes identified the sequence of a minimal promoter, which stimulates specific transcription in neurons forty-fold. The functionality of the identified minimal promoter could be documented via electroporation of a reporter gene construct in organotypic slice constructs.

Investigation of the identified minimal promoter via EMSA determined sequence fragments with DNA-protein-complexes. *In silico* analysis revealed conserved binding sites for the transcription factors SP1 and CREB in the rodent and human minimal promoter sequence. The detected DNA-protein-complexes could be specifically competed with SP1 and CREB consensus oligonucleotides.

The direct regulation of PRG-1 transcription through the transcription factor Nex1 was published prior to this study. The question emerged, if transcriptional regulation of the identified minimal promoter was influenced by Nex1. No significant transcriptional stimulation could be detected in cotransfection experiments with a Nex1 expression vector, indicating a new Nex1 independent regulation mechanism.

No alteration regarding the PRG-1 protein content in brain homogenates was detected in Nex1 deficient mice via western blot analysis.

No variation regarding the spatial expression of PRG-1 could be detected via analysis of reporter gene expression in the generated PRG-1 reporter mouse.

Another aim of this study was the identification of putative interaction partners of PRG-1. The cytoplasmatic C-terminus of PRG-1 was subcloned in an expression vector, which was used in a two-hybrid assay performed by “Yeast Two-Hybrid Sreening Service at DKFZ”. NSF was identified as putative interaction partner. This interaction was confirmed by immunoprecipitation of affinity tagged proteins expressed in HEK 293 cells. Furthermore this interaction was corroborated by co-precipitation of NSF via protein A-sepharose coupled PRG-1 antibodies, which were generated as part of this study.

1. Einleitung

Das menschliche Gehirn besteht aus mehr als 100 Milliarden Neuronen, die zu neuronalen Netzwerken miteinander verschaltet sind und über synaptische Verbindungen kommunizieren (Kandel et al., 2000). Durch synaptische Plastizität wird die Gesamtheit der morphologischen oder physiologischen Veränderungen von synaptischen Verbindungen beschrieben, welche die Stärke der synaptischen Übertragung modulieren. Der neurophysiologische Mechanismus der synaptischen Plastizität gilt als Grundlage für höhere, kognitive, Funktionen wie Lernen und Gedächtnisbildung (Chen and Tonegawa, 1997; Lee and Silva, 2009). Im Gegensatz dazu beschreibt der Begriff Neuroplastizität, die Fähigkeit des Gehirns, neue neuronale Verbindungen im Verlauf des gesamten Lebens zu bilden. Dadurch kann das Gehirn verletzungs- oder erkrankungsbedingte Schäden ausgleichen (Navarro, 2009). Bei der verletzungsbedingten Reorganisation des Gehirns treten axonale Auswachsmechanismen auf, im Rahmen derer Axone unverletzter Neurone aussprossen, um beschädigte Verbindungen neu zu bilden oder um sich mit unbeschädigten Neuronen zu verschalten und somit neue Netzwerke zu bilden, die funktionell die verletzten Nervenbahnen substituieren. An der Regulation dieses Reorganisationsprozesses, insbesondere an der Navigation der aussprossenden Axone, sind eine Vielzahl von Molekülen beteiligt, die durch chemoattraktive bzw. repulsive Mechanismen, die Zielfindung des Axons steuern (Frotscher et al., 1997; Deller et al., 2001).

1.1. Die Genfamilie der „plasticity related genes“ (PRGs)

Die entorhinale Kortexläsion (ECL) stellt ein etabliertes Modell für die Erforschung läsionsinduzierter Plastizität dar. Die Untersuchung einer cDNS-Bibliothek läsionierter Hippocampi identifizierte „plasticity related gene 1“ (PRG-1) als läsionsreguliertes Gen (Bräuer et al., 2003), das im Anschluß kloniert und analysiert wurde. Das humane PRG-1 (AF541281) besteht aus 764 Aminosäuren, die homologen Proteine aus Ratte (NM001001508) und Maus (NM177664) weisen 93% bzw. 95% Identität zum humanen Protein auf. Sequenzanalysen zeigten Homologien von PRG-1 zur Familie der Lipid Phosphat Phosphatasen (LPP) auf. Aufgrund ihrer partiellen Sequenzhomologie konnten mittels GenBank Analysen weitere verwandte Gene identifiziert werden. Zur Zeit sind fünf Mitglieder der PRG-Genfamilie (PRG 1-5) in Vertebraten bekannt (Bräuer et al., 2003; Savaskan et al., 2004; Brogini et al., 2010).

1.2. Beschriebene Wirkmechanismen von PRGs

Funktionelle Studien zeigten, daß die Überexpression von PRG-1 in NIE-Zellen (Bräuer et al., 2003), einen von Lysophosphatsäure (LPA) induzierten Neuritenkollaps durch die Modulation des extrazellulären LPA Gehalts verzögert. Ein fünffacher Anstieg der ermittelten Ektophosphataseaktivität durch PRG-1 Überexpression wurde im Rahmen dieser Studien dokumentiert, konnte aber in weiteren Studien nicht reproduziert werden (McDermott et al., 2004). Es wurde daher postuliert, daß PRG-1 als Lipid Phosphat Phosphatase in axonale Wachstumsprozesse und regeneratives Auswachsen nach Schädigungen involviert sei.

PRG-1 defiziente glutamaterge CA1 Neurone weisen eine erhöhte glutamaterge Transmission auf, die in Form einer erhöhten spontanen Vesikelfreisetzung auftritt und zu epileptischen Anfällen in juvenilen Mäusen führt (Trimbuch et al., 2009). PRG-1 KO-Mäuse zeigen im Verlauf ihrer Entwicklung eine Reduktion ihres Gesamtgewichts sowie des Gehirngewichts. Eine 50%ige Mortalitätsrate drei bis vier Wochen nach Geburt wurde bei PRG-1 defizienten Mäusen ermittelt. Mittels immunhistologischer Analysen wurde gezeigt, daß PRG-1 KO-Mäuse keine morphologischen Veränderungen in der Struktur des Hippocampus aufweisen, weder Anzahl noch Lokalisation von γ -Aminobuttersäure (GABA)-ergen Interneuronen weisen Veränderungen auf. Elektrophysiologische Untersuchungen dokumentierten keine Veränderung der synaptischen Innervation von Cornu ammonis (CA) 1 und CA3 Pyramidenzellen. Durch quantitative immunhistologische Studien und Western Blot Analysen von Präparationen der „postsynaptic density“ (PSD) konnte gezeigt werden, daß keine Expressionsveränderung der folgenden Proteine in Prä- und Postsynapse der PRG-1 KO-Maus nachweisbar ist: vesikulärer Glutamatransporter (VGlu1), vesikulärer GABA-transporter (VGat), die AMPA Rezeptor Untereinheiten GluR1, GluR2/3, GluR4, NMDA Rezeptor Untereinheit NR1, Glutamatsäuredecarboxylase (GAD67), Synaptophysin und PSD95 als Marker für die „postsynaptic density“. Durch *in utero* Elektroporation von PRG-1 und nachfolgende elektrophysiologische Messungen an einzelnen Neuronen der PRG-1 KO-Maus konnte gezeigt werden, daß die Expression von PRG-1 den übererregbaren Phänotyp komplementierte. *In utero* Elektroporationen einer Cre-Rekombinase und nachfolgende elektrophysiologische Messungen in einer konditionellen PRG-1 KO-Maus zeigten, daß das Ausschalten von PRG-1 in einzelnen Neuronen den übererregbaren Phänotyp induzierte. Durch diese Einzelzellversuche konnte ausgeschlossen werden, daß die durch PRG-1 Defizienz dokumentierte Übererregbarkeit in glutamatergen Neuronen durch Fehlbildungen des neuronalen Netzwerks bedingt wurde. Eine retrograde, modulatorische Funktion des postsynaptisch lokalisierten PRG-1 Proteins bei der exzitatorischen synaptischen

Transmission von glutamatergen Neuronen, wurde daher postuliert. Für diese Funktion ist das spezielle Phosphatasemotiv von PRG-1 erforderlich. *In utero* Elektroporationen einer Punktmutante von PRG-1, bei der die konservierte Aminosäure Histidin zu Lysin (H253K) in der extrazellulären Domäne 2 ausgetauscht wurde, in die PRG-1 KO-Maus, konnte den übererregbaren Phänotyp nicht mehr komplementieren. In kultivierten, primären Neuronen konnte immunhistologisch gezeigt werden, daß PRG-1 defiziente Neurone eine geringere Fähigkeit zur Aufnahme eines fluoreszierenden Phosphatidanalogs besitzen. Diese Daten führten zu der Hypothese, daß der von PRG-1 vermittelte molekulare Mechanismus zur Modifikation synaptischer Transmission von einer Interaktion von PRG-1 und bioaktiven Lipid Phosphaten wie z.B. LPA abzuhängen scheint. Die Erzeugung einer PRG-1/ LPA₂-Rezeptor-doppel-KO -Maus, die den pathologischen Phänotyp der PRG-1 KO-Maus aufheben konnte, dokumentierte den Einfluß des LPA₂-Rezeptors für den von PRG-1 vermittelten Effekt. Aufgrund der vorbezeichneten Daten wurde ein Modell zur möglichen Funktionsweise von PRG-1 erstellt: von Gliazellen produziertes LPA aktiviert die präsynaptischen LPA₂-Rezeptoren. PRG-1 minimiert den bioaktiven Lipidgehalt im synaptischen Spalt durch den Transport der Lipide in den Intrazellulärraum des postsynaptischen Neurons.

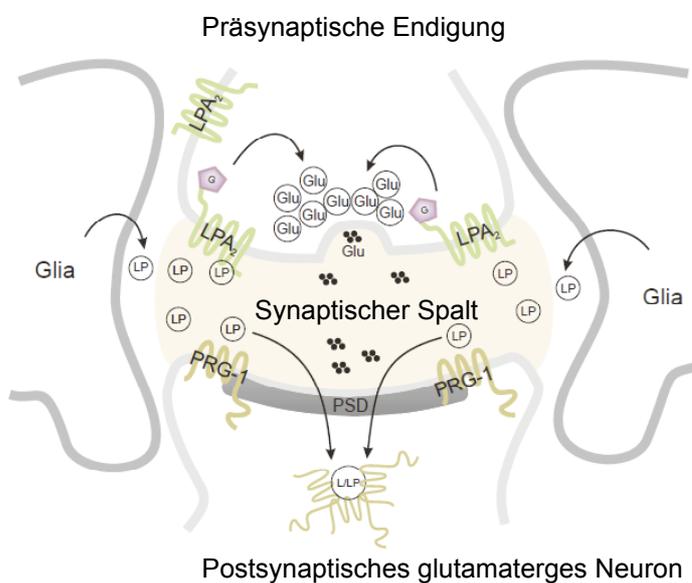


Abb. 1) Modell der PRG-1 Funktion an der exzitatorischen Synapse (Trimbuch et al., 2009). Das auf der postsynaptischen Seite lokalisierte PRG-1 Protein, kontrolliert die Menge an bioaktiven Lipiden im synaptischen Spalt durch Aufnahme der Lipide in den Intrazellulärraum. Signalwege, die über die präsynaptischen LPA₂-Rezeptoren angeschaltet werden, können somit durch das postsynaptische, glutamaterge Neuron moduliert werden.

Im Unterschied zu den von PRG-1 ausgeübten Funktionen zeigten Transfektionsstudien neuronaler und nichtneuronaler Zelllinien eine Funktion von PRG-3 bei der Bildung und dem Wachstum von Filopodienausläufern (Savaskan et al., 2004).

Die durch Überexpression von PRG-3 induzierten Filopodien besitzen eine charakteristische Morphologie und Proteinzusammensetzung (Sigal et al., 2007). Das Längenwachstum eines

Filopodiums wird durch das Gleichgewicht vorhandener sog. „capping“- und „anti-capping“-Proteine reguliert. Die „anti-capping“-Proteine verdrängen die „capping“-Proteine von der Spitze des Filopodiums und verhindern dadurch ein Fortschreiten der Aktinpolymerisation. Charakteristisch für die von PRG-3 induzierten Filopodien ist die Abwesenheit von sogenannten „anti-capping“-Proteine, der Ena/Vasp-Familie, an ihrer Spitze. Das durch Überexpression von PRG-3 geförderte Filopodienwachstum wird nicht über den bekannten Cdc42-Wasp-Arp2/3 Signaltransduktionsweg reguliert. Der von PRG-3 vermittelte Regulationsmechanismus beinhaltet keine Dephosphorylierung von bioaktiven Lipiden, da keine Ektophosphataseaktivität bei PRG-3 nachgewiesen wurde.

Die Überexpression von PRG-5 resultiert ebenfalls in einer Induktion und dem verstärktem Wachstum von Filopodien in neuronalen und nichtneuronalen Zelllinien, welche ebenfalls unabhängig vom Cdc42 medierten Signaltransduktionsweg verlaufen (Broggini et al., 2010). PRG-5 überexprimierende Filopodien sind zusätzlich in der Lage, in Anwesenheit der Neuritenwachstumsinhibitoren LPA und NogoA, einen RhoA-abhängigen Neuritenkollaps zu verhindern.

1.3. LPA-vermittelte Signalübertragungsvorgänge

LPA (1-Acyl-2-Hydroxy-*sn*-Glycerol-3-Phosphat) ist als strukturbildendes Lipid in Zellmembranen vorhanden und wirkt als Mediator in Signaltransduktionsvorgängen. LPA bindet an LPA-Rezeptoren, die ihrerseits mit Guanin Nukleotid Bindungsproteinen (G-Proteine) gekoppelt sind. Obwohl einige Signalwege bekannt sind, die ohne eine Beteiligung der Rezeptoren LPA induzierte Antworten vermitteln (Hooks et al., 2001; McIntyre et al., 2003), wird die Mehrheit der Signale über die LPA-Rezeptoren geleitet. Zur Zeit sind fünf LPA Rezeptoren (LPA 1-5) bekannt (Hecht et al., 1996; An et al., 1998; Bandoh et al., 1999; Noguchi et al., 2003; Kotarsky et al., 2006). Drei weitere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, GPR87, P2Y5 und P2Y10, wurden kürzlich als vermutliche LPA-Rezeptoren identifiziert (Tabata et al., 2007; Murakami et al., 2008; Pasternack et al., 2008). LPA Rezeptoren sind in vielen Zelltypen und Geweben exprimiert (Noguchi et al., 2009). LPA vermittelte Signalübertragungsvorgänge modulieren so unterschiedliche Prozesse wie, Zellproliferation, Zellmigration, Blutzellaggregation, Wundheilung, Oocytenreifung und Spermatogonienproduktion (Schumacher et al., 1979; Lämmen et al., 1997; Balazs et al., 2001; Radeff-Huang et al., 2004; Shah and Catt, 2005; Ye et al., 2008). Im Nervensystem reguliert LPA die Retraktion von Neuriten sowie von Ausläufern der Astrozyten (Ramakers and Moolenaar, 1998; Ishii et al., 2000; Yuan et al., 2003) und beeinflusst Differenzierungsprozesse (Kingsbury et al., 2003; Fukushima et al., 2007; Spohr et al., 2008).

Das extrazelluläre LPA wird hauptsächlich durch die Spaltung von Lysophosphatidylcholin durch Autotaxin (Synonyme: Lysophospholipase D, Ektonukleotid Pyrophosphatase/ Phosphodiesterase2) gebildet. In geringerem Ausmaß wird extrazelluläres LPA durch die Deacetylierung von Phosphatidat durch die Phospholipasen A₁ (PLA₁) und A₂ produziert (van Meeteren and Moolenaar, 2007; Aoki et al., 2008). Jeder LPA-Rezeptor induziert nachfolgende Signalwege, die durch ein oder mehrere G-Proteine aktiviert werden. Die LPA-Rezeptoren (LPA 1-5) sind mit den G-Proteinen G_{α12/13}, G_{αq/11}, u G_{αi/o}, und G_{αs} gekoppelt (Fukushima et al., 2001). G_{α12/13} aktiviert RhoA, welches die Rho assoziierte Kinase (Rock) und den „serum response factor“ (SRF) aktiviert (Fromm et al., 1997). Rock induziert die Retraktion von Neuriten und den Zusammenbruch von Wachstumskegeln (Kranenburg et al., 1999). G_{αq/11} stimuliert die Phospholipase C, welche die Hydrolyse von Phosphatidylinositolbisphosphat zu Diacylglycerol (DAG) und Inositolbisphosphat (IP₃) katalysiert. DAG⁺ aktiviert die Proteinkinase C und IP₃ stimuliert die Mobilisierung von Ca²⁺ (van Corven et al., 1989). G_{αi/o} aktiviert zum einen die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K), welche ihrerseits die Rac GTPase und Akt stimuliert. Die Stimulierung des PI3K/Akt-Signaltransduktionswegs vermittelt Schutz vor durch Serumangel induzierter Apoptose in Zelllinien (Fang et al., 2000). Zum anderen aktiviert G_{αi/o} Ras und stimuliert die mitogen aktivierte Proteinkinasekaskade (MAPK) und fördert Proliferation und DNS-Synthese (Mills and Moolenaar, 2003). Außerdem inhibiert G_{αi/o} in Gegensatz zu G_{αs} die Adenylatcyclase. Die Adenylatcyclase katalysiert die cAMP Bildung. Das gebildete cAMP wirkt als „second messenger“ auf eine Vielzahl von Signaltransduktionskaskaden ein.

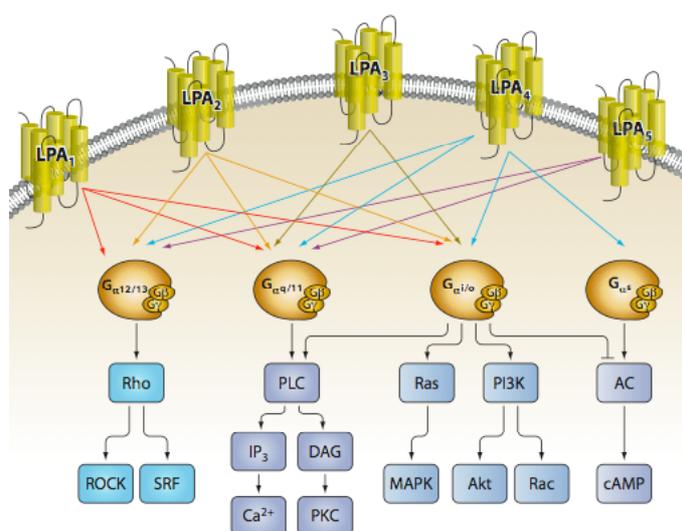


Abb. 2) Übersicht der Signaltransduktionswege, die von den LPA-Rezeptoren LPA 1-5 aktiviert werden (Choi et al., 2010). Die LPA-Rezeptoren sind mit den G-Proteinen G_{α12/13}, G_{αq/11}, G_{αi/o}, und G_{αs} gekoppelt, die eine Vielzahl von nachgeschalteten Signalkaskaden aktivieren.

1.4. Verwandtschaftsverhältnisse und Struktur der PRG-Familienmitglieder

Hydrophobizitätsanalysen des 764 Aminosäuren großen humanen bzw. 766 Aminosäuren großen PRG-1 Proteins aus Ratte und Maus, prognostizierten sechs aminoterminalen Transmembrandomänen, sowie einen ca. 400 Aminosäuren umfassenden, hydrophilen C-Terminus (Bräuer et al., 2003). Proteinsequenzvergleiche mittels „Basic Local Alignment Search Tool“ (Protein BLAST) zeigten konservierte Domänen innerhalb des N-Terminus auf, die auf eine Homologie zur Superfamilie der Phosphatidat Phosphatasen Klasse 2 (PAP2) hindeuteten. Phosphatidat Phosphatasen katalysieren die Dephosphorylierung von Phosphatidat zu Diacylglycerol. PAP2 Enzyme besitzen ein breites Substratspektrum und dephosphorylieren neben Phosphatidat auch die Lipidphosphate: LPA, Sphingosin-1-Phosphat, Ceramid-1-Phosphat und Diacylglycerolpyrophosphat (Brindley et al., 2002). PAP2 Enzyme sind integrale Membranproteine, können durch N-Ethylmaleimid nicht inhibiert werden und benötigen kein Mg^{2+} für ihre Funktion. PAP2 Homologe werden zur Proteinfamilie der Lipid Phosphat Phosphatasen (LPP) zusammengefasst. Aufgrund ihrer Homologie zur Proteinfamilie der Lipid Phosphat Phosphatasen (LPP) und ihrer Eingruppierung in die Superfamilie der Lipid Phosphatasen/ Phosphotransferasen (LPT), wird auch das Synonym LPR (lipid phosphatase related protein) für die Genfamilie der PRGs verwendet.

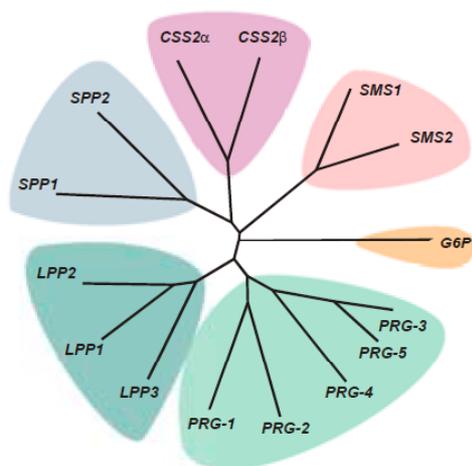


Abb. 3) Dendrogramm zur Darstellung der Verwandtschaftsverhältnisse (Sigal et al., 2005) innerhalb der Superfamilie der Lipid Phosphatasen/ Phosphotransferasen (LPT). Alle Mitglieder der LPT-Familie besitzen die gleiche Topologie der Transmembrandomänen, unterscheiden sich aber bezüglich ihrer N- und C-terminalen Anteile, sowie durch Sequenzvariationen in den katalytischen Domänen.

Durch funktionelle Studien von LPP-1 aus Ratte konnte eine subzelluläre Lokalisation des Proteins in der Plasmamembran gezeigt werden (Jasinska et al., 1999). Ebenfalls wurde dokumentiert, daß der C-Terminus von LPP-1 zytoplasmatisch gelegen ist. Mutationsanalysen des murinen LPP-1 Proteins identifizierten drei extrazellulär gelegene, konservierte Regionen, aus denen sich das katalytisch aktive Zentrum zusammensetzt (Zhang et al., 2000; Brindley et al., 2002), sowie die extrazelluläre Position eines funktionellen N-Glykosylierungsortes.

Ausgehend von den strukturellen Modellen der LPP-Orientierung in der Membran liegen der

N- und C-Terminus des PRG-1 Proteins intrazellulär.

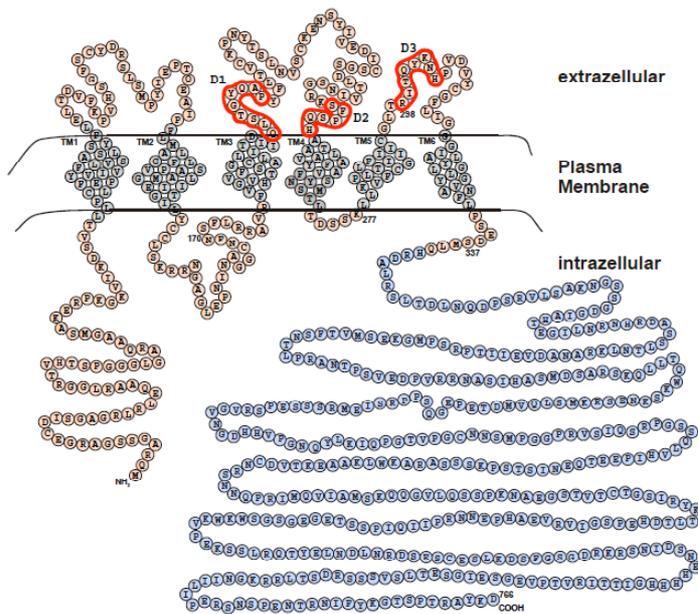


Abb. 4) Strukturmodell von PRG-1 (Bräuer and Nitsch, 2008) basierend auf strukturellen Modellen von LPP-1. PRG-1 verfügt über sechs Transmembrandomänen und einen intrazellulär gelegenen N- bzw. C-Terminus. Rot eingezeichnet sind die katalytisch aktiven Domänen (D1-D3) der Lipid Phosphat Phosphatasen, die bei PRG-1 Sequenzabweichungen aufweisen.

Sequenzanalysen der Phosphatasedomänen von PRG Familienmitgliedern zeigten, daß die für die Phosphatasefunktion (Stukey and Carman, 1997) wichtigen katalytischen Domänen (D1: KXXXXXXXXRP, D2: SXH, D3: RXXXXXHXXXD) der PRGs Sequenzabweichungen zu den als Ektoenzym wirkenden Mitgliedern der LPP-Superfamilie aufweisen (Sigal et al., 2005). Daher ist entgegen der ursprünglich postulierten Funktion von PRG-1 als Ektophosphatase nicht davon auszugehen, daß die Mitglieder der PRG-Genfamilie in der Lage sind, Dephosphorylierungsreaktionen zu katalysieren (McDermott et al., 2004).

h-PRG1	IQLSTGYQAP	SQHATLAafa	GLTRI TQYKNHPVDV
h-PRG2	IQLATGYHTP	SQHATLSaFa	GLTQI TQYRSHpVDV
h-PRG3	GQVVTGHI TP	SKHAALSiYS	GLNRVSEYfRNHCSDV
h-PRG4	GQVVTGNF TP	CKDAALCaYA	GVVRVAEYfRNHWSDV
h-PRG5	GQVVTGNLAP	SKEAALSvYA	GLNRVAEYfRNHWSDV
h-LPP-1	AKYSIGRLRP	SGHSSfSMYA	GLSRVSDYKHhWSDV
	D1	D2	D3
Konsensus	KXXXXXXXXRP	SXH	RXXXXXHXXXD

Abb.5)

Aminosäuresequenzen der katalytisch wirksamen Domänen humaner Proteine der PRG-Familie und LPP-1 (Bräuer and Nitsch, 2008). In der Konsensussequenz rot eingezeichnet sind die für die Phosphataseaktivität notwendigen Aminosäuren.

1.5. Expression von PRG-1

Northern Blot Analysen von PRG-1 aus Ratte dokumentierten eine starke Expression im zentralen Nervensystem (ZNS), sowie eine geringe Expression in den Hoden. *In situ* Hybridisierungen dokumentierten die Expression von PRG-1 in Ratte ab Tag 18,5 nach Empfängnis (E18,5) im Hippocampus und in der subventrikulären Zone (Bräuer et al., 2003).

Postnatal wurde eine Expression im Hippokampus und im entorhinalen Kortex nachgewiesen. Im Gyrus dentatus wurde eine PRG-1 Expression zuerst im infrapyramidalen Blatt bei Geburt (P0) dokumentiert, fünf Tage später (P5) im suprapyramidalen Blatt. Western Blot Analysen von Gesamthirnhomogenaten zeigen eine maximale Expression des PRG-1 Proteins bei juvenilen (P15) Mäusen. Nach entorhinaler Kortexläsion (ECL) ist die mRNA Expression von PRG-1 im kontralateralen, sowie im ipsilateralen Hippocampus gesteigert und zeigt ein Maximum am fünften Tag nach Läsion. Transfektionstudien von PRG-1-EGFP Konstrukten in Cos7-Zellen zeigen eine Lokalisation des rekombinanten Proteins in der Plasmamembran und in Zellausläufern. Immunhistologische Untersuchungen in wiederauswachsenden Axonen des *Nervus fascialis* zeigten eine verstärkte Expression von PRG-1 (Peeva et al., 2006).

PRG-1 ist im ZNS rein neuronal exprimiert (Trimbuch et al., 2009). Kollokalisationsstudien dokumentierten keine Kollokalisation von PRG-1 und GABAergen Markern. Eine Lokalisation von PRG-1 in der postsynaptischen Dichte (PSD) glutamaterger Neurone wurde durch Kollokalisation mit den Markern Homer1 und ProSAP2 nachgewiesen. Es konnte keine Kollokalisation von PRG-1 mit Gephyrin, einem Marker der PSD von GABAergen Synapsen gezeigt werden. Subzelläre Fraktionierungen, gefolgt von Westernblot Analysen, bestätigen die Anwesenheit von PRG-1 in der PSD, in den präsynaptischen Vesikelfractionen war PRG-1 nicht nachweisbar.

1.6. Transkriptionelle Regulation von PRG-1

Zur Zeit ist lediglich die transkriptionelle Regulation von PRG-1 durch den Transkriptionsfaktor Nex-1 (Math2/NeuroD6) bekannt (Yamada et al., 2008). Im Rahmen einer Genexpressionsanalyse Nex-1 überexprimierender, kultivierter, kortikaler Neurone wurde PRG-1 als reguliertes Gen identifiziert. Nex-1 gehört zur Genfamilie der basischen Helix-Loop-Helix (bHLH) Transkriptionsfaktoren. Mitglieder der bHLH-Genfamilie erkennen und binden die Konsensussequenz CANNTG, die auch als E-Box bezeichnet wird, in der Promotorregion ihrer Zielgene (Massari and Murre, 2000). In der vorbezeichneten Studie identifizierten *in silico* Analysen sechs E-Boxen innerhalb von 500 bp stromaufwärts des Translationsstartpunkts (ATG) von PRG-1. Mittels Chromatin-Immunpräzipitations-Analysen von Nex-1 transfizierten PC12-Zellen konnte die Bindung von Nex-1 an mindestens eine E-Box in der Promotorregion von PRG-1 aus Ratte nachgewiesen werden. Mittels Dual-Luziferase Assays in HEK 293-Zellen wurde die Lokalisation der E-Box, welche die Regulation von PRG-1 vermittelt identifiziert. Kotransfektionen von Promoter-Deletionskonstrukten und einem Nex-1 Expressionsvektor zeigten eine ca. vierfache Aktivierung der Transkription von allen Konstrukten, die die vorab identifizierte E-Box

enthielten. Im Rahmen der gleichen Studie wurde gezeigt, daß die Überexpression von PRG-1 oder Nex-1 das Neuritenwachstum von PC12 Zellen stimulierte. In weiteren Transfektionsstudien, gefolgt von quantitativen Real-Time PCR Analysen wurde gezeigt, daß das durch Nex-1 induzierte Neuritenwachstum in PC12 Zellen tatsächlich über eine Aktivierung der Transkription von PRG-1 mediiert wird.

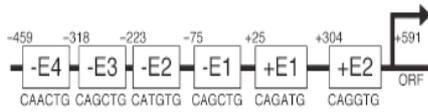


Abb. 6) Anordnung der identifizierten E-Boxen vor dem Translationsstartpunkt von PRG-1 (Yamada et al., 2008). Bezeichnung der E-Boxen bezüglich ihrer Lage zum Transkriptionsstartpunkt: NM_001001508.

1.6.1. Die Genfamilie der Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktoren

Bislang konnten mehr als ca. 350 Mitglieder der Genfamilie (Ledent and Vervoort, 2001) der basischen Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktoren (bHLH) in eukaryontischen Organismen identifiziert werden. Die hochkonservierte Familie der Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktoren reguliert ein breites Spektrum von Entwicklungsprozessen. Sie verfügen über eine DNS-Bindungsdomäne und über eine Proteininteraktionsdomäne (Murre et al., 1989). Die von vorwiegend basischen Aminosäuren gebildete, stromaufwärts der HLH-Domäne gelegene Region mediiert die Bindung an die DNS. Die beiden Helizes bilden über hydrophobe Wechselwirkungen Dimere mit einer weiteren HLH-Domäne (Ferré-D'Amaré et al., 1993), wobei Homo- oder Heterodimere entstehen können. Die Strukturanalyse des Transkriptionsfaktors Max dokumentierte eine Zusammensetzung des bHLH-Motivs aus zwei amphipatischen α -Helizes mit einer verbindenden, variablen Loop Region.

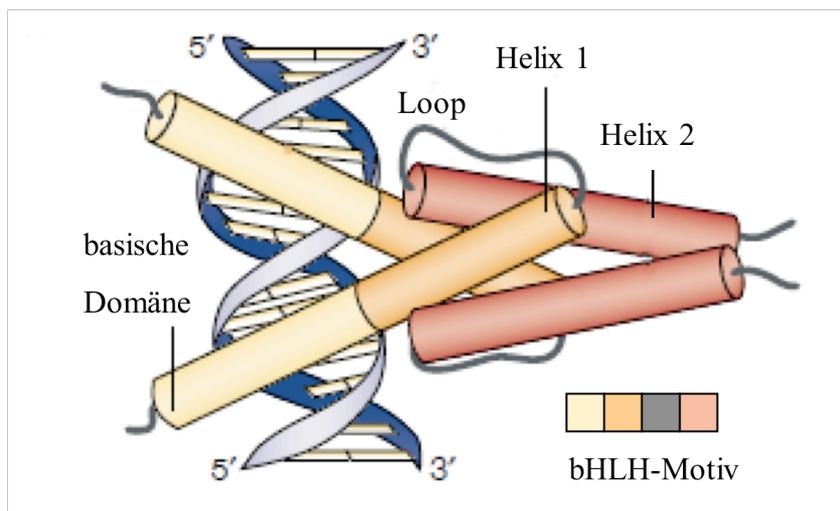


Abb. 7) Schematische Ansicht eines bHLH-Dimers (modifiziert nach Bertrand et al., 2002). Die basische Domäne des Motivs bindet an die DNS. Die beiden Helizes des Motivs dimerisieren mit einem weiteren bHLH Protein.

Zur Zeit werden bHLH-Transkriptionsfaktoren in funktionell verschiedene Klassen (Klasse I-IV) unterteilt, abhängig von ihrer Fähigkeit Homo- oder Heterodimere zu bilden, ubiquitär oder gewebsspezifisch exprimiert zu werden und der Spezifität ihrer DNS-Bindung (Massari

and Murre, 2000). Die wichtigsten Charakteristika der einzelnen Klassen sind in nachfolgender Tabelle zusammengefasst.

	Eigenschaften funktioneller Klassen der bHLH-Superfamilie (Massari and Murre, 2000)
Klasse I	Ubiquitär exprimiert, bildet Homo- oder Heterodimere. Synonym: E-Proteine.
Klasse II	Gewebsspezifisch exprimiert, bildet abgesehen von wenigen Ausnahmen Heterodimere mit Klasse I. Die Interaktion mit Klasse I Proteinen führt meist zur Aktivierung der Zielgene.
Klasse III	Besitzen ein zusätzliches Leucin-Zipper Motiv neben dem bHLH-Motiv z.B. Myc-Familie.
Klasse IV	Dimerisiert mit Klasse III und Klasse IV-Proteinen z.B. Mad/Max-Familie.
Klasse V	Besitzen keine basische Domäne und binden dadurch nicht an DNS. Sie wirken als negative Regulatoren von Klasse I & II, indem sie durch die Bildung inaktiver Dimere die Menge der Klasse I Proteinen verringern z.B. Id „Inhibitor of differentiation“ und emc „Extramacrochaetae“.
Klasse VI	Besitzen einen Prolinrest in der basische Domäne, bilden funktionstüchtige Dimere binden bevorzugt sog. N-Box Konsensussequenzen z.B. Hairy & Enhancer of split.
Klasse VII	bHLH-Motiv mit zusätzlicher PAS-Domäne.

Eine Klassifikation anhand evolutionärer Verwandtschaftsverhältnisse (Klasse A-F) wird parallel verwendet (Atchley and Fitch, 1997; Ledent and Vervoort, 2001).

In Hefen sind bHLH-Transkriptionsfaktoren hauptsächlich für metabolische Prozesse verantwortlich, u.a. für die Regulation der Phospholipid Biosynthese (Hoshizaki et al., 1990; Nikoloff et al., 1992), die Regulation der Phosphatase (Berben et al., 1990) und für stressinduzierte Regulationsmechanismen (Nishizawa et al., 2008). In höheren Organismen sind bHLH-Transkriptionsfaktoren an Differenzierungsprozessen beteiligt, z.B. Neurogenese, Myogenese, Hämatopoese und der Entwicklung des Pankreas (Shieh and Tsai, 1991; Weintraub et al., 1991; Guillemot et al., 1993; Porcher et al., 1996).

1.6.2. bHLH-Transkriptionsfaktoren in der Neurogenese

1.6.2.1. bHLH-Transkriptionsfaktoren in der Neurogenese von *Drosophila*

Im Verlauf der Neurogenese entwickeln sich teilungsfähige Vorläuferzellen zu neuronalen Vorläuferzellen mit beschränktem Zellteilungspotential, bevor sie oder ihre Nachkommen sich zu Neuronen oder Gliazellen ausdifferenzieren. Der Verlauf dieses Prozesses differiert in verschiedenen Organismen, jedoch konnte immer eine Beteiligung von bHLH-Transkriptionsfaktoren aufgezeigt werden. Die ersten Erkenntnisse über eine koordinierte Interaktion von bHLH-Transkriptionsfaktoren, im Rahmen der Neurogenese wurden in *Drosophila* gewonnen. In *Drosophila* wird der Prozess der Neurogenese durch Proneuralgene und die Produkte neurogener Gene des Notch Signaltransduktionswegs reguliert.

Proneuralgene in *Drosophila* werden in die Familie des Achaete/Scute (AS/C) Komplex und die Familie der Atonal verwandten Proteine (ARP) untergliedert. Die Einteilung in AS/C bzw. ARP-Familienmitglieder beruht auf der Homologie der einzelnen Familienmitglieder zueinander, funktional wirken einige der Familienmitglieder nicht als Proneuralgene. AS/C-Proteine werden durch die benachbarten Gene *achaete (ac)*, *scute (sc)* und *lethal of scute [l'(sc)]* kodiert (García-Bellido and Santamaria, 1978; Ghysen and Dambly-Chaudière, 1988; Dambly-Chaudière and Vervoort, 1998), sowie durch das Gen *asense (ase)*. Im Gegensatz zu den anderen Genprodukten des AS/C-Komplexes wirkt *asense* nicht als Proneuralgen in ektodermalen Zellen, sondern wird in den neuronalen Vorläuferzellen exprimiert (Jarman et al., 1993b). AS/C-Proteine sind in Ausbildung der externen sensorischen Organe (Sinnesborsten) involviert. Die ARP-Familie ist in die Ausbildung der Chordotonalorgane (Propriorezeptoren), chemosensorischen Organe und Photorezeptoren involviert. Zur ARP-Familie gehören die Gene *atonal (ato)*, *absent multidendritic neurons and olfactory sensilla (amos)*, *cousin of atonal (cato)* und *target of ponx/biparous(tap)* (Jarman et al., 1993a; Goulding et al., 2000a; Hassan and Bellen, 2000). Die Gene *cato* und *tap* wirken hierbei nicht als Proneuralgene. *cato* wird im Verlauf der Entwicklung des peripheren Nervensystems exprimiert, vor der terminalen Differenzierung der Neurone (Goulding et al., 2000b; zur Lage and Jarman, 2010). *tap* agiert im Verlauf der Entwicklung olfaktorischer und gustatorischer Organe (Gautier et al., 1997; Ledent et al., 1998).

Durch die Expression von Proneuralgenen in ektodermalen Zellgruppen wird diesen die Kompetenz verliehen, sich zu neuronalen Vorläuferzellen zu entwickeln (Campuzano and Modolell, 1992; Jan and Jan, 1993). Proneurale Transkriptionsfaktoren dimerisieren mit dem Klasse I Protein Daughterless und aktivieren nachgeschaltete neuronale Zielgene (Cabrera and Alonso, 1991). Die korrekte Musterbildung der sensorischen Organe wird über laterale Inhibierungsmechanismen mediiert, hierbei wirken der membranständige Rezeptor Notch und dessen Ligand Delta (Muskavitch, 1994; Artavanis-Tsakonas et al., 1999), sowie negative Regulatoren der Neurogenese wie die bHLH-Proteine Hairy, Extramacrochaetae und die durch den Enhancer of split Komplex kodierten Proteine (Botas et al., 1982; Campos-Ortega, 1994; Fisher and Caudy, 1998). Enhancer of split Gene werden durch Notch-Signaltransduktion aktiviert und ihre Genprodukte blockieren ebenso wie Hairy die neuronale Differenzierung, indem proneurale bHLH-Aktivatoren inhibiert werden. Des weiteren rekrutieren Hairy und Enhancer of split, über ein konserviertes Bindungsmotiv, den Korepressor Groucho (Fisher and Caudy, 1998).

1.6.2.2. bHLH-Transkriptionsfaktoren in der Neurogenese von Vertebraten

In Vertebraten konnten zahlreiche homologe Proteine zu den in der Neurogenese von *Drosophila* wirkenden Transkriptionsfaktoren identifiziert werden (Hassan and Bellen, 2000; Bertrand et al., 2002). Zur Familie der Achaete/Scute Homologen in Vertebraten gehört *ash1*, welches in allen bislang analysierten Spezies gefunden werden konnte (z.B. *Zash1* in Zebrafisch, *Xash1* in Xenopus), sowie 3 weitere homologe Gene: *Mash2* in Säugetieren, *Xash3* in Xenopus und *Cash4* im Haushuhn. Homologe zur Familie der Atonal verwandten Proteine wurden in größerer Anzahl gefunden und anhand der Ähnlichkeit ihrer bHLH-Domänen in verschiedene Subgruppen untergliedert. Zur Atonal-Gruppe gehören die Gene: *Math1*, *Math5* und *Math6*, die Nato-Gruppe umfasst das Gen *Nato3*. Zur Neurogenin-Gruppe zählen: *Neurogenin1/Math4C*, *Neurogenin2/Math4A*, *Neurogenin3/Math4B*. Zur NeuroD-Gruppe gehören die Gene: *NeuroD/Beta2*, *Math2/Nex1/NeuroD6*, *Math3/NeuroM*, *NeuroD2/mNDRF/KW8*. Die Olig-Gruppe umfasst die Mitglieder: *Olig1-3*, *Beta3* und *Beta4*. Die NSCL-Gruppe, die den geringsten Verwandtschaftsgrad zu den Atonal verwandten Proteine aufweist beinhaltet: *NSCL1/Hen1/Nhlh1* und *NSCL2/Hen2/Nhlh2*.

Auch in Vertebraten dimerisieren proneurale Transkriptionsfaktoren mit Klasse I Proteinen um nachfolgende Zielgene zu aktivieren, hierbei wirkt anstelle von *daughterless* das bHLH-Protein E2A. Es wurden ebenfalls verwandte Proteine zu den negativen Regulatoren aus *Drosophila* identifiziert, die Familien der Hes und Hey Gene stellen die Säugetierentsprechungen der Hairy und Enhancer of split Genfamilien aus *Drosophila* dar. Hey Gene ebenso wie einige Mitglieder der Hes Genfamilie werden durch den Delta-Notch Signaltransduktionsweg aktiviert und inhibieren neuronale Differenzierungsprozesse (Fischer and Gessler, 2007). Hes Genprodukte binden die Proteine TLE 1-4, die Homologie zu Groucho aufweisen und erzeugen dadurch einen Repressorkomplex (Chen and Courey, 2000). Die zu den Proneuralgenen aus *Drosophila* homologen bHLH Transkriptionsfaktoren agieren in regulatorischen Kaskaden, mit früh exprimierten Genen, die Kompetenz oder Determinierung regulieren und später exprimierten Genen, die den Differenzierungsprozess regulieren. Im Speziellen besitzen Neurogenin1 und 2 und Mash1 Determinierungsfunktionen in verschiedenen Zellabstammungslinien im PNS und ZNS (Nieto et al., 2001). Die bHLH Differenzierungsfaktoren sind Mitglieder der NeuroD/Nex-Familie und beinhalten NeuroD1/Beta2, NeuroD2/NDRF und Nex1/Math2. Ebenso wie die Determinierungsfaktoren sind die Differenzierungsfaktoren E-Box bindende Transkriptionsaktivatoren, welche bei Überexpression ausreichen, um Zellzyklusarrest und neuronale Differenzierung in Kultur zu

induzieren. Determinierungsfaktoren werden in Vorläuferzellen exprimiert, aus denen nachfolgend Neuronen und Glia entstehen können. Differenzierungsfaktoren sind spezifisch für Zellen, die Neuronen sind oder werden. Die Expression der Differenzierungsfaktoren beginnt im unreifen Neuron und wird während der neuronalen Differenzierung beibehalten (Kageyama et al., 1997; Lee, 1997; Guillemot, 1999; Ross et al., 2003; Guillemot, 2007).

1.6.2.3. Expression und Regulation von Nex1/Math2

Die Expression des bHLH Transkriptionsfaktors Nex-1 beginnt am Tag 12,5 (E 12,5) nach Empfängnis (Shimizu et al., 1995), erreicht ihr Maximum in der ersten postnatalen Woche (P5), parallel zum Zeitpunkt der dendritischen Verzweigung und Synaptogenese von kortikalen Neuronen und wird danach herunterreguliert. Die Expression von Nex1 ist neuronenspezifisch und beschränkt auf das ZNS. *In situ* Hybridisierungen dokumentieren die stärkste Nex1 mRNA Expression im dorsalen Telencephalon inklusive des Neokortex, Hippocampale Anlage und Riechkolben zum Zeitpunkt E 17. Zu einem geringeren Ausmaß wurde eine Expression der Nex1 mRNA in caudaleren Anteilen des ZNS gefunden und in migrierenden Neuronen, welche die kortikale Platte und die intermediäre Zone bilden. In der adulten Ratte wird Nex1 in einer Teilmenge von maturaen Neuronen stark exprimiert: der gesamte Neokortex mit den stärksten Signalen in Schicht III, V und VI, Schicht II des Gyrus cingulatus, der enthorhinale Kortex, die Amygdala und in postmigratorischen Körnerzellen. Kotransfektionsstudien von Nex1 Promoterdeletionskonstrukten mit einem Nex1 Expressionsvektor in PC12 Zellen zeigen, daß Nex1 transaktivierend auf den eigenen Promoter wirkt und *in vivo* ein Zielgen für Autoregulation darstellt (Bartholomä and Nave, 1994). Die Expression von Nex1 verläuft unter der Kontrolle von zwei konservierten Promotoren (Nex1-P1 und Nex1-P2), die beide keine TATA-Box besitzen und das Nex1 Transkript über multiple Startorte initiieren (Uittenbogaard et al., 2007). Beide Promotoren werden von „nerve growth factor“ oder cAMP in PC12 Zellen aktiviert.

1.6.2.4. Funktionen des Transkriptionsfaktors Nex1

Nex-1 KO-Mäuse sind fertil und fähig ihren Nachwuchs aufzuziehen. Keine Verhaltens- oder motorische Auffälligkeiten konnten aufgezeigt werden. Keine offensichtlichen, histologischen Unterschiede zu WT-Kontrollen konnten dokumentiert werden (Schwab et al., 1998). Dem offensichtlichen Mangel eines Phänotyps könnte eine funktionelle Kompensation durch andere bHLH Transkriptionsfaktoren *in vivo* zugrunde liegen. Aufgrund ihres zeitlich und räumlich überlappenden Expressionsmusters könnten NeuroD und NDRF eine Nex1 Defizienz ausgleichen, allerdings konnte in Nex-1 KO-Mäusen weder eine stärkere

Expression von NeuroD noch von NDRF beobachtet werden. Bei der Familie der myogenen bHLH Transkriptionsfaktoren sind funktionelle Kompensationmechanismen *in vivo* nachgewiesen (Rudnicki et al., 1993; Braun and Arnold, 1995; Wang et al., 1996). Im Gegensatz zu Tiermodellen konnten in Zellkulturstudien erfolgreicher Funktionen von Nex-1 ermittelt werden. In PC12-Zellen wurde gezeigt, daß die Expression von Nex1 durch „nerve growth factor“(NGF) induziert werden kann. Eine konstitutive Expression von Nex-1 in PC12 Zellen induziert spontane Neuritogenese und fördert das Auswachsen von Neuriten und ihre Regeneration in Abwesenheit von NGF (Uittenbogaard and Chiaramello, 2002). Das Auswachsen der Neuriten ist begleitet von einer erhöhten Expression von GAP-43 (growth associated protein 43), β -III-Tubulin und NeuroD. Zusätzlich wurde eine gesteigerte Expression des mitotischen Inhibitors p21^{WAF1} dokumentiert, so daß die von Nex1 vermittelten Prozesse der neuronalen Differenzierung mit dem Ausstieg aus dem Zellzyklus verknüpft werden. Mit Hilfe einer konstitutiv exprimierenden Nex1 PC12 Zelllinie konnte durch die Expression einer Gruppe von Hitze-Schock-Proteinen, welche bekanntermaßen die Dynamik des Zytoskeletts und das neuronale Überleben beeinflussen, gezeigt werden, daß Nex-1 neuronale Differenzierungsprozesse mit Überlebens-Signalwegen verbindet (Uittenbogaard et al., 2010a). Mit Hilfe der vorbezeichneten Zelllinie wurde außerdem gezeigt, daß Überexpression von Nex1 die mitochondriale Masse zu einem frühen Zeitpunkt der neuronalen Differenzierung erhöht. Durch die zeitliche Koordinierung mit zytoskelettalen Remodellierungsprozessen werden die Mitochondrien in den sich entwickelnden neuronalen Ausläufern verteilt und akkumulieren in Wachstumskegeln (Uittenbogaard et al., 2010b).

1.7. Zielstellung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Reportermausmodell erzeugt werden, das Reporterexpression unter Kontrolle des nativen PRG-1 Promoters vermittelt. Da das Transmembranprotein PRG-1 vorwiegend dendritisch lokalisiert ist, können mit konventionellen Antikörpermarkierungen axonale Verknüpfungen der PRG-1 exprimierenden Neurone nicht dargestellt werden. YFP als frei diffundierbares, zytoplasmatisches Reporterprotein ermöglicht die *in vivo* Darstellung von Axonen und Somata PRG-1 exprimierender Neurone.

Zu Beginn dieser Arbeit war lediglich die von Nex-1 mediierte transkriptionelle Regulation von *prg1* bekannt. Zur näheren Charakterisierung dieses Regulationsmechanismus sollte durch Studien an Nex-1-KO Mausmodellen gezeigt werden, ob das spezifische, rein neuronale Expressionsmuster von PRG-1 durch Nex-1 Defizienz moduliert wird. Zur näheren Charakterisierung der Promoterregion sollten weitere cis-regulatorische Elemente identifiziert werden, welche die neuronale Expression von PRG-1 vermitteln und auf eine potentielle Interaktion mit Nex-1 untersucht werden.

Ein Transkriptionsstart von PRG-1 war zu Beginn dieser Studie bekannt, cDNS-Sequenzen implizierten Hinweise auf weitere, bislang unbekannte Transkriptionsstartstellen. Daher sollte ermittelt werden, ob zusätzliche Transkriptionsstartpunkte von PRG-1 existieren.

Das kürzlich beschriebene Funktionsmodell von PRG-1 deutet auf eine Rolle bei der synaptischen Signalübertragung hin. Zur weiteren Untersuchung der von PRG-1 vermittelten Funktionen sollten im Rahmen dieser Arbeit potentielle Interaktionspartner identifiziert werden. Die neuen Bindungspartner sollen helfen, mögliche Einbindungen von PRG-1 in intrazelluläre Signalkaskaden zu untersuchen. Außerdem sollte die Interaktion von PRG-1 mit putativen Bindungspartnern auf Proteinebene verifiziert werden.

2. Material & Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Binokular GZ 6:	Leica, Bensheim
Digitale Kamera Photometric Cool Snap ES:	Visitron Systems, Puchheim
Digitale Kamera Intas:	Intas, Göttingen
Elektrophorese-System Mini-Protean II:	BioRad, München
Elektrophoreseeinheiten:	Mighty Small II Hoefer, San Francisco, USA
Geldokumentationsanlage:	Intas UV-Systeme, Göttingen
Gene Linker:	GS, BioRad, München
Heizblock:	SK1101D, Duxford Cambridge, UK
Heizrührer:	RCTbasic, IKA Labortechnik, Staufen
Inkubatoren:	Hera Cell 240, Heraeus, Hanau Nuaire US Auto Flow, Plymouth, USA
Kryostat:	Leica, CM 1900, Bensheim
Laborwaage:	MC1, Satorius AG, Göttingen
Mikroskope:	Konfokales Laser Scanning Mikroskop, Leica TCS SL, Bensheim Fluoreszenzmikroskop BX50, Olympus, Hamburg Fluoreszenzmikroskop Ck2, Olympus, Hamburg
Photometer:	Pharmacia Biotech Ultrospec 2000, UV/VIS Spectrophotometer, Cambridge, England
pH-Meter:	Phi32, Beckmann Instruments, Fullerton, USA
Power Pac 200:	BioRad, München
Schüttelinkubator:	Gerhardt, Königswinter; Lab-Shaker Kühner AG Birsfelden, Schweiz

Sonifier:	SH70G, Bandelin Elektronik, Berlin
Trans-Blot SD:	Semi-Dry Transfer Cell 240, BioRad, München
Thermocycler:	Thermocycler MJ Research, MWG, Ebersberg
Thermomixer:	Thermomixer Comfort, Eppendorf, Hamburg
Rundschüttel-Inkubatoren:	Roto-Shake Genie, Scientific-Industries, Inc., Bohemia, N.Y., USA
Vakuumgelrockner:	BioRad, München
Vortex Genie™2:	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Vibratom:	HM650V, Microm, Walldorf
Wasserbad:	Huber, Offenburg; Polystat, Hyber GmbH, Offenburg
Zentrifugen:	Beckmann Coulter Optima L-90K Ultracentrifuge, Krefeld Eppendorf Zentrifuge 5471R, Hamburg Eppendorf Zentrifuge 5804R, Hamburg Hettich Zentrifugen Rotina 35R, Tuttlingen Biofuge pico, Heraeus, Hanau

2.1.2. Chemikalien

2.1.2.1. Chemikalien

Die eingesetzten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Difco (Hamburg), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen), Invitrogen (Karlsruhe), Amersham Biosciences (Uppsala, Schweden), Pierce (Rockford, USA), Roth (Karlsruhe) und BioRad (München) in analytischer Qualität bezogen. Glasdeckplättchen für die Zellkultur wurden von den Firmen Marienfeld und Assistent benutzt. Plastikwaren, die nicht für die Zellkultur benutzt wurden, wurden zusätzlich zu den bereits genannten Firmen von Eppendorf (Hamburg), Greiner (Solingen) und Sarstedt (Nürnbrecht) bezogen. Für Kernfärbungen wurde 4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI) von Roche (Mannheim) bezogen.

2.1.2.2. Radiochemikalien

(α - ³² P)dCTP, 3000 Ci/mmol	Hartmann Radiochemikalien, Braunschweig
(γ - ³² P) ATP, 3000 Ci/mmol	Hartmann Radiochemikalien, Braunschweig

2.1.3. Molekularbiologisches Material

2.1.3.1. Nukleotide

dNTP's	Bioline, Luckenwalde
--------	----------------------

2.1.3.2. DNS- Größen & Mengenstandards

Hyperladder I™, Hyperladder IV™	Bioline, Luckenwalde
---------------------------------	----------------------

2.1.3.3. Enzyme

Enzym		Hersteller
Restriktionsendonukleasen	BamHI, EcoRI, HindIII, MluI, NotI, P1-SceI, SacI, SacII, Sall, XbaI, XhoI	New England Biolabs (Ipswich, USA)
DNS-Polymerase	Herculase	Stratagene (Agilent, Santa Clara, USA)
DNS-Polymerase	GoTaq	Promega (Madison, USA)
Phosphatase	shrimp alkaline phosphatase (SAP)	Promega (Madison, USA)
Phosphatase	calf intestinal phosphatase (CIP)	Invitrogen (Carlsbad, USA)
DNS-Ligase	T4-DNS-Ligase	New England Biolabs (Ipswich, USA)
Reverse Transkriptase	SuperscriptIII™	Invitrogen (Carlsbad, USA)
DNase	DNaseI (RNase free)	New England Biolabs (Ipswich, USA)
Polynukleotidkinase	T4-Polynukleotidkinase	New England Biolabs (Ipswich, USA)

2.1.3.4. Oligonukleotide

Tabelle: Nukleinsäuresequenzen verwendeter Oligonukleotide

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'-3') ^a	T _m (C°) ^b	Produkt
BoxGfw	<u>GAG CTC</u> CCT TCT GTG GCC TAC TTG TCC	64	Homologiebox Box G
BoxGrew	<u>GAG CTC</u> CAG CGC CCC CGC CTT TTC CCC GC	68	Homologiebox Box G
BoxHfw	<u>GAA TTC</u> GGT TCC AGC GGT GCC CGC GGG	66	Homologiebox Box H
BoxHrew	<u>AAG CTT</u> GGA GAA AAA CCT GTG GGA G	51	Homologiebox Box H
PAfw	<u>GCG GCC</u> <u>GCG</u> ACT CTA GAT CAT AAT C	40	Polyadenylierungssequenz
PArew	<u>GGA TCC</u> CTT AAG ATA CAT TGA TGA G	42	Polyadenylierungssequenz
YFPinsitu _{fw}	<u>AAG CTT</u> ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG	58	YFP-Sequenz in pSPT 18/19
YFPinsitu _{rew}	<u>TCT AGA</u> CTT AAG ATA CAT TGA TGA GTT	45	YFP-Sequenz in pSPT 18/19
BacEndefw	GGC ATG CAC CAC CAC TGC CCA GCA CC	67	Genotypisierungsprimer PRG-1 Yellow-BAC Maus
BacStartrew	CCT GTG GTG GAT ATC TTC ACT G	55	Genotypisierungsprimer PRG-1 Yellow-BAC Maus

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'-3') ^a	T _m (C°) ^b	Produkt
pBAC3.6fw	CCC GAA TTG ACT AGT GGG TAG GCC	61	Genotypisierungsprimer PRG-1 Yellow-BAC Maus
pBAC3.6rew	GAC TCA CTA TAG GGA GAG GAT CCG	59	Genotypisierungsprimer PRG-1 Yellow-BAC Maus
GeneRacer 5'Primer	CGA CTG GAG CAC GAG GAC ACT GA	74	RACE5'Primer, Invitrogen
RatRace1	AAC CTG TGC ACT CCG GAT TCA GTT GCT A	61	RACE 3'Primer Ratte
RatRace2	GTG ATC AAG GAC AGC GTC ACC CTC CTG	64	RACE 3'Primer Ratte
RatRace3	GCG GTG GAG AGC CCA GGG AGA GTG GCA	69	RACE 3'Primer Ratte
MausRace1	ATC TGT GGG ATC ATC TGC GGA CTA ACA C	61	RACE 3'Primer Maus
MausRace2	TTT GCC GCT GTG TAT GTG TCC ATG TAC T	60	RACE 3'Primer Maus
MausRace3	GTC TTA GCA TGC CGT ACA TTG AGC CAA C	61	RACE 3'Primer Maus
M- 119fw	GCT GCT ATC CCT TGC CCG CAA AAC AC	63	RACE-PCR-Analyse
M- 240fw	CCT ATT TTT GAC GTC AAG CTC AAC C	56	RACE-PCR-Analyse
M- 509fw	GGC AGG GCT GTC ACG CTT GGG TAG C	66	RACE-PCR-Analyse
M+222rev	CAA CGA AAT AAA AAC AGG GCA G	51	RACE-PCR-Analyse
m-160fw	<u>ACG CGT</u> GGG AGG GGA AGC CAT CTC AG	58	Klonierung in pGL3
m+145rev	<u>CTC GAG</u> CGG CCG CCT GCC GGG CTC CAA GTC C	71	Klonierung in pGL3
m-297fw	<u>ACG CGT</u> CTT GGC TCC TCA GCC TTG CTT CTA CAG	63	Klonierung in pGL3
m-1724fw	<u>ACG CGT</u> TAG AAC TGC GTT CAT CAA CAG AGA G	56	Klonierung in pGL3
m-1724rev	<u>CTC GAG</u> TAG AAC TGC GTT CAT CAA CAG AGA G	56	Klonierung in pGL3
m+39rev	<u>CTC GAG</u> GCC GCT GAT GCT ACA TTC C	53	Klonierung in pGL3
m+39fw	<u>ACG CGT</u> GCC GCT GAT GCT ACA TTC C	53	Klonierung in pGL3
Slice GFPfw	<u>AAG CTT</u> ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG	58	Klonierung Sliceelektroporationsvektor
Slice GFPrev	<u>TCT AGA</u> CTT AAG ATA CAT TGA TGA GTT	47	Klonierung Sliceelektroporationsvektor
Nex-1fw	<u>GTC GAC</u> CAT GTT AAC ACT ACC GTT TGA CG	53	Nex-1 Expressionsvektor
Nex-1rev	<u>CTC GAG</u> TTA ATT ATG AAA AAC TGC ATT TA	54	Nex-1 Expressionsvektor
EMSA1fw	CCT TGG CTC CTC AGC CTT GCT TCT GCA GA	75	Ziel DNS für Gelshift
EMSA1rev	TCT GCA GAA GCA AGG CTG AGG AGC CAA GG	75	Ziel DNS für Gelshift
EMSA2fw	AGA AAC CAG GAG TGC CTC CCC CCA CTA TT	73	Ziel DNS für Gelshift
EMSA2rev	AAT AGT GGG GGG AGG CAC TCC TGG TTT CT	73	Ziel DNS für Gelshift
EMSA3fw	TAT TTT TGA CGT CAA GCT CAG ACA ACC A	66	Ziel DNS für Gelshift

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'-3') ^a	T _m (C°) ^b	Produkt
EMSA3rev	TGG TTG TCT GAG CTT GAC GTC AAA AAT A	66	Ziel DNS für Gelshift
EMSA4fw	ACC AGC AGA GGA GCC TCA CAG CTT GGG	74	Ziel DNS für Gelshift
EMSA4rev	CCC AAG CTG TGA GGC TCC TCT GCT GGT	74	Ziel DNS für Gelshift
EMSA5fw	GCT TGG GCG GTG GAG AGC CCA GGG AGA GT	79	Ziel DNS für Gelshift
EMSA5rev	ACT CTC CCT GGG CTC TCC ACC GCC CAA GC	79	Ziel DNS für Gelshift
Sp1fw	ATT CGA TCG GGG CGG GGC GAG C	71	Ziel DNS für Gelshift
Sp1rev	GCT CGC CCC GCC CCG ATC GAA T	71	Ziel DNS für Gelshift
CREBfw	AGA GAT TGC CTG ACG TCA GAG AGC TAG	70	Ziel DNS für Gelshift
CREBrev	CTA GCT CTC TGA CGT CAG GCA ATC TCT	70	Ziel DNS für Gelshift
NSF-fw	<u>GAA TTC</u> GTC GAA TGG CGG GCC GGA CTA	60	NSF-Expressionsvektor
NSF-rev	<u>CTC GAG</u> TCA ATC AAA GTC CAG GGG ACT	61	NSF-Expressionsvektor

^a) Unterstrichene Buchstaben in den Nukleotidfolgen bezeichnen nichtgenspezifische Sequenzabschnitte, die zur Erzeugung von Restriktionsschnittstellen angefügt wurden

^b) Schmelztemperaturen für die genspezifischen Sequenzabschnitte wurden ermittelt mittels <http://www.promega.com/biomath/calc11.html>

2.1.3.5. Plasmide

Bezeichnung	Eigenschaften	Herkunft
pEYFP-N1	MCS 5'-stromaufwärts vor YFP-Sequenz	Clontech (Saint-Germain-en-Laye, France)
pCR2.1	Klonierungs bzw. Sequenzierungsvektor	Invitrogen (Carlsbad, USA)
pBluescript II KS-	Klonierungs bzw. Sequenzierungsvektor	Stratagene (Agilent, Santa Clara, USA)
pNEO	Rekombinationsvektor für BAC-Modifikation	(Liu et al., 2003)
pSPT18/19	Klonierungsvektor zur Transkription der DIG- <i>in situ</i> Sonden (sense/antisense)	Roche (Mannheim)
pSPT18PRG-1	Transkriptionsvektor DIG-PRG-1-Sonde sense	(Trimbuch et al., 2009)
pSPT19PRG-1	Transkriptionsvektor DIG-PRG-1-Sonde antisense	(Trimbuch et al., 2009)
pGL3basic	Dual-Luciferase-Firefly Reporterplasmid Deletionskonstrukt Klonierungsvektor	Promega (Madison, USA)
pHRLTk	Dual-Luciferase-Renilla Reporterplasmid	Promega (Madison, USA)
pGL3/h-169/+145rev	Humanes PRG-1 Promotor Deletionskonstrukt in pGL3	Luca Coiro, Charite, Berlin
pGL3/h-169/+145	Humanes PRG-1 Promotor Deletionskonstrukt in pGL3	Luca Coiro, Charite, Berlin
pGL3/h-300/+145	Humanes PRG-1 Promotor Deletionskonstrukt in pGL3	Luca Coiro, Charite, Berlin
pGL3/h-1803/-199	Humanes PRG-1 Promotor Deletionskonstrukt in pGL3	Luca Coiro, Charite, Berlin
pGL3/h-1803/+1	Humanes PRG-1 Promotor Deletionskonstrukt in pGL3	Luca Coiro, Charite, Berlin
pGL3/h-3189/-2073	Humanes PRG-1 Promotor Deletionskonstrukt in pGL3	Luca Coiro, Charite, Berlin

Bezeichnung	Eigenschaften	Herkunft
pGL3/h -3189/-48	Humanes PRG-1 Promotor Deletionskonstrukt in pGL3	Luca Coiro, Charite, Berlin
pGL3/h-1803/+145	Humanes PRG-1 Promotor Deletionskonstrukt in pGL3	Luca Coiro, Charite, Berlin
pEGFP-N1	MCS 5'-stromaufwärts vor GFP-Sequenz	Clontech (Saint-Germain-en-Laye, France)
pCMV-HA	Expressionsvektor, N-term HA-Tag	Clontech (Saint-Germain-en-Laye, France)
pGBT9	Two-Hybrid System, Klonierungsvektor	Clontech (Saint-Germain-en-Laye, France)
p3xFLAG-CMV-13	Expressionsvektor, N-term FLAG-Tag	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

2.1.3.6. BAC

Bezeichnung	Eigenschaften	Herkunft
RPCI23-340J18	Sequenz Anfang/Ende AQ 976872, AQ976874	RZPD, Berlin

2.1.3.7. Nukleinsäuren

Lambda DNS

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.4. Proteinbiochemisches Material

2.1.4.1. Proteinmarker

Marker	Herkunft
Color Plus Prestained Protein Ladder, Broad Range (10-230 kDa)	New England Biolabs (Ipswich, USA)
Prestained Protein Ladder, Broad Range (7-175 kDa)	New England Biolabs (Ipswich, USA)
PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10-170 kDa)	MBI Fermentas, St. Leon Rot

2.1.4.2. Antikörper

Primärantikörper:

Bezeichnung	Organismus	Art	Herkunft	Verdünnung
DIG-Fab-AP	Schaf	polyklonal	Roche (Mannheim)	1: 2000
Anti-β-Galaktosidase	Huhn	polyklonal	Abcam (Cambridge, USA)	1: 2000
Anti-Calbindin	Maus	monoklonal	Swant (Bellinzona, Schweiz)	1: 2500
Anti-Calretinin	Kaninchen	polyklonal	Swant (Bellinzona, Schweiz)	1: 1000
Anti-Parvalbumin	Kaninchen	polyklonal	Swant (Bellinzona, Schweiz)	1: 2500
Anti-NeuN	Maus	monoklonal	Chemicon (Millipore, Schwalbach)	1: 1000
Anti-GFP	Kaninchen	polyklonal	Abcam (Cambridge, USA)	1: 1000

Bezeichnung	Organismus	Art	Herkunft	Verdünnung
Anti-Nex-1 (Math2/Neuro D6)	Kaninchen	polyklonal	Millipore (Schwalbach)	1: 1000
Anti-β-Actin	Maus	monoklonal	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	1:5000
Anti-FLAG (M2)	Maus	monoklonal	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	1: 2000
Anti-HA (HA7)	Maus	monoklonal	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	1: 2000
Anti-NSF	Maus	monoklonal	Abcam (Cambridge, USA)	1: 1000

Sekundärantikörper:

Anti-Kaninchen Alexa 488	Ziege	Molecular Probes (Invitrogen, Carlsbad, USA)	1: 2000
Anti-Huhn-Alexa 568	Ziege	Molecular Probes (Invitrogen, Carlsbad, USA)	1: 2000
Anti-Maus Alexa 568	Ziege	Molecular Probes (Invitrogen, Carlsbad, USA)	1: 2000
Anti-Kaninchen Alexa 568	Ziege	Molecular Probes (Invitrogen, Carlsbad, USA)	1: 2000
Anti-Maus-HRP	Schaf	Amersham Biosciences (GE Healthcare, Freiburg)	1:5000
Anti-Kaninchen-HRP	Esel	Amersham Biosciences (GE Healthcare, Freiburg)	1:5000
Anti-Maus-AP	Ziege	Dianova (Hamburg)	1:4000

Agarose-gekoppelte Antikörper

Monoclonal Anti-HA–Agarose antibody produced in mouse	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
EZview™ Red ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
EZview™ Red ProteinA Affinity Gel	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

2.1.5. Biologisches Material

2.1.5.1. Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Hersteller
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁺ φ80dlacZΔMΔ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ ⁻ , <i>tho-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Invitrogen (Carlsbad, USA)
<i>E. coli</i> XL10Gold	<i>endA1</i> , <i>glnV44</i> , <i>recA1</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac Hte</i> Δ(<i>mcrA</i>)183Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>tet</i> ^R , F[<i>proABlacI</i> ^q Z ΔM15Tn10(<i>Tet</i> ^R , <i>Amv</i> , <i>Cm</i> ^R)]	Stratagene (Agilent, Santa Clara, USA)
<i>E. coli</i> Top10	F ⁺ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15, <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>deoR</i> , <i>araD139</i> Δ(<i>araleu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (<i>Str</i> ^R), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Stratagene (Agilent, Santa Clara, USA)
<i>E. coli</i> EL250	DY380[<i>(cro-bioA)</i> <> <i>araC-PBADcre</i>]	(Liu et al., 2003)

2.1.5.2. Verwendete Zelllinien

HEK 293: (human embrionic kidney) humane embryonale Nierenzelllinie (Graham et al., 1977).

2.1.5.3. Verwendete Nager

Gattung	Art	Herkunft
Mus musculus	C57/black6	FEM, Berlin
Mus musculus	Prg1 KO Maus	(Trimbuch et al., 2009)
Mus musculus	Nex1 KO-Maus (Nex-Cre)	(Schwab et al., 2000)
Rattus norvegicus	Wistar	FEM, Berlin

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1. Anzucht von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in DYT-Medium unter Standardbedingungen (Sambrook *et al.*, 1989). Kulturen für die Plasmid-DNS-Minipräparationen wurden in 5 ml DYT-Medium bei 37°C, unter Schütteln (220 rpm), ca. 15 h mit den jeweils plasmidspezifischen, selektiven Antibiotika angezogen.

DYT-Medium	1,6 % (w/v) Pepton-Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 1 % (w/v) NaCl in <i>A. bidest.</i>
DYT-Agar	LB-Medium mit 1,5 % (w/v) Agar
Ampicillin	Konzentration: 100 µg/ml
Kanamycin	Konzentration: 25 µg/ml
Chloramphenicol	Konzentration: 12,5 µg/ml

2.2.1.2. Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

200 ml DYT-Medium wurden unter Zusatz von 0,02 M Glukose und 0,02 M Mg²⁺ mit 2 ml einer Übernachtskultur des jeweils verwendeten *E. coli*-Stammes angeimpft. Die resistenzspezifischen Antibiotika wurden in den vorgeschriebenen Konzentrationen zugegeben, danach wurde die Kultur bei 220 rpm und 37°C inkubiert, bis eine optischen Dichte (OD₆₀₀) der Kultur von 0,5 erreicht wurde. Die Kultur wurde in sterile Zentrifugationsbehälter überführt und 15 min auf Eis inkubiert, dann 10 min bei 4°C mit 3000 rpm (Heraeus, Megafuge 1,0 R, Rotor BS4402) zentrifugiert und die Sedimente anschließend in 100 ml, 50 mM CaCl₂-Lösung aufgenommen. Diese Ansätze wurden dann 30 min im Eisbad inkubiert und 10 min bei 4°C mit 3000 rpm zentrifugiert. Die Sedimente wurden schließlich in 13,3 ml FB-Puffer aufgenommen, 30 min auf Eis inkubiert und Aliquote von 0,4 ml in flüssigem Stickstoff schockgefroren [Protokoll modifiziert nach (Cohen et al., 1972; Hanahan, 1983)].

2M Mg ²⁺	1M MgSO ₄ und 1M MgCl ₂ getrennt herstellen und sterilautoklavieren
FB-Puffer	1M Kaliumacetat; 87 % (v/v) Glycerin; 45 mM CaCl ₂ ; 0,1M KCl

2.2.1.3. Herstellung elektro-kompetenter *E. coli*-Zellen

100 ml DYT-Medium wurden mit 100 µl einer Übernachtskultur des jeweiligen *E. coli*-Stammes angeimpft. Die resistenzspezifischen Antibiotika wurden in den vorgeschriebenen Konzentrationen zugeben. Danach wurde die Kultur bei 220 rpm und 37°C bzw. 32°C (hitzeinduzierbare Stämme) inkubiert, bis eine OD₆₀₀ der Kultur von 0,6 erreicht wurde. Im Anschluß wurde die Kultur im Eisbad auf 4°C abgekühlt, in sterile Zentrifugationsbehälter überführt und 1 min bei 4°C mit 11.000 rpm (Eppendorf Zentrifuge 5804 R, RotorF-34-6-38) zentrifugiert. Die Sedimente wurden mit vorgekühlter, 10 % Glycerinlösung resuspendiert und zweifach in einem Volumen von 2 ml, je für 1 min bei 4°C mit 11.000 rpm gewaschen (Eppendorf Zentrifuge 5415 R, RotorF-45-24-11). Das resultierende Sediment wurde in einem geeigneten Volumen 10 % Glycerinlösung resuspendiert, jeweils 40 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.2.1.4. Anlegen von Glycerinkulturen

Um Dauerkulturen anzulegen wurden 100 µl aus einer Bakterienübernachtskultur bei 37°C unter Schütteln bei 220 rpm, bis zu einer OD₆₀₀ 0,5–1,0 angezogen. 600 µl dieser Bakteriensuspension wurden dann mit 600µl 100%igem Glycerin im 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis versetzt. Diese Kulturen konnten über längere Zeit bei -80°C gelagert werden.

2.2.1.5. Hitze induzierte Transformation von *E. coli*

Chemisch kompetente *E. coli* Zellen wurden mit 2 µl Ligationsansatz 30 min auf Eis inkubiert, anschließend 30 sec einem 42°C Hitzeschock ausgesetzt. Danach 5 min auf Eis inkubiert mit 0,5 ml SOC Medium versetzt und 1 h bei 37°C mit 220 rpm geschüttelt. Die anschließende Selektion der Transformanten erfolgte auf DYT-Agarplatten, welche mit dem entsprechenden Antibiotikum beschichtet waren, sowie mittels des Mechanismus der Blau-Weiß-Selektion mit 40 µl X-Gal (20 mg/ml in DMF) und 40 µl IPTG (0,1 M in *A. bidest.*) auf den Selektionsplatten.

SOC-Medium	2 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 20 mM Glukose; 8,6 mM NaCl; 25 mM KCL; 10 mM MgCl ₂ ; pH 7,0 mit NaOH.
------------	---

2.2.1.6. Elektrotransformation von *E. coli*

Elektrokompetente *E. coli* Zellen wurden mit DNS-Lösungen 10 min auf Eis inkubiert und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (BioRad, Nr. 1652089) überführt. Mittels eines Elektroporators (BioRad, GenePulser[®] II) wurde die DNS bei 1,8 kV, 800 Ohm und 25µF in den jeweils verwendeten *E. coli*-Stamm elektroporiert. Die Zellsuspension wurde sofort danach mit 1 ml SOC-Medium versetzt, bei 37°C bzw. 32°C (hitzeinduzierbare Stämme) inkubiert und wie vorab beschrieben ausplattiert.

2.2.1.7. Mikrodialyse von DNS für Elektrotransformation

DNS-Lösungen wurden vor der Elektrotransformation mittels Mikrodialyse entsalzt. Die DNS wurde auf eine Dialysemembran (Millipore, Nr. NY8H02500) pipettiert, die auf der Oberfläche eines mit ca. 20 ml *A. bidest* gefüllten Gefäßes auflag. Nach 30 min wurde die DNS abpipettiert und für die Elektrotransformation verwendet.

2.2.1.8. Homologe Rekombination von DNS

Für die Insertion der Rekombinationskassette in das BAC wurde der Mechanismus der homologen Rekombination genutzt. Die Rekombination wurde in *E. coli* EL250 durchgeführt, in diesem Stamm unterdrückt ein temperatursensitiver Repressor die im Genom vorhandenen *Red Gene*: *exo*, *bet*, und *gam* aus dem Bakteriophagen Lambda. Durch Induktion dieser Gene wird die homologe Rekombination von zugegebenen doppelsträngigen DNS-Fragmenten in die homologen Bereiche von Plasmid-, BAC- oder chromosomaler DNS vermittelt.

Vorab wurde das zu modifizierende BAC mittels Elektrotransformation in den temperatursensitiven *E. coli* Stamm EL250 transformiert. Die EL250/BAC Transformanten wurden ü. N. bei 32°C, unter schütteln bei 225 rpm, in DYT mit den jeweils benötigten Selektionsantibiotika angezogen. Mit 1 ml der Übernachtskultur wurden am Folgetag 100 ml DYT bei 32°C, unter Schütteln (225 rpm), mit den jeweils benötigten Selektionsantibiotika beimpft bis eine optische Dichte (OD₆₀₀) der Kultur von 0,8 erreicht wurde. Dann wurde die Kultur bei 42°C, unter Schütteln (225 rpm) inkubiert (Induktion der Red Gene) und im Anschluß sofort im Eisbad heruntergekühlt. Die Kultur wurde bei 0°C mit 1000 x g, 10 min sedimentiert und das Sediment wurde in 10 % Glycerol aufgenommen, das Sediment wurde 3-fach in 10 % Glycerol gewaschen (bei 0°C mit 2000 x g, 5 min) und das resultierende Sediment wurde in einer geeigneten Menge 10 % Glycerol aufgenommen. Die so erzeugten kompetenten Zellen wurden für die folgende Elektrotransformation eingesetzt. Jeweils 10 ng der aufgereinigten Rekombinationskassette wurde via Microdialyse entsalzt und für die Elektrotransformation verwendet. Im Anschluß wurden die Transformationsansätze 2 h, in

DYT bei 32°C, unter schütteln (225 rpm) inkubiert. Danach wurden die Kulturen auf DYT-Selektionsplatten für die transferierte Resistenz (Kanamycin) ausplattiert und bei 32°C inkubiert. Rekombinierte BAC-Klone (Kointegrate) wurden selektiert und mittels Restriktionsanalyse überprüft.

2.2.1.9. Sequenzspezifische Rekombination mittels FLP-Rekombinasen

Um die kotransferierte Resistenz aus dem mittels homologer Rekombination veränderten BAC-Klon (Kointegrat) wieder zu entfernen, wurde ein von FLP-Rekombinasen medierter Rekombinationsmechanismus genutzt. Die kotransferierte Resistenz der Rekombinationskassette befand sich inmitten zweier Zielsequenzen (FLP recognition target, FRT) der FLP-Rekombinase. Die Expression der FLP-Rekombinase wurde über den Arabinose induzierbaren Promoter pBAD im *E. coli* Stamm EL250 gesteuert.

Korrekt rekombinierte Kointegrate des BAC aus der vorab durchgeführten homologen Rekombination wurden ü. N. bei 32°C, unter Schütteln bei 225 rpm, in DYT mit den jeweils benötigten Selektionsantibiotika für das BAC, sowie für die transferierte Kanamycinresistenz angezogen. Mit 1 ml der Übernachtskultur wurden am Folgetag 100 ml DYT bei 32°C, unter Schütteln (225 rpm), mit den jeweils benötigten Selektionsantibiotika beimpft bis eine optische Dichte (OD₆₀₀) der Kultur von 0,5 erreicht wurde. Dann wurde die Kultur unter Zugabe von 1 ml 10 % Arabinose (0,1 % Endkonzentration), bei 32°C, unter Schütteln (225 rpm) 1h inkubiert (Induktion pBAD) und im Anschluß sofort im Eisbad heruntergekühlt. Die Kultur wurde bei 0°C mit 1000 x g, 10 min sedimentiert und das Sediment wurde in 10 % Glycerol aufgenommen. Das Sediment wurde dreifach in 10 % Glycerol gewaschen (bei 0°C mit 2000 x g, 5 min) und das resultierende Sediment wurde in einer geeigneten Menge 10 % Glycerol aufgenommen. Die rekombinierten Zellen wurden auf DYT-Selektionsplatten mit den jeweils benötigten Selektionsantibiotika für das BAC angezogen. Rekombinierte Klone, welche die im ersten Rekombinationsvorgang transferierte Kanamycinresistenz bei der folgenden Rekombination verloren haben, werden nun über ihre Kanamycinsensitivität selektiert und mittels Restriktionsanalyse überprüft. Modifizierte BAC-Klone die für die Transgenerierung verwendet wurden, wurden anschließend noch zusätzlich via Southern Blot Analyse überprüft.

2.2.1.10. Isolation von Gesamt-RNS

Zur Isolation von Gesamt-RNS (Chomczynski and Sacchi, 1987) wurden jeweils 100 mg verwendetes Gewebe in 750 µl Trizol™ (Invitrogen) in einem Mörser unter Zugabe von flüssigem Stickstoff homogenisiert, in ein geeignetes Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei RT inkubiert. Pro 750 µl Trizol™ wurden 200 µl Chloroform zugegeben, 30 sec geschüttelt und für 10 min bei RT inkubiert. Dann wurde 15 min bei 8000 x g zentrifugiert und die obere wässrige Phase abgenommen. Diese wurde im Anschluß zweifach mit je 500 µl Chloroform extrahiert. Pro ursprünglich eingesetzten 750 µl Trizol™ wurden 500 µl Isopropanol zugegeben, sorgfältig gemischt und für 15 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 70 % EtOH gewaschen, luftgetrocknet und in RNase- freiem *A.bidest* gelöst.

2.2.1.11. Isolation von mRNS

Verwendete mRNS wurde aus Gesamt-RNS mit Hilfe des µMacs™ mRNA-Isolations-Kit (Miltenyi Biotec) isoliert. Anwendung gemäß der Angaben des Herstellers.

2.2.1.12. Synthese von cDNS

Zur Synthese von cDNS wurde Gesamt-RNS oder mRNS mittels des High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), gemäß den Anweisungen des Herstellers umgeschrieben. Abhängig von der weiteren Anwendung wurden für die Transkription entweder Random Primer oder Poly dT-Primer verwendet.

2.2.1.13. Isolation von Plasmid-DNS aus *E. coli*

Plasmid-DNS im größeren Maßstab wurde mittels Säulen gemäß des Protokolls der Herstellerfirma (Machery-Nagel) isoliert. Geringere DNS-Mengen wurden durch die Minipräparationsmethode auf der Basis der alkalischen Zelllyse isoliert (modifiziert nach Birnboim, 1979). Das Bakteriensediment aus 4 ml Übernachtskultur wurde in 0,3 ml Lösung I resuspendiert, danach wurden die Zellen durch Zugabe von 0,3 ml Lösung II lysiert, vorsichtig gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Die Neutralisation erfolgte durch Zugabe von 0,3 ml Lösung III und nachfolgender Inkubation auf Eis für 15 min. Es folgte ein 15-minütiger Zentrifugationsschritt von 16000 x g bei 4°C. Die Plasmid-DNS im Überstand wird mit 0,7 Volumen Isopropanol bei RT gefällt, 30 min zentrifugiert mit 16000 x g bei 4°C und mit 70 % (v/v) EtOH gewaschen, getrocknet und in 30 µl *A.bidest* gelöst.

Lösung I	50 mM Tris/HCl; pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A
Lösung II	0, 2 M NaOH; 1 % (w/v) SDS
Lösung III	3 M Natriumacetat; pH 5,0

2.2.1.14. Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur weiteren Aufreinigung von Plasmid-DNS, die mittels alkalischer Lyse isoliert wurde, wurde die DNS-Lösung mit dem gleichen Volumen Phenol versetzt und 30 sec gemischt und anschließend 10 min mit 5000 x g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgezogen und mit dem gleichen Volumen, einer zu gleichen Teilen aus Phenol und Chloroform bestehenden Lösung, für 30 sec gemischt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (10 min; 5000 x g), anschließend wurde die obere wässrige Phase abgezogen und mit dem gleichen Volumen Chloroform für 30 sec gemischt. Nach erneuter Zentrifugation (10 min; 5000 x g) wurde die obere Phase abgenommen und die enthaltene DNS mittels Ethanol-Natriumacetat-Fällung präzipitiert.

2.2.1.15. Ethanol- Natriumacetat-Fällung

Zur Fällung von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen wurden 0,1 Volumen einer 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,3) und 2,5 Volumen 100 % EtOH zugesetzt. Die Lösung wurde 30 sec gevortext und für 30 min mit 16.000 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 70 % EtOH gewaschen, luftgetrocknet und in einem geeigneten Volumen *A.bidest* aufgenommen.

2.2.1.16. Kultivierung und Isolation von BAC-DNS

Die Isolation von BAC-DNS für präperative Anwendungen, insbesondere für die Oozyteninjektion erfolgte über eine modifizierte Methode der alkalischen Zelllyse. Beimpft wurde eine 2,5 ml DYT-Kultur (12,5 µg/ml Chloramphenicol) mit einer Einzelkolonie, Kultivierung ü. N. bei 32°C, unter Schütteln (220 rpm). Je 2 x 500 ml DYT (12,5 µg/ml Chloramphenicol) wurden mit je 1 ml Übernachtskultur beimpft, Kultivierung ü. N. 32°C unter Schütteln (220 rpm). Zellernte mittels Zentrifugation in 4 x 250 ml Nalgene-Flaschen (Rotor Sorval H-6000A), 3800 rpm, 10 min, bei 4°C. Die Sedimente der Nalgene-Flaschen wurden jeweils in 25 ml eiskaltem NaCl gewaschen und im Anschluß zentrifugiert (Rotor Sorval H-6000A), 3.800 rpm, 10 min, bei 4°C. Resuspendieren des Sedimentes aus 250 ml Kultur in 10 ml Lösung I, Inkubation bei RT für 5 min. Danach Zugabe von 20 ml Lösung II je 250 ml Kultur gefolgt von Mischen durch langsames Kreisen (nicht invertieren) und 5 min Inkubation, bei RT. Im Anschluß Zugabe von 15 ml eiskalter Lösung III, je 250 ml Kultur. Inkubation 20 bis 40 min auf Eis. Zentrifugation mit 8.000 rpm, 15 min bei 4°C (Rotor, Beckmann JA12). Zu jeweils 35 ml des Überstandes werden 21 ml Isopropanol gegeben.

Zentrifugation mit 4.300 rpm, 15 min bei RT (Rotor, Heraeus 5315). Dekantieren des Überstands und lösen der Sedimente in je 9 ml 10 mM Tris-HCL; 50mM EDTA; pH 8,0. Zugabe von 1/100 Volumen RNaseA (Endkonzentration 100µg/ ml), Inkubation 30 min bei 37°C. Zugabe von 4,5 ml 7.5 M K-Acetat, sanft mischen, 15 bis 30 min bei -80°C inkubieren. Zentrifugation mit 3.800 rpm, 10 min bei RT (Rotor, Heraeus 5315). Überführen der Überstände in je 4 x 50 ml Falcon-Zentrifugenröhrchen, Zugabe von 2,5 Volumen 100 % EtOH unter vorsichtigem Mischen. Sedimentieren der DNS bei 3.800 rpm, 30 min bei RT (Rotor, Heraeus 5315). Dann Resuspendieren des Präzipitats in 2,5 ml, 50 mM Tris-HCL; 50mM EDTA; pH 8,0. Im Anschluß, Extration der wässrigen Phase mit je 1 Volumen Phenol, Zugabe von 1 Volumen Chloroform, sanftes Mischen und Separation der Phasen durch Zentrifugation 3.000 rpm, 5 min bei RT (Rotor, Heraeus 5315). Abnehmen der wässrigen Phase, Zugabe von 1 Volumen 3 M Natriumacetat; pH 7,0; Zugabe von 2,5 Volumen 100 % EtOH, mischen durch vorsichtiges Invertieren. Inkubation, 20 min bei -20°C. Sedimentation der DNS bei 3.800 rpm , 30 min bei RT (Rotor, Heraeus 5315). Resuspendieren des Präzipitats in 2,5 ml; 50 mM Tris-HCL; 25 mM EDTA; pH 8,0.

Lösung I	10 mM EDTA; pH 8,0
Lösung II	0,2 M NaOH; 1 % (w/v) SDS
Lösung III	1,88 M K-Acetat; 12,5 % (v/v) Eisessig

2.2.1.17. Isolation superhelikaler-,covalent-closed-circular“ - (ccc)- BAC-DNS mittels Cäsiumchloridgradienten

Nach Zugabe von 3,25 g CsCl und 0,5 ml 1 % (w/v) Ethidiumbromidlösung, zu der in 2,5 ml (50 mM Tris-HCL; 25 mM EDTA; pH 8,0) resuspendierten BAC-DNS, Austarieren und Verschweißen der verwendeten Ultrazentrifugenröhrchen (zur Vermeidung von DNS-Strangbrüchen lichtgeschützt arbeiten). Zentrifugation 20 h, 55.000 rpm (Rotor, Beckmann TLA 100) bei RT. Das Ultrazentrifugenröhrchen im Anschluß mit einer 25-30 g Kanüle im oberen Bereich, zwecks Druckausgleich anstechen. Die untere Bande, welche die superhelikale BAC-DNS repräsentiert, mit einer 18 g Kanüle im kleinstmöglichen Volumen abnehmen. Die so aufgereinigte superhelikale BAC-DNS erneut über einen CsCl-Gradienten aufreinigen, um Reste von DNS-Molekülen mit Strangbrüchen zu entfernen.

2.2.1.18. Vorbereitung der superhelikalen BAC-DNS für die Oozyteninjektion

Das in der DNS-Lösung vorhandene Ethidiumbromid wird durch fünffache Extraktion mit TE; pH 7,0; 100 mM NaCl; gesättigtem Butanol (1:1; v/v) entfernt. Dann wurde die superhelikale BAC-DNS mittels Restriktion mit *PI-SceI* linearisiert. Die Linearisierung wurde durch Gelelektrophorese eines Aliquots überprüft und der restliche Ansatz wurde auf eine Konzentration von 10 ng/μl eingestellt. Die Konzentration des Verdauers wurde durch den visuellen Vergleich mit definierten Mengen Lambda DNS ermittelt.

2.2.1.19. Isolation von genomischer DNS

Genomische DNS für Genotypisierungen wurde mittels des Invisorb[®] Spin Tissue Mini Kits (Invitek) gemäß den Angaben des Herstellers isoliert. Für die Isolation größerer DNS Mengen, die für Southern-Blot Analysen benötigt wurden, wurden ca. 50-100 mg Gewebe in einem Mörser unter Zugabe von flüssigem Stickstoff homogenisiert. Nach Zugabe von 2 ml Extraktionspuffer [0,5% SDS-Lösung (w/v); 0,1 M NaCl, 20 mM Tris HCL, pH 8,0; 0,25 mM EDTA] und 100 μl einer 10 mg/ml Proteinase K-Lösung wurde das Homogenat ü. N. bei 55°C inkubiert. Durch Zugabe einer 10 mg/ml RNaseA-Lösung und nachfolgender Inkubation 1 h bei 37°C wurden Restmengen an RNA verdaut. Die genomische DNS wurde im Anschluß mittels Phenol-Chloroform-Extraktion von Proteinverunreinigungen befreit, mittels Ethanol-Natriumacetat-Fällung präzipitiert und in 100 μl *A. bidest* gelöst.

2.2.1.20. Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Die Messung der Konzentration von Nukleinsäuren erfolgte im UV-Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm. Zur Bestimmung der Konzentration der Nukleinsäuren wurde folgender Umrechnungsfaktor berücksichtigt: 1 OD entspricht ca.: 50 μg/ml doppelsträngiger DNS bzw. 40 μg/ml einzelsträngiger RNS. Um den Reinheitsgrad der Nukleinsäurelösung zu bestimmen, wurde das Verhältnis der Absorptionen bei 260/280 nm gemessen. Lag der ermittelte Quotient unter 1,8 konnte keine verlässliche Quantifizierung der Nukleinsäuren erfolgen. Des Weiteren wurden DNS-Konzentrationen in mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegelen durch den visuellen Vergleich mit definierten Mengenstandards bestimmt.

2.2.1.21. „RNA Ligase mediated rapid amplification of cDNA ends“ RLM-RACE

Die RLM RACE Analyse wurde mit Hilfe des GeneRacer®Kits (Invitrogen) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Jeweils 250 ng mRNS von adulten Mäusen (C57/bl6) bzw. Ratten (Wistar) wurde mit „calf intestinal phosphatase“ (CIP, Invitrogen) desphosphoryliert, um verkürzte mRNS Sequenzen ohne 7-Methylguanosin-Kappe von der nachfolgenden Ligation mit dem GeneRacer RNS-Oligo auszuschließen. Danach wurde die mRNS mit 2 Volumen 100 % EtOH gefällt und in RNase-freiem Wasser resuspendiert. Die dephosphorylierte mRNS wurde danach mit „tobacco acid pyrophosphatase“ behandelt, um die 7-Methylguanosin-Kappe zu entfernen, dadurch entstand ein 5'-Phosphatende, welches für die nachfolgende Ligation mit dem GeneRacer RNS-Oligo benötigt wurde. Durch T4-RNS-Ligase wurde das GeneRacer RNS-Oligo an das 5'-Ende der RNS ligiert. Die mRNS wurde danach mit SuperscriptIII™ RT (Invitrogen) in cDNS umgeschrieben; die Sequenz des GeneRacer RNS-Oligo lieferte einen definierten Bindungsort für den 5'-GeneRacer Primer. Nachfolgende Polymerasekettenreaktionen mit dem 5'-GeneRacer Primer und genspezifischen 3'-Primern gegen die Rattensequenz (RatRace1, RatRace2, RatRace3) und Maussequenz (MausRace1, MausRace2, MausRace3) lieferten Amplifikate, die in einen Sequenzierungsvektor (pCR2.1) kloniert und in *E.coli* XL1Gold transformiert wurden. Die Plasmid-DNS der Transformanten wurde isoliert und im Anschluß sequenziert.

2.2.1.22. Spaltung von DNS mit Restriktionsendonukleasen

Der Verdau von DNS mit Restriktionsendonukleasen erfolgte in 20 µl Reaktionsansätzen mit den vom jeweiligen Herstellern empfohlenen Reaktionspuffern. Die Menge von 1 µg Plasmid-DNS wurde 1 h oder ü. N. mit 1 U der entsprechenden Restriktionsendonuklease bei der jeweils vorgeschriebenen Temperatur inkubiert .

2.2.1.23. Dephosphorylierung linearisierter Vektoren

Um die Religation geöffneter Vektoren zu verhindern, wurden linearisierte Vektoren mit alkalischer Phosphatase gemäß den Angaben des Herstellers dephosphoryliert. Zu 1 µg Plasmid-DNS wurde 1 U „*Shrimp alkaline Phosphatase*“ und 2 µl 10 x Reaktionspuffer gegeben und die Reaktionsansätze von 20 µl Gesamtvolumen 1h bei 37°C inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden im Anschluß bei 68°C hitzeinaktiviert und über eine Gelelektion aufgereinigt.

2.2.1.24. Ligation von DNS-Fragmenten

Zur Ligation in den Topoisomerase-gekoppelten Vektor pCR2.1, der mit 3'-Thyminüberhängen ausgestattet ist, wurden 4 µl PCR- Amplifikat in der Konzentration von 0,5 µg/µl eingesetzt und unter Zugabe von 2 µl Salz-Reaktionspuffer des Herstellers in 10µl Ansätzen für 10 min inkubiert. Für die Ligation in andere Vektoren wurde 1 U *T4*-DNS-Ligase eingesetzt, die mit Vektor (ca. 1µg) und Fragment im Verhältnis 1:3, in 20 µl Reaktionsansätzen unter Zugabe des vom Hersteller empfohlenen Puffers, bei RT für 2 h oder ü. N. inkubiert wurden.

2.2.1.25. Agarosegelelektrophorese von DNS

Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurden 0,4 bis 2,0 %ige Gele eingesetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 5 bis 10 V/cm in 1 x TBE-Laufpuffer. Die Proben wurden vor dem Auftrag mit 1/5 Volumen Ladepuffer versetzt. Als Molekulargewichtsmarker und zur Mengenabschätzung wurde Hyperladder I (Bioline) eingesetzt.

TBE-Laufpuffer	90 mM Tris; 90 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA; pH 8,3
Gelzusammensetzung	X % (w/v) Agarose in Laufpuffer (s.o.); 0,0001 % (w/v) Ethidiumbromid
Ladepuffer	50 % (v/v) Glycerol, 1 mM EDTA pH 8,0; 0,5 % (w/v) Bromphenolblau 0,05 % (w/v) Xylencyanol

2.2.1.26. Elution von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Elution von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des "NukleoSpin[®] Extract II Kit" (Macherey-Nagel) gemäß des Herstellerprotokolls.

2.2.1.27. Transfer von DNS auf Nylonmembranen

Die Agarosegele wurden mittels Kapillartransfers unter alkalischen Bedingungen über 48 h auf Membranen (Hybond N, Amersham) geblottet (Sambrook et al., 1989). Die DNS wurde durch UV-Bestrahlung (150 mJ) auf der Membran fixiert und zweimal je 5 min in 2 x SSC gewaschen.

Transferlösung	0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl
10 x SSC	0,15 M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat; 1,5 M NaCl

2.2.1.28. Radioaktive Markierung von DNS-Sonden

Zur Herstellung doppelsträngiger, radioaktiver Sonden für Southern-Blots wurden 25 ng eines DNS Fragments mittels des Prime a Gene[®] Labeling Kits (Promega) mit 50 μCi $\alpha\text{-P}^{32}\text{-dCTP}$ gemäß den Angaben des Herstellers markiert. Nach vollzogener Markierung wurde durch Messung der Strahlung vor und nach der Abtrennung freier Nukleotide per Säulenreinigung (QIAquick PCR Purifikation Kit, Qiagen), die Einbaurate der Radionukleotide in die Sonden bestimmt.

2.2.1.29. Hybridisierungen membrangebundener DNS mit DNS-Fragmenten

Die DNS-beschichteten Nylonmembranen wurden bei 65°C für 3 h in Prähybridisierungspuffer (Church and Gilbert, 1984) inkubiert. Nach Zugabe der denaturierten, markierten Sonde wurde 12 bis 16 h bei gleicher Temperatur hybridisiert. Die Membranen wurden im Anschluß bei 60°C je 15 min zuerst in Waschlösung 1, dann in Waschlösung 2 und schließlich in Waschlösung 3 bei RT gewaschen.

Prähybridisierungspuffer	0,25 M Na_2HPO_4 (pH 7,2); 7 % (w/v) SDS
Waschlösung 1	2 x SSC; 1 % (w/v) SDS
Waschlösung 2	1 x SSC; 0,5 % (w/v) SDS
Waschlösung 3	0,1 x SSC; 0,1 % (w/v) SDS

2.2.1.30. Autoradiographische Analyse von Southern Blots

Im Anschluß an die Hybridisierung mit nachfolgenden Waschschrritten wurden die radioaktiv markierten Membranen in Frischhaltefolie verpackt und in eine Entwicklungskassette mit einliegender Verstärkerfolie überführt. Nach Auflegen eines Röntgenfilms (Kodak, BioMax MR) wurden die Filme je nach Signalstärke 2 Tage bis 4 Wochen bei -80°C exponiert und schließlich entwickelt.

2.2.1.31. Digoxigenin-Markierung von RNS-Sonden für *in situ*-Hybridisierung

Durch die Bindung eines mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Anti-DIG FAB-Fragments wird die mit Digoxigenin (DIG) markierte, hybridisierte Sonde im Gewebe mittels einer Farbreaktion (alkalische Phosphatase, dephosphoryliert die BCIP/NBT-Färbelösung) nachgewiesen. Zur Transkription der DIG-markierten RNS-Sonden von Plasmidmatrizen wurde das DIG RNA Labelling Kit[™] (SP6/T7, Roche) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.1.32. PCR zur Erzeugung von DNS-Fragmenten für Klonierungen

Amplifikationen aus genomischer DNS und Plasmid-DNS erfolgten durch Zugabe von je 0,2 mM dNTPs, 10 pmol der jeweiligen Primer, sowie 100 ng genomischer DNS oder 1 bis 5 ng Plasmid-DNS als Matrize und 2U *Herculase*-Polymerase (Stratagene) unter Zugabe des vom Hersteller empfohlenen Puffers, in 50 µl Reaktionsansätzen. Das Amplifikationsprogramm umfaßte eine 5 minütige Aktivierung der Polymerase und Denaturierung der DNS bei 95°C. Es folgten 35 Zyklen mit je einem Denaturierungsschritt von 30 sec bei 95°C, einem Anlagerungsschritt von 30 sec mit der jeweils niedrigeren Schmelztemperatur der beteiligten Primer, sowie einem Verlängerungsschritt von 1 min/kb des zu amplifizierenden Fragments bei 72°C. Komplettiert wurde das Programm durch einen abschließenden Verlängerungsschritt von 10 min bei 72°C. Für Subklonierungen verwendete Amplifikate wurden im Anschluß durch Sequenzierungen überprüft.

2.2.1.33. PCR zur Genotypisierung der transgenen Tiere

Als Matrize diente hierbei je 1 µl genomische DNS-Lösung des betreffenden Tiers. Unter Zugabe von je 0,2 mM dNTPs, 10 pmol der jeweiligen Primer, 1U *GoTaq*-Polymerase (Promega) und des vom Hersteller empfohlenen Puffers, in 20 µl Reaktionsansätzen. Das Amplifikationsprogramm umfasste einen 5 min. Aktivierung der Polymerase, sowie Denaturierung der DNS bei 95°C. Es folgten 40 Zyklen mit je einem Denaturierungsschritt von 30 sec bei 95°C, einem Anlagerungsschritt von 30 sec mit der jeweils niedrigeren Schmelztemperatur der beteiligten Primer sowie einem Verlängerungsschritt von 1 min bei 72°C. Komplettiert wurde das Programm durch einen abschließenden Verlängerungsschritt von 10 min bei 72°C.

2.2.1.34. Nichtradioaktive DNS-Sequenzierung

Die Durchführung aller Sequenzierungen von Plasmid-DNS erfolgte durch den Sequenzierservice SMB Services in Molecular Biology (Berlin).

2.2.1.35. Gelshift-Assay

Zum Nachweis von DNS-Proteinkomplexen wurden „electrophoretic mobility shift assays“ (EMSA) durchgeführt. Zur Herstellung doppelsträngiger DNS-Sequenzen wurden komplementäre DNS Oligonukleotide, 5 min bei 95°C denaturiert und ü. N. im Wasserbad abgekühlt. Zur radioaktiven Markierung der doppelsträngigen Oligonukleotide wurden 60 ng des betreffenden Oligonukleotids mit 1 U Polynukleotidkinase und 40 µCi γ -ATP (P^{32}) bei

37°C, sowie dem betreffenden Reaktionspuffer in einem Volumen von 20 µl für eine Stunde inkubiert. Nicht eingebaute Radionukleotide wurden im Anschluß mittels Säulenreinigung abgetrennt und die Sonde in 20 µl Volumen eluiert. Bindungsreaktionen wurden bei Raumtemperatur in Bindungspuffer durchgeführt, unter Zugabe von je 20 µg Kernextrakt aus Neuronen, sowie 20 µg BSA und 2 µg Poly-dIdC pro Reaktionsansatz und einem 100 fachen Überschuß von nicht markierten doppelsträngigen Oligonukleotiden bei den Kompetitionsansätzen. Nach 20 min Inkubation wurde 1 µl der radioaktiv markierten Sonde zugegeben und für weitere 20 min inkubiert. Die Proben wurden mit Bromphenolbau und Glycerin gemischt und auf ein 5 % TBE-Acrylamidgel aufgetragen und bei 250 V elektrophoretisch aufgetrennt. Vor dem Probenauftrag wurden die Gele für 30 min bei 200 V laufen gelassen. Nach dem Gellauf wurden die Gele in einem Vakuumtrockner getrocknet, Röntgenfilme (Kodak, BioMax MR) aufgelegt und für 48 h mit Verstärkerfolien bei -80°C exponiert.

Bindungspuffer	10 mM Tris-HCl, pH 7.5; 50 mM KCl; 1 mM MgCl ₂ ; 1 mM EDTA; 5 mM DTT, 5 % Glycerol (v/v)
Laufpuffer	0,5 x TBE
5 % TBE-Acrylamidgel	100 ml: 5 ml 10 x TBE; 14 ml Roti-GelA(Roth); 5 ml Roti-GelB(Roth); 500 µl 10 % APS; 75 µl TEMED; 75 ml <i>A. bidest.</i>

2.2.2. Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1. Herstellung von Kernextrakten

Kernextrakte zur nachfolgenden Verwendung in Gelshift-Assays wurden aus kultivierten Neuronen aus Ratte gewonnen. Die Zellen wurden mit eiskaltem 1 x PBS gewaschen, geerntet und im Anschluß 10 min bei 1000 x g zentrifugiert. Dann wurden je 10⁶ Zellen in 100 µl Puffer AC resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Je 100 µl Puffer AC wurden 10µl Nonidet P-40 in ein neues Mikroreaktionsgefäß pipettiert und die Zellsuspension addiert. Danach wurde die Zellsuspension 10 sec gevortext und bei 13.000 x g, 0°C für 8 min zentrifugiert. Das Sediment wurde anschließend in das gleiche Volumen Puffer BC resuspendiert und für 30 min, bei 0°C unter Schütteln inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 13.000 x g, 0°C für 5 min. Dann wurde der Überstand aliquotiert und in Flüssigstickstoff eingefroren.

Puffer AC	10 mM HEPES, pH 7.9; MgCl ₂ 6,6 mM; KCl 10 mM; EDTA 500 µM; EGTA 100 µM; DTT 1 mM; Complete® (Proteaseinhibitor, Roche)
Puffer BC	10 mM HEPES, pH 7.9; MgCl ₂ 6,6 mM; EDTA 500 µM; DTT 1 mM; NaCl 4,2 M; 20 % Glycerin (v/v); Complete® (Proteaseinhibitor, Roche)

2.2.2.2. Herstellung von Gewebehomogenaten

Gesamtgewebehomogenate wurde unter Zugabe einer geeigneten Menge STM-Puffers unter Zusatz von 0,1 % - 1 % Triton X-100 mittels eines Homogenisators (Ultra-Turrax®, T25 basic) auf Eis homogenisiert. Zelltrümmer wurden durch 5 min Zentrifugation bei 2000 x g, 4°C sedimentiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine für das Volumen der Probe ausreichende Menge Complete Protease Inhibitor Cocktail™ (Roche) zugesetzt. Zur Herstellung von Membranpräparationen wurde die cytoplasmatische Fraktion durch einen 30 min. Zentrifugationsschritt, bei 16.000 x g, 4°C abgetrennt und die in Sediment befindlichen Membranproteine wurden in STM-Puffer solubilisiert.

STM-Puffer	0,25 M Sucrose, 50 mM Tris-Cl, pH 7.4, 5 mM MgSO ₄
------------	---

2.2.2.3. Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinkonzentrationen wurden mittels des Pierce® BCA Protein Assay Kits gemäß den Angaben des Herstellers (Thermo, Scientific) ermittelt. Die Konzentrationen wurden durch den Vergleich zu einer BSA-Eichreihe bestimmt. Die von der Proteinkonzentration abhängende Lichtabsorption der Proben wurde bei 562 nm im Spektrophotometer bestimmt.

2.2.2.4. Vorbereitung der Proteinproben für die SDS-Polyacrylamidelektrophorese

Zur Analyse der Proteinproben wurden die Homogenate mit 1/4 Volumen 4 x PAGE-Ladepuffer versetzt und anschließend 5 min bei 95° C denaturiert.

4 x PAGE-Puffer	0,32 M Tris/HCL pH 6,8; 0,1 M EDTA; 0,4 M DTT; 8 % (w/v) SDS; 4 % (v/v) Glycerin; 0,2 % (w/v) Bromphenolblau
-----------------	--

2.2.2.5. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteingelelektrophoresen wurden in einer Mini-Elektrophoreseeinheit (BioRad) durchgeführt (Protokoll modifiziert nach Laemmli, 1970). Für die Auftrennung der Proteine wurden Acrylamidgele verwendet. Das Trenngel wurde nach dem Auspolymerisieren mit dem Sammelgel überschichtet. Anoden- und Kathodenreservoir der Elektrophoreseeinheit wurden mit 1 x Laufpuffer gefüllt. Das Gel wurde mit 5 µl Proteinmolekulargewichtsstandard (Bio Labs, Prestained Protein Marker, Broad Range) und gleichen Mengen Proteinproben beladen.

Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V. Nachdem die Bromphenolblau-Lauffront den anodischen Gelrand erreicht hatte, wurde der Gellauf gestoppt und das Gel anschließend entweder für 1 h in Coomassie-Färbelösung und danach 1h in Entfärbelösung inkubiert, oder falls das Gel geblottet werden sollte, 5 min in Ponceau S gefärbt.

Sammelgel 4 % (0,75 mm)	0,4 ml Acrylamid/Bisacrylamidstammlösung 30:0,8; 1,5 ml Tris/SDS-Puffer pH 6,8; 1,1 ml <i>A. bidest</i> ; 38 µl APS 10 % (w/v); 5 µl TEMED
Trenngel 10 % (0,75 mm)	2,5 ml Acrylamid/Bisacrylamidstammlösung 30:0,8; 3,75 ml Tris/SDS-Puffer pH 8,8; 1,75 ml <i>A. bidest</i> .; 38 µl APS 10 % (w/v); 5 µl TEMED
Tris/SDS-Puffer pH 6,8	0,25 M Tris/HCL pH 6,8; 0,2 % (w/v) SDS
Tris/SDS-Puffer pH 8,8	0,75 M Tris/HCL pH 8,8; 0,2 % (w/v) SDS
10 x Laufpuffer	0,25 M Tris; 1,92 M Glycin; 1 % (w/v) SDS
Coomassie-Färbelösung	0,2 % (w/v) Coomassie-Brilliantblau R250 in Entfärbelösung
Entfärbelösung	50 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure
Ponceau S-Färbelösung	0,5 % (w/v) Ponceau S; 1% (v/v) Essigsäure

Zur Erzeugung von niedrigprozentigeren Trenngelen wurden der Anteil der Acrylamid/Bisacrylamidstammlösung heruntergerechnet und der *A. bidest* Anteil der Trenngelzusammensetzung im entsprechenden Verhältnis erhöht.

2.2.2.6. Membrantransfer von Proteinen

Das Proteingellaufmuster aus der SDS-PAGE wurde in einer *Semi-Dry*-Kammer (BioRad) auf Nitrozellulose (Protean BA 85, Schleicher & Schuell) übertragen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Polyacrylamidgele für 10 min in Transferpuffer inkubiert. Auf der Anode wurden 1 Lage Extra Thick Blot Paper™ (BioRad), die Nylonmembran, das Polyacrylamidgel und 1 Lage Extra Thick Blot Paper™ angeordnet. Alle Bestandteile des Blotting-"Sandwiches" wurden vorab mit Transferpuffer bedeckt. Nach Aufsetzen der Kathode wurde für 1 h, 10 V Spannung angelegt.

Transferpuffer	48 mM Tris; 39 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol; 0,0375 % (w/v) SDS
----------------	---

2.2.2.7. Immunodetektion von Proteinen

Nach vollzogenem Transfer wurde die Membran 1 h bei RT in Blockpuffer inkubiert, um unspezifische Bindungen von Antikörpern zu vermeiden. Danach wurde die Membran mit dem primären Antikörper in Blockpuffer ü. N. bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Membran, dreimal je 10 min mit 1 x PBS gewaschen und im Anschluß mit dem sekundären Meerrettichperoxidase gekoppeltem Antikörper in Blockpuffer 2 h, bei RT inkubiert. Es wurde erneut dreifach in 1 x PBS gewaschen. Die Immunodetektion erfolgte mit Hilfe des "ECL™ *Western blotting analysis system*" (Amersham) gemäß den Angaben des Herstellers.

Anschließend wurde die emittierte Chemiluminiszenz mittels Filmbelichtung (Hyperfilm, Amersham) oder Messung mittels ChemiDoc XRS (BioRad) ausgewertet. Der Nachweis von AP-konjugierten Sekundärantikörpern erfolgte durch Inkubation der Membranen mit einer BCIP/NBT Entwicklungslösung. Die sich hierbei entwickelnde Farbreaktion wurde durch *A.bideest* gestoppt.

1× PBS	4,3 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,4 mM KH ₂ PO ₄ ; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl , pH 7,4
Blockpuffer	1 x PBS; 5 % (w/v) Milchpulver
BCIP/NBT Entwicklungslösung:	20 µl BCIP Lösung, 40 µl NBT Lösung, 10 ml AP-Puffer
BCIP Lösung	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphate, 50 mg/ml in 100% DMF
NBT Lösung	Nitroblue Tetrazoliumchloride, 50 mg/ml in 70% DMF
AP-Puffer:	100 mM TrisCl pH 9,5; 100 mM NaCl ; 5mM MgCl ₂

2.2.2.8. Immunpräzipitation

Mit Hilfe der Immunpräzipitation (IP) können Antigene, für die spezifische Antikörper vorliegen, aus einem komplexen Proteingemisch präzipitiert werden. Das präzipitierte Zielprotein und seine etwaigen Interaktionspartner werden dann im Western-Blot nachgewiesen. Für die IP wurde entweder Homogenat aus Maushirn oder Zelllysate von kotransfizierten HEK 293-Zellen, welche die Interaktionspartner überexprimierten, verwendet. Für die Präzipitation der entsprechenden Proteine aus Gehirn wurde der Antikörper an Protein A-Kügelchen gekoppelt. Protein A stammt aus der bakteriellen Zellwand von *Staphylococcus aureus* und bindet mit hoher Affinität an die Fc-Region vieler Immunglobuline von Säugern. Bindet der Fc-Teil des Antikörpers an Protein A, so bleibt der Fab-Teil des Antikörpers für die Bindung des Antigens zugänglich. Für Koimmunpräzipitationen wurden 1,5 ml murines Gehirnlisat Mäusen zur Präadsorption eingesetzt, um unspezifische Bindungen des Lysats an Protein zu vermeiden. Das Lysat wurde mit 40 µl EZview Red Protein A Affinity Gel (Sigma) im Eppendorf Gefäß (Eppendorf, AG) für 45 min drehend bei 4°C inkubiert und anschließend für 30 sec bei 2000 x g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf Gefäß überführt, mit 5 µg entsprechendem Antikörper oder Ig Kontrolle versetzt und ü. N. bei 4°C drehend inkubiert. Die ü. N.-Ansätze wurden nach Zugabe von 40 µl EZview Red Protein A Affinity Gel für weitere 2 h end-over-end bei 4°C inkubiert und für 30 sec bei 2000 x g abzentrifugiert. Nach fünfmaligem Waschen mit jeweils 1 ml Aufschlusspuffer und einmaligen Waschen mit 1x PBS wurde der Überstand abgenommen und das Sediment in 25 µl 2,5 x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Analyse erfolgte über SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot. Um die Interaktion von Epitop-markierten überexprimierten Proteinen in Zellen nachzuweisen, wurden HEK 293-Zellen in einer 6-Well Platte (9,5

cm²/Well) ausgesät und die entsprechenden Plasmide mit FuGENE-Transfektionsreagenz in die Zellen eingebracht. Nach 48 h Inkubation im Brutschrank wurden Zelllysate für die IP hergestellt. Dafür wurden die Zellen mit 4 ml PBS pro Well gewaschen und anschließend mit 200 µl Aufschlusspuffer pro Well mittels eines Zellschabers gelöst. Die Zellsuspensionen von jeweils zwei Wells pro verwendetem Konstrukt wurden dann in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vereinigt. Der Zellaufschluss erfolgte mit Hilfe einer 23 G-Kanüle durch siebenmaliges Auf- und Abziehen auf Eis und unter Vermeidung von Schaumbildung. Die Zelltrümmer wurden bei 14 000 rpm für 30 min bei 4°C abzentrifugiert und das Zelllysate in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Die Präzipitation der Proteinkomplexe erfolgte mit Hilfe von Antikörpern, die gegen das spezifische Epitop, in diesem Arbeit HA-Epitop bzw. FLAG-Epitop gerichtet sind und in diesem Falle bereits mit Agarose konjugiert waren. Von dieser Agarose wurden pro IP 25 µl „slurry“ eingesetzt, die vorher viermalig mit jeweils 1 ml Aufschlusspuffer gewaschen wurde (2000 x g , 2 min). Die Kopplung des Proteins mit dem Agarose-konjugierten Antikörper erfolgte für 4 h bei 4°C drehend. Nach der Inkubation des Lysats mit der Antikörper-gekoppelten Agarose wurde diese bei 2000 x g für 3 min bei 4°C abzentrifugiert und das Sediment nach sechsmaligem Waschen im Aufschlusspuffer in 70 µl 2,5x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Analyse erfolgte über SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot.

Aufschlusspuffer für Homogenat aus Maushirn	1x TBS, 1,2 % Triton X 100, 5 mM EDTA, Complete® (Proteaseinhibitor, Roche)
Aufschlusspuffer für Zelllyse	1x TBS, 1,2 % Triton X 100, 2 mM EDTA, Complete® (Proteaseinhibitor, Roche)
1x TBS	50 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; pH 7,5

2.2.2.9. Dual-Luziferase-Assays

Gemäß der Angaben des Herstellers (Promega, Madison, USA) wurden Dual-Luziferase-Assays mit Hilfe des Dual-Luciferase®-Reporter Assay System durchgeführt. Jeweils 1 Well (9,5 cm²) einer transfizierten 6 Well-Platte HEK 293-Zellen wurde eingesetzt. Jeweils 2 Wells (19 cm²) einer transfizierten 6 Well-Platte Astrozyten wurde vereinigt und eingesetzt. Jeweils 4 Wells (3,8 cm²) einer transfizierten 12 Well-Platte Neurone wurde vereinigt und eingesetzt. Die anschließende Reaktion wurde in einen GloMax®-96 Microplate Luminometer (Promega, Madison, USA) gemessen.

2.2.3. Zellkultur Methoden

2.2.3.1. Kulturgefäße und Kulturbedingungen

Alle Zellen wurden bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit in Kulturgefäßen der Firma Falcon BD Biosciences Discovery Labware (Bedford, USA) und Nunc (Wiesbaden) kultiviert.

2.2.3.2. Kultivierung und Passagieren von HEK 293-Zellen

Je nach Zelldichte mussten die Zellen nach ca. 2 bis 3 Tagen passagiert bzw. für Transfektionen in einer definierten Zellzahl in Wachstumsmedium neu ausgesät werden. Nach Waschen der Zellen mit 1x PBS wurden diese mit 1 % (v/v) Trypsin bei 37°C inkubiert, bis sich die Zellen gelöst hatten. Anschließend wurde das Enzym durch Zugabe des doppelten Volumens von FCS-haltigem DMEM inhibiert. Die Zellzahl wurde mittels einer Neubauer Zählkammer bestimmt und die Zellen in der entsprechenden Zellkonzentration neu ausgesät. Für Dual-Luziferase-Assays bestimmte HEK 293-Zellen wurden in 6 Well-Platte ausgesät, in einer Dichte von 150.000 Zellen pro Well (9,5 cm²), bei Erreichen von 60 % Konfluenz wurden die Zellen transfiziert.

DMEM	(Gibco)
Käblerserum (FCS)	(Gibco)
Penicillin	100x (Gibco)
Streptomycin	100x (Gibco)
Glutamin	200 mM (Gibco)
Wachstumsmedium	10 % (v/v) FCS, 0,5 mM Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin , in DMEM
Trypsin	2,5 % (Gibco) mit <i>A. bidest</i> verdünnt

2.2.3.3. Präparation primärer kortikaler Neurone

Rattenembryonen im Embryonalstadium 18 bis 20 (E18–E20) und Mausembryonen im Embryonalstadium 17 (E17) wurden für die Präparation verwendet. Dazu wurde beim Muttertier der Bauchraum eröffnet und die Uteri entnommen. Die Köpfe der Embryonen wurden dekapitiert und die Gehirne vorsichtig isoliert. Anschließend wurden die Meningen sorgfältig abpräpariert, die Kortizes herausgeschnitten, präpariert und in HBSS gesammelt. Nach zweimaligem Waschen des Gewebesediments mit HBSS wurden zum resuspendierten Gewebe (im Gesamtvolumen von 5 ml HBSS), 100–500 µl einer Trypsinlösung hinzugegeben und vorsichtig gemischt. Nach einer 15 bis 20 min Inkubation bei 37°C wurde die Verdauung abgenommen und der Verdauung durch die Zugabe von ca. 3 ml Plating-Medium abgestoppt. Für die hiernach erfolgende mechanische Vereinzelung (Trituration) wurden ca. 2 µl DNaseI einer 5 bis 10 mg/ml Stammlösung in 1x PBS hinzugegeben und die Zellen wurden dann mittels einer feuerpolierten Pasteurpipette vorsichtig trituiert. Nach dem

Absetzen nicht verdauter Gewebeteile wurde der Zellüberstand in ein neues Falcon überführt, resuspendiert und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden in einer Dichte zwischen 100.000- 150.000 Zellen pro Well (3,8 cm²) einer 12 Well-Platte auf mit Poly-L-Lysin (100 µg/ml) beschichteten Deckgläschen ausgesät. Nach ca. 3 h Inkubation im Brutschrank werden die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen dann in 1 ml Wachstumsmedium pro Well überführt.

HBSS	(Gibco)
MEM	mit Earle's Salzen (Gibco)
Pferdeserum	(Gibco)
Penicillin	100x (Gibco)
Streptomycin	100x (Gibco)
Neurobasal A	(Gibco)
B27	50x (Gibco)
Glutamin	200 mM (Gibco)
Plating Medium	0,6 % (w/v) Glucose sterilfiltrieren, 10 % Pferdeserum, 1 % Penicillin/Streptomycin , in MEM
Wachstumsmedium	1 % (v/v)B27, 0,5 mM Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin , in Neurobasal A
Trypsin	2,5 % (Gibco)
PBS	(Gibco)
Poly-L-Lysin	(Gibco)

2.2.3.4. Präparation primärer Astrozyten

Primäre Astrozyten aus Ratten und Mäusen wurden aus 2 bis 3 Tage alten Tieren gewonnen. Die Köpfe der Nager wurden dekapitiert und die Gehirne vorsichtig isoliert. Anschließend wurden die Meningen sorgfältig abpräpariert, die Kortizes herausgeschnitten und in HBSS gesammelt. Das Gewebe wurde mit 1 % Trypsin für 5 min bei 37 °C inkubiert. Diese enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von serumhaltigem DMEM gestoppt. Nach einem Zentrifugationschritt von 1 min bei 300 x g, 4 °C wurde der Überstand abgenommen und das Zellsediment in DMEM aufgenommen. Nach zweimaligem Waschen des Gewebesediments mit HBSS wurde in 5 ml HBSS resuspendiert. Danach wurde 8 x trituriert und nach dem Absetzen nicht verdauter Gewebeteile wurde der Zellüberstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach einem Zentrifugationschritt von 1 min bei 300 x g, 4 °C wurde der Überstand erneut 5 min bei 1200 x g und 4 °C zentrifugiert und das Sediment in Wachstumsmedium aufgenommen. Die Zellen wurden in einer Dichte, zwischen 500.000 bis 800.000 Zellen pro Well (9,5 cm²) in einer 6 Well-Platte ausgesät die vorab mit Poly-L-Lysin beschichtet wurde. Nach 2 Tagen wurde ein kompletter Mediumwechsel durchgeführt. Nach 10 bis 12 Tagen, wenn der im Medium enthaltene pH-Indikator einen Farbumschlag zeigte wurden die in der Mischkultur enthaltenen Mikroglia abgeschüttelt, das Medium komplett gewechselt und die Astrozyten am Folgetag transfiziert.

HBSS	(Gibco)
DMEM	(Gibco)
Käblerserum (FCS)	(Gibco)
Penicillin	100x (Gibco)
Streptomycin	100x (Gibco)
Glutamin	200 mM (Gibco)
Wachstumsmedium	10 % (v/v) FCS, 0,5 mM Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin , in DMEM
Trypsin	2,5 % (Gibco) mit <i>A. bidest</i> verdünnt
Poly-L-Lysin	(Sigma)

2.2.3.5. Transiente Transfektion mit FuGENE® Transfektionsreagenz

FuGENE6 ist ein Transfektionsreagenz, welches mit der DNS komplexiert und diese in die Zellen einschleust. Vorteile dieser Transfektionsmethode sind hohe Transfektionseffizienzen und nahezu keine Zytotoxizität. Transiente Transfektionen für Koimmunpräzipitationen, bei denen eine gleichmäßige und hohe Transfektionseffizienz erforderlich war, wurden mit diesem Agens durchgeführt. Das vom Hersteller (Roche) vorgeschlagene Verhältnis FuGENE6-Reagenz zu µg DNS von 3:1 wurde eingehalten. HEK 293-Zellen wurden in einer 6-well Platte ausgesät nach eintägiger Inkubation im Brutschrank transfiziert. Primäre Astrozytenkulturen wurden nach Abschütteln der Mikroglia transfiziert. Dazu wurden jeweils 200 µl OptiMEM (Gibco) pro 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und 6 µl FuGENE6 dazugegeben. Anschließend wurden 2 µg Plasmid-DNS hinzugegeben, sorgfältig gemischt und 20 bis 30 min bei RT inkubiert. Der FuGENE-DNS-Komplex wurde tropfenweise auf den Zellen verteilt, die sich in 2 ml Medium (DMEM, 5 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin) befanden. Die Zellen wurden dann bis zum weiteren Experiment bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.

2.2.3.6. Transiente Transfektion mit Effectene Transfektionsreagenz

Effectene ist ein nicht-liposomales Transfektionsreagenz, dessen Vorteile in der hohen Transfektionseffizienz für Zelllinien und Primärzellen sowie in der geringen Zytotoxizität liegen. Die DNS wird zunächst mit Hilfe eines Enhancers kondensiert, nach Zugabe von Effectene formt sich ein kationischer Effectene-DNA-Komplex, der von den Zellen aufgenommen wird. Die kortikalen Primärzellen wurden nach der Präparation mit 150.000 Zellen pro Well einer 12-Well Platte ausgesät und transfiziert. Für einen Doppelansatz wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß je 150 µl EC-Puffer vorgelegt, 1 µg Plasmid-DNA hinzugegeben sowie 10 µl Enhancer. Nach sorgfältigem Mischen erfolgte eine Inkubation für 5 min bei RT. Anschließend wurden 8 bis 16 µl Effectene dazugegeben und nach erneutem Mischen für 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 400 µl Wachstumsmedium wurde der

Reaktionsansatz gleichmäßig auf den Zellen verteilt, die sich in 1 ml frischem Wachstumsmedium befanden. Nach 1 bis 2 h Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und anschließend bis zum Experiment in Wachstumsmedium inkubiert.

2.2.4. Immunhistologische Methoden

2.2.4.1. Transkardiale Perfusionsfixierung von Nagern

Die verwendeten Nager wurden durch intraperitoneale Injektion einer Narkoselösung [20 % Ketamin (v/v, CuraMed, Pharma); 8 % Rompun (v/v, Bayer Health Care); 0,9 % NaCl] entsprechend ihres Gewichts (0,1 ml/ gr) betäubt und nach Punktieren des linken Herzventrikels wurde die zu perfundierende Lösung in den rechten Vorhof mittels einer Kanüle eingeleitet. Zur Entfernung von Blut aus den Gefäßen wurde zuerst mit 0,9 % NaCl perfundiert, bis die Leber des Nagers sich entfärbte. Anschließend wurde eine 4 % Paraformaldehydlösung [4 % PFA(w/v) in 1x PBS; pH 7,4] verwendet, mit der das Nagetier solange perfundiert wurde, bis eine ausreichende Fixierung erzielt wurde. Dann wurden die benötigten Organe herauspräpariert und ü. N. in 4 % Paraformaldehydlösung nachfixiert.

2.2.4.2. Anfertigung von Kryostatschnitten

Zur Anfertigung von Kryostatpräparaten wurden die verwendeten, nachfixierten Gewebe jeweils ü. N. in 10 %-, 20 %-, 30 %- Saccarose (w/v) in 0,1 M PB; pH 7,4 überführt und in der Gasphase flüssigem Stickstoffs in Tissue Freezing Medium[®] (Jung) eingefroren. In einem Kryostaten wurden die eingebetteten Organe in 5 bis 20 µm Dicke geschnitten und auf Objektträger aufgenommen, getrocknet und sofort weiterverarbeitet oder bei -80° C gelagert.

2.2.4.3. Anfertigung von Vibratomschnitten

Die nachfixierten Organe wurden in 50 µm Dicke geschnitten bei 60 Hz, und einer Geschwindigkeit von 1mm/s. Im Anschluß wurde die Schnitte in PB überführt, bei 4°C gelagert oder sofort weiterverarbeitet.

2.2.4.4. Fixierung kultivierter Einzelzellen

Primärzellen oder Zelllinien, die auf sterilen Deckgläschen (Menzel GmbH), kultiviert wurden, wurden 3 x fach mit PBS gewaschen und für 20 min in 4 % Paraformaldehydlösung fixiert.

2.2.4.5. *In situ* Hybridisierung auf Kryostatschnitten

Zur Ermittlung der Einbaueffizienz der hergestellten DIG-RNS-Sonden, wurde der vom Hersteller (Roche) empfohlene Spotttest, gemäß den Angaben des Herstellers, durchgeführt. Die verwendeten Gefrierschnitte wurden für 20 min bei RT mit 4 % Paraformaldehydlösung nachfixiert, das PFA wurde durch 3 x 5 min (RT) waschen in Waschpuffer entfernt. Es folgte eine Inkubation in Acetylierungspuffer für 10 min (RT). Danach 5 x 5 min Waschen in Waschpuffer. Dann 5 min Inkubation in PK-Puffer (RT) und danach 20 min Inkubation in Proteinase K-Lösung (RT), gefolgt von von 5 x 5 min Waschen in Waschpuffer (RT). Die Schnitte wurden bei 62°C in einer feuchten Kammer 1 h prähybridisiert, dann erfolgte die Zugabe der aufgekochten Sonde, die ü. N. bei 62°C hybridisierte. Nach der Hybridisierung wurden die Schnitte erst 3 x 5 min in SSC Waschpuffer I bei 62°C gewaschen, dann 5 x 10 min in Formamid I bei 62°C gewaschen, gefolgt von 5 x 10 min in Formamid II bei 62°C. Es folgten 3 x 5 min Waschen in SSC Waschpuffer II bei 62°C und 3 x 5 min Waschen in SSC Waschpuffer II bei RT. Danach wurde in TN-Puffer bei 3 x 5 min (RT) gewaschen und ü. N. in 4 % (v/v) Ziegen Serum in TN-Puffer bei 4° C blockiert. Am Folgetag, Zugabe von Anti-DIG-Fab-AP-Antikörperlösung, Inkubation 4 h bei RT, danach 3 x 15 min Waschen in Maleat-Puffer (RT), gefolgt von 5 min Inkubation in AP-Substratpuffer (RT). Durch Zugabe der NBT/BCIP- Färbelösung wurde die enzymatische Farbreaktion in Gang gesetzt und bei ausreichender Färbung durch 3 x 15 min waschen in PBS abgestoppt. Die Schnitte wurde noch zweifach mit *A. bidest* gespült und mit Glycerol-Gelatine (Sigma) eingedeckelt.

Waschpuffer	1 x PBS (DEPC), 0,05 % (v/v) Tween 20
Acetylierungspuffer	0,1 M Triethanolamin-Hydrochlorid, pH 8,0; 0,25 % (v/v) Essigsäureanhydrid
PK-Puffer	0,1M Tris-HCL; 10 mM EDTA, pH 8,0; 0,05 % (v/v) Tween 20
Proteinase K-Lösung	2 µg/ml in PK-Puffer
Hybridisierungspuffer	0,02 M Tris, pH 8,0; 5 mM EDTA, pH 8,0; 0,3 M NaCl; 0,1 % (w/v) Dextransulfat; 1 x Denhardts-Lösung; 0,05 % (w/v) t-RNA; 50 % (v/v) Formamid (deionisiert)
SSC Waschpuffer I	5 x SSC, 0,05 % (v/v) Tween 20
SSC Waschpuffer II	0,1 x SSC, 0,05 % (v/v) Tween 20
Foramid I	50 % (v/v) Formamid (deionisiert); 2x SSC; 0,05 % (v/v) Tween 20
Foramid II	50 % (v/v) Formamid (deionisiert), 1x SSC; 0,05 % (v/v) Tween 20
TN-Puffer	0,1 M Tris-HCL; 0,15 M NaCl, pH 7,5; 0,05 % (v/v) Tween 20
Anti-DIG-Fab-AP-Antikörperlösung	1 x TN-Puffer; 4 % Ziegen Serum (v/v); Anti-DIG-Fab-AP-Antikörper (1: 2000)
Maleat-Puffer	0,1 % Maleinsäure (v/v); 0,15 M NaCl, pH 7,0; 0,05 % (v/v) Tween 20
AP-Substratpuffer	0,2 M Tris-HCL, pH 9,5; 0,1 M NaCl; 1 % (w/v) MgCl ₂
NBT/BCIP-Färbelösung	1 % (v/v) NBT/BCIP; 1M Levamisol in AP-Substratpuffer

2.2.4.6. Immunhistologische Fluoreszenzfärbung

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie kann die Lokalisation von zellulären Bestandteilen untersucht werden. Das nachzuweisende Protein, das durch die Verwendung eines spezifischen Primärantikörpers und eines Fluorochrom-markierten Spezies-spezifischen Sekundärantikörpers mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert wird, wird mit kurzwelligem Licht angeregt und emittiert längerwelliges Fluoreszenzlicht (Immunfluoreszenz). Dieses Licht kann beobachtet und aufgezeichnet werden. Die Benutzung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe, wie z. B. Alexa Fluor 488 (grüne Emission) und Alexa Fluor 568 (rote Emission) erlaubt eine Mehrfachmarkierung. Damit können in konfokalen Aufnahmen mit dem LSM (Laser Scanning Microscope) auch Kolokalisationen von Proteinen beobachtet werden. Für diese Kolokalisationsstudien wurden Doppelfärbungen durchgeführt, indem Primärantikörper aus unterschiedlichen Spezies verwendet wurden.

Verwendete fixierte Zellen wurden für 10 min mit 1 x PBS, 5 % FCS, 0,2 % Triton X-100 permeabilisiert. Verwendete fixierte Kryo- oder Vibratomschnitte wurden für mit 1 x PBS, 5% FCS, 0,2- 1,0 % Triton X-100 für 10 min permeabilisiert. Im Anschluß wurde mindestens 30 min bei RT mit 1 x PBS, 5 % FCS blockiert, und mit den entsprechenden Primärantikörpern für 2 h bei RT oder ü. N. bei 4°C inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden Sekundärantikörper für 2 h. Die Zellen und Schnitte wurden erneut mehrmals gewaschen und in Glycerolgelatine (Sigma) oder Immumount (Thermo Scientific) eingebettet.

2.2.5. Slice-Kultur und Elektroporationsbedingungen

Herstellung und Kultivierung der Slice-Kulturen wurde von Brita Vorwerk (Charite, Berlin) durchgeführt, 300 µm koronare kortikale Slices fünf Tage alter Mäuse (C57/bl6) wurden eine Stunde nach Herstellung, gemäß etablierter Protokolle (Yamamoto et al., 1989; Yamamoto et al., 1992) elektroporiert. In die hippokampale CA3 Region der Slices wurden Plasmide in einer Konzentration von 2 µg/µl injiziert. Die Elektroporation wurde unter Standardbedingungen (Uesaka et al., 2005) mit 100 V, Pulsdauer 5 msec, Intervall 500 msec, zweifach durchgeführt. Nach zweitägiger Inkubation wurden die Slices fixiert und 100 µm Schnitte für nachfolgende immunhistologische Analysen angefertigt.

2.2.6. Statistische Verfahren

Für die statistische Auswertung aller in dieser Arbeit vorliegenden Experimente wurden zunächst die Mittelwerte aus den jeweiligen Daten gebildet und anschließend die Standardabweichung der Mittelwerte berechnet. Mit Hilfe des Student's t-Test für

unverbundene Stichproben sollte herausgefunden werden, ob sich die durchschnittlichen Werte eines Versuches signifikant unterscheiden. Die Signifikanz eines Ergebnisses wird als p-Wert bezeichnet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt, was einer 5 %-igen Irrtumswahrscheinlichkeit entspricht. Der berechnete p-Wert wird mit dem festgelegten Signifikanzniveau verglichen. Die Prüfung dieser Signifikanz erfolgte unter Verwendung der Software Excel. War der errechnete Signifikanzwert kleiner als 0,05, so bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten zweier Stichproben. Ergab sich ein größerer Wert als 0,05, so bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Stichproben.

2.2.7. *In silico* Analysen

2.2.7.1. Internetquellen

BES-Clone Identifizierung	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview
Blast	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
ClustalW	http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2
Vorhersage von CpG-Inseln	http://cpgislands.usc.edu/
MultAling	http://bioinfo.genotoul.fr/multaling
NetPhos 2.0 Server	http://www.cbs.dtu.dk
NetNGlyc 1.0 Server	http://www.cbs.dtu.dk

2.2.7.2. Computersoftware

Macvector 10.0.2

geneconstruction kit 2.5

prisms 5, Graph Pad

4peaks1.7.2

AliBaba 2.1

3. Resultate:

3.1. Generierung eines PRG-1-BAC- Reportermausmodells

3.1.1. Herstellung von BAC-Konstrukten zur Generierung einer PRG-1-BAC-Linie

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Mauslinie generiert werden, die „yellow fluorescent protein“ (YFP) unter Kontrolle des nativen PRG-1 Promoters exprimiert. Zur Erzeugung dieser Reportermauslinie wurde die von Nathaniel Heintz entwickelte Klonierungsstrategie des GENSAT Projektes verwendet (Gong et al., 2003). Die transgene Mauslinie wurde mittels eines bakteriellen artifiziellen Chromosoms generiert (BAC), welches den PRG-1-Locus inklusive aller regulatorischen Elemente enthalten sollte. Durch die Größe der inserierten BAC-Sequenz wird die Wahrscheinlichkeit von Positionseffekten auf die Expression des Reportergens durch benachbarte Gene am Insertionsort minimiert. In den Translationsstart (ATG) von PRG-1 auf dem verwendeten BAC wurde die Sequenz von YFP, einer verstärkten gelb fluoreszierenden Variante des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) aus *Aequoria victoria* inklusive einer Polyadenylierungssequenz inseriert.

3.1.2. Identifizierung von PRG-1-BAC-Klonen

Ein geeigneter BAC-Klon wurde mittels der Datenbank des „National Center for Biotechnology“ (NCBI) identifiziert. Eine Übersicht der genomischen Lage von PRG-1 wurde ausgewählt. Durch Auswahl der BES-Clone-(BAC end sequences) Darstellungsoption wurde die Lage der in der Datenbank befindlichen BAC-Klone auf die genomische Lage von PRG-1 projiziert (Abb. 8 A). Als Auswahlkriterium wirkte die Größe des BAC, der soviel genomische Umgebung von PRG-1 wie möglich enthalten sollte, um alle notwendigen regulatorischen Sequenzen für die Expression von PRG-1 zu transferieren. Eine Maximalgröße von 200 kb sollte nicht überschritten werden, da durch methodisch bedingte Scherkräfte bei der Oozyteninjektion die Wahrscheinlichkeit der Insertion von fragmentierten BAC-Sequenzen erhöht wird. Die Oozyteninjektion wurde an der Transgenic Core Facility des Max-Delbrück-Centrums (Berlin) durchgeführt. Als weiteres Kriterium diente die Lage des BAC in Relation zu PRG-1. Die gesamte genomische Sequenz von PRG-1 (ca. 41 kb) sollte von 5'-stromaufwärts wie 3'-stromabwärts ausreichend großen Sequenzabschnitten umschlossen werden. Die Wahl fiel auf einen Klon der kommerziell erhältlichen BAC-Bibliothek RPCI-23 (Osoegawa et al., 2000). Diese Bibliothek besteht aus genomischer DNA

weiblicher Mäuse des Stammes C57BL/6J. Durch partiellen Verdau mit EcoRI und folgender Methylierung der Fragmente mittels EcoRI-Methylase, wurden vom Hersteller ca. 200 kb große Fragmente isoliert, die in den Vektor pBACe3.6 (Frenzen et al., 1999) ligiert und nachfolgend in *E. coli*, Stamm DH10B transformiert wurden. Aus dieser Bibliothek wurde der BAC-Klon RPCI-23-340J18 (Abb. 8 B, C) gewählt, der die vollständige Sequenz von PRG-1 enthält, sowie 64 kb genomischer Sequenz stromaufwärts von *prg1* und 94 kb stromabwärts des Gens.

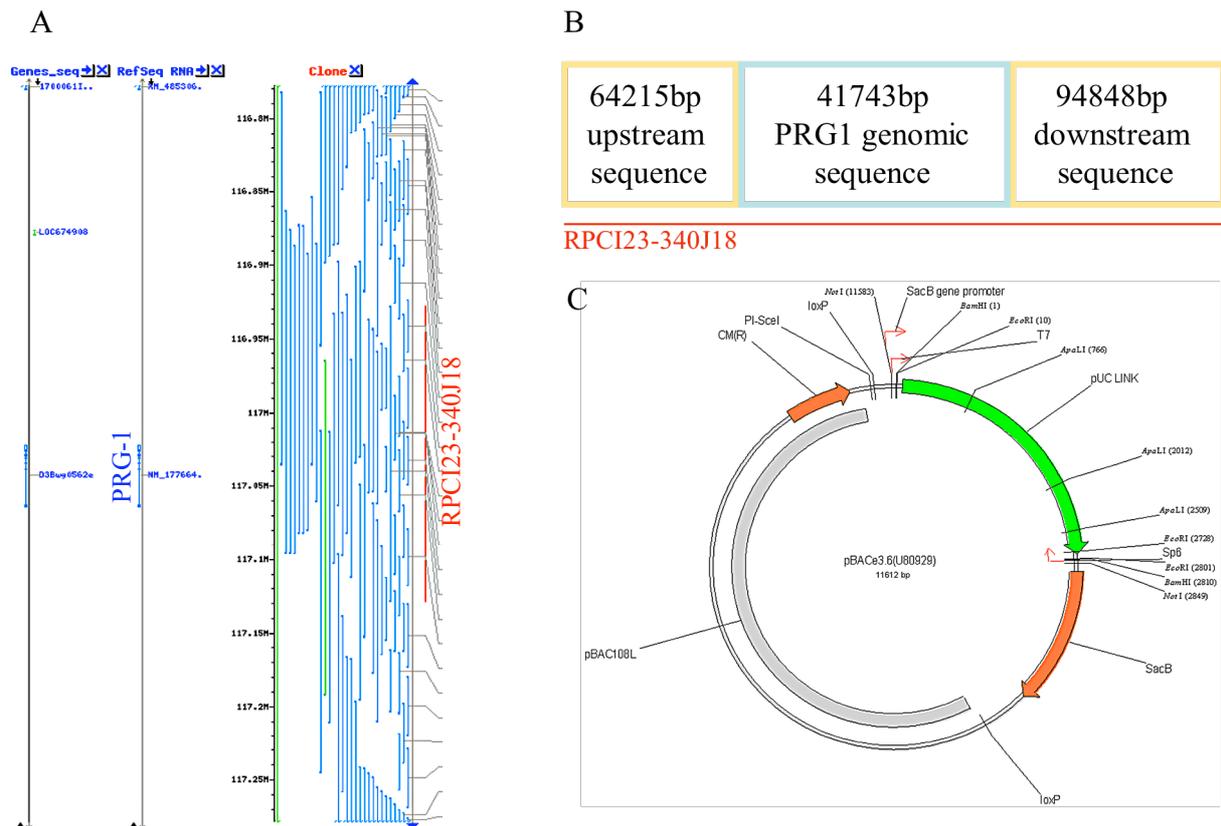


Abb. 8), A) Projektion der genomischen Lage von *prg1*(D3Bwg0562e) auf die Lage, der in der NCBI-Datenbank gespeicherten BAC-Klone. B) Schematische Übersicht der Lage von PRG-1 innerhalb der Insertion genomischer DNS, auf dem für die Transgenerierung verwendeten BAC-Klon. C) Übersicht des Vektoranteils des für die Transgenerierung verwendeten BAC-Klons.

3.1.3. Modifizierung des BAC-Klons mittels Rekombination

3.1.3.1. Rekombinationsstrategie

Aufgrund seiner Größe und des gehäuft Auftretens von gängigen Restriktionsschnittstellen wurde zur Modifikation des BAC der Mechanismus der homologen Rekombination genutzt. Hierfür sind DNS-Sequenzabschnitte mit sehr ähnlichen oder identischen Basenpaarabfolgen notwendig zwischen denen die zu inserierende Sequenz eingefügt wird, so daß diese in die Zielsequenz integriert werden kann. Mittels eines geeigneten Rekombinationsvektors (pNeo)

wird das Transgen in das BAC rekombiniert, positive Klone (Kointegrate) werden durch eine kotransferierte Antibiotikaresistenz selektiert. Ein weiterer, auf einer induzierbaren FLP-Rekombinase basierender, Mechanismus entfernt im Anschluß die zur Erzeugung der Reportermause unerwünschte Antibiotikaresistenz aus dem modifizierten BAC (Abb. 9).

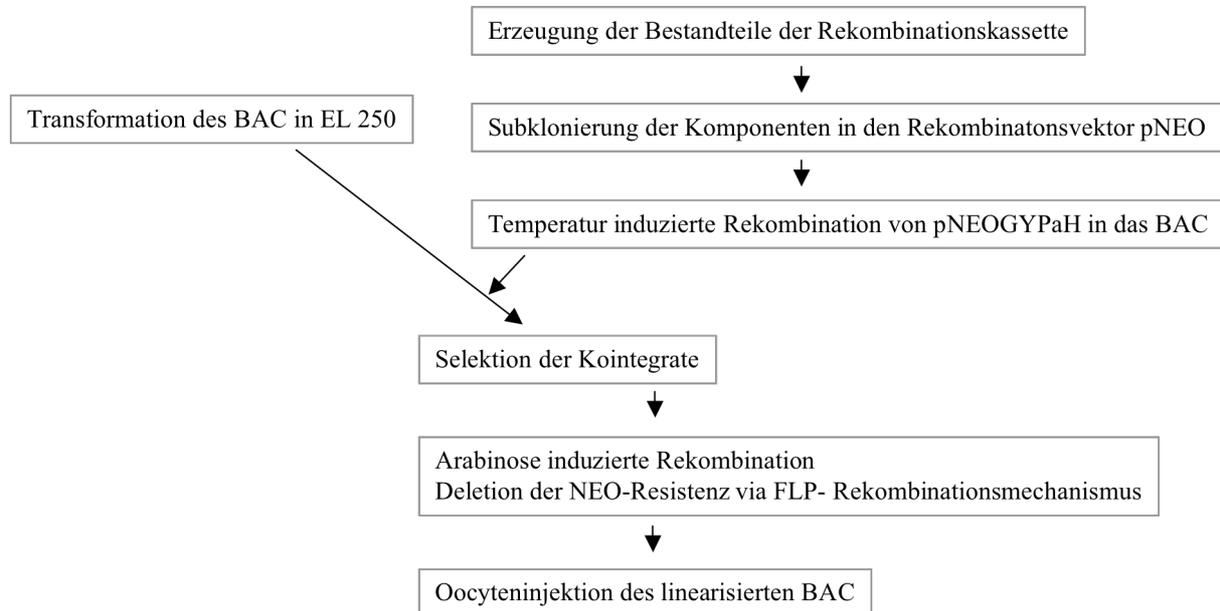


Abb. 9) Fließschema zur Erzeugung des PRG-1-YFP-BAC Reportermausmodells.

3.1.3.2. Generierung von Homologieboxen und der Reportergensequenz

Die Sequenz des Reportergens YFP wurde aus dem Vektor pEYFP-N1 mittels der Restriktionsenzyme SacII und NotI herausgeschnitten. Das Polyadenylierungssignal wurde mittels PCR aus dem Vektor pEYFP-N1 mit den Primern PAfw und PArew amplifiziert. Zur Erzeugung von Homologieboxen (Box G & H) wurden zwei flankierende Sequenzen (jeweils ca. 500 bp) des Translationsstartpunkts von *prg1* aus genomischer DNS von Mäusen des Stamms C57/bl6 mit den Primern BoxGfw/BoxGrew, sowie BoxHfw/BoxHrew amplifiziert. Zur Erzeugung passender Restriktionsschnittstellen wurden die entsprechenden Sequenzen stromaufwärts an die jeweiligen Primersequenzen angehängt (siehe verwendete Oligonukleotide). Die Amplifikate wurden anschließend in den Vektor pCR2.1 kloniert.

3.1.3.3. Subklonierung der Amplifikate in den Rekombinationsvektor pNEO

Die Homologieboxen, sowie das Polyadenylierungssignal wurden aus dem Sequenzierungsvektor pCR2.1 ausgeschnitten. Die Sequenz des Reportergens wurde durch Restriktion des Vektors pEYFP-N1 mit den Enzymen SacII und NotI isoliert. Alle Komponenten der Rekombinationskassette wurden nacheinander in den verdauten, dephosphorylierten Rekombinationsvektor pNEO subkloniert. Der entstandene Vektor pNEOGYPaH mit der kompletten Rekombinationskassette wurde mittels Restriktion überprüft.

3.1.3.4. Modifikation des BAC durch homologe Rekombination

Die aufgereinigte BAC-DNS wurde mittels Elektrotransformation in den thermosensitiven rekombinationskompetenten *E. coli* Stamm EL 250 transformiert. Der BAC-Klon RPCI-23-340J18 wurde vor der Transformation mittels Restriktionsanalyse überprüft. Der Rekombinationsvektor pNEOGYPaH wurde mit den Enzymen SacI und HindIII verdaut, um die Rekombinationskassette auszuschneiden und anschließend mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Das Fragment mit der Rekombinationskassette wurde aus dem Gel extrahiert. Die aufgereinigte Rekombinationskassette wurde in den *E. coli* Stamm EL 250 elektroporiert, in den vorab das BAC transformiert wurde. Durch die hitzeinduzierten, sequenzspezifischen, Rekombinationsmechanismen des Stammes EL250 wurde die Rekombinationskassette in das BAC/RPCI-23-340J18 inseriert. Über das in der Rekombinationskassette kotransferierte Neomycingen erfolgte die Selektion der Kanamycinresistenten rekombinierten BAC-Klone (Kointegrate). Die isolierten Klone wurden im Anschluß mittels Restriktionsanalyse überprüft. Durch einen weiteren von FLP-Rekombinasen mediierten Rekombinationsvorgang wurde das Neomycingen über „FLP-recombinase target“ (FRT)-Erkennungssequenzen wieder aus dem Kointegrat entfernt. Rekombinante Klone wurden über Kanamycinsensitivität identifiziert und die Integrität der BAC-Sequenz im Anschluß über Restriktionsanalyse bestätigt (Abb. 10). Zusätzlich wurde die Insertion der YFP-Sequenz in den modifizierten BAC-Klonen mittels Southernblot nachgewiesen.

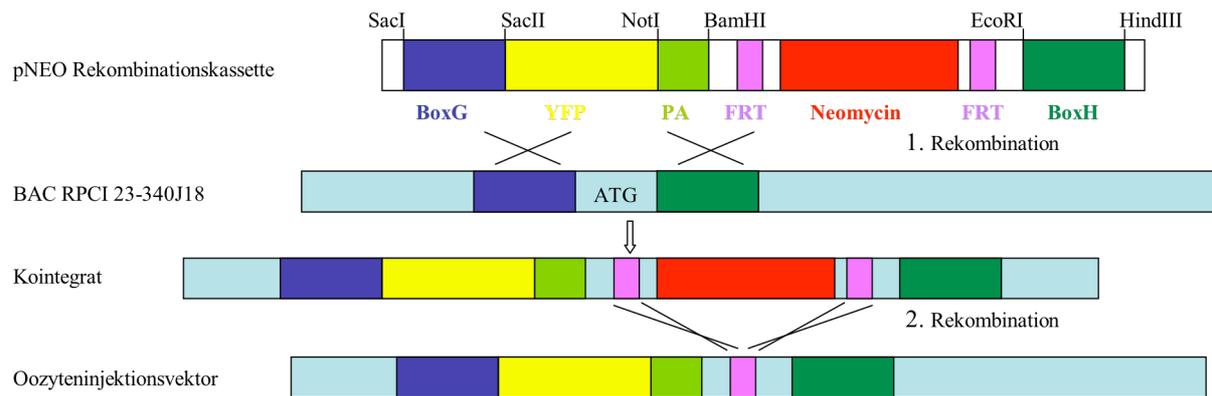


Abb. 10) Schematische Übersicht der Rekombinationsvorgänge zur Herstellung des Oozyteninjektionsvektors für die Transgenerzeugung. Die aus dem Rekombinationsvektor extrahierte Rekombinationskassette wurde über homologe Rekombinationsmechanismen in das BAC integriert. Über eine FLP-Rekombinase vermittelte Rekombination via FRT-Erkennungssequenzen wird die kotransferierte Neomycinresistenz aus dem rekombinanten BAC-Klon (Kointegrat) entfernt.

3.1.4. Generierung der Nachkommen (FO-Generation)

Eine Maxipräparation der modifizierten BAC-DNS wurde zweifach über einen Cäsiumchloridgradienten aufgereinigt, um zu vermeiden, daß durch Strangbrüche entstandene, verkürzte Konstrukte für die Oocyteninjektion verwendet wurden. Im Anschluß wurde die BAC-DNS mit PI-SceI linearisiert und auf eine Konzentration von 10 ng/µl eingestellt. Die Oocyteninjektion der BAC-DNS und der Transfer in scheinchwangere Weibchen wurde von Dr. Boris Jerchow und Katja Becker (Transgenic Core Facility, Max-Delbrück-Centrum Berlin) durchgeführt. Es wurden 90 Nachkommen (FO-Generation) erzeugt. Bei fünf Mäusen konnte eine YFP-Insertion mittels PCR mit den Primern PAfw/Hrew nachgewiesen werden.

Um die Insertion des vollständigen rekombinierten BAC nachzuweisen und transgene Linien auszuschließen, die nicht die gesamten transferierten 200 kb Sequenz genomischer Maus-DNS enthielten, wurden zwei weitere PCR-Analysen durchgeführt. Mit den Primerkombinationen BacEndefw/pBAC3.6rew und BacStartrew/pBAC3.6fw wurden Amplifikate erzeugt, welche den Übergang des Vektoranteils (pBAC3.6) des BAC RPCI-23-340J18 zum jeweiligen Ende, der in diesem BAC enthaltenen genomischen DNS-Sequenz nachwies (Abb 11). Eine komplette Insertion des gesamten Transgens konnte nur bei drei Mäusen mittels PCR nachgewiesen werden.

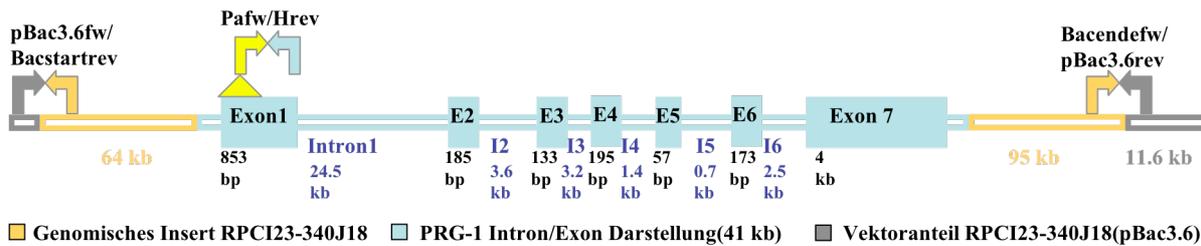


Abb. 11) Übersicht der Lage der Amplifikate aus den PCR-Reaktionen zum Nachweis der vollständigen BAC-Insertion. Die Insertion des Reportergens wurde nachgewiesen durch Amplifikation der Region zwischen dem Polyadenylierungssignal von YFP und der Homologiebox H (Pafw/Hrev). Die Insertion der jeweiligen Enden des BAC wurde dokumentiert durch die Amplifikation des Übergangs vom Vektoranteil des BAC zum Beginn (pBac3.6fw/Bacstartrev) bzw. Ende (Bacendefw/pBac3.6rev) des Anteils an genomischer Maus-DNS.

Die identifizierten transgenen Mäuse wurden mit C57/bl6 Mäusen verkreuzt und drei unabhängige Linien erzeugt. Die Insertion des Transgens konnte bei den drei unabhängig erzeugten Linien (F1-Generation) die PCR-positiv bezüglich des kompletten Transgens waren, via Southern Blot Analyse bestätigt werden (Abb. 12). Hierfür wurde die genomische DNS mit EcoRI verdaut und mit einer radioaktiv markierten Sonde gegen die YFP Sequenz wurde die inserierte Reportergensequenz nachgewiesen.



Abb. 12) Southern Blot zum Nachweis des inserierten Transgens. Genomische DNS von F1-Nachkommen der erzeugten transgenen Linien wurde mit EcoRI verdaut und im Anschluß mit einer Sonde gegen YFP hybridisiert.

3.1.5. Phänotypisierung der erzeugten Transgene

3.1.5.1. Nachweis der YFP mRNA via *in situ*-Hybridisierung

Bei den heterozygoten Nachkommen der drei erzeugten Linien wurde mittels *in situ*-Hybridisierung die Expression der YFP-mRNA mit der mRNA von PRG-1 verglichen (Abb. 13). Durch Amplifikation der YFP-Sequenz mit den Primern YFP_{insitu}fw/YFP_{insitu}rew aus pEGFP-N1 und nachfolgender Insertion des Amplifikats (über die Schnittstellen HindIII und XbaI) in pSPT 18 bzw. pSPT 19 wurden „antisense“ bzw. „sense“-Sonden zur Markierung der YFP-mRNA erzeugt. Die „antisense“ bzw. „sense“-Sonden zur Markierung der PRG-1-mRNA (pSPT19PRG-1, pSPT18PRG-1) wurden freundlicherweise von T. Trimbuch zur Verfügung gestellt. Alle drei untersuchten Linien zeigten eine identische Lokalisation der detektierten YFP-mRNA. Der Vergleich mit der parallel durchgeführten *in situ*-Hybridisierung von PRG-1 zeigte eine übereinstimmende Lokalisation der Signale im

Hippocampus und Cortex. Allerdings wurden deutlich weniger Zellen im Cortex durch die YFP-Sonde, markiert als durch die PRG-1 Sonde.

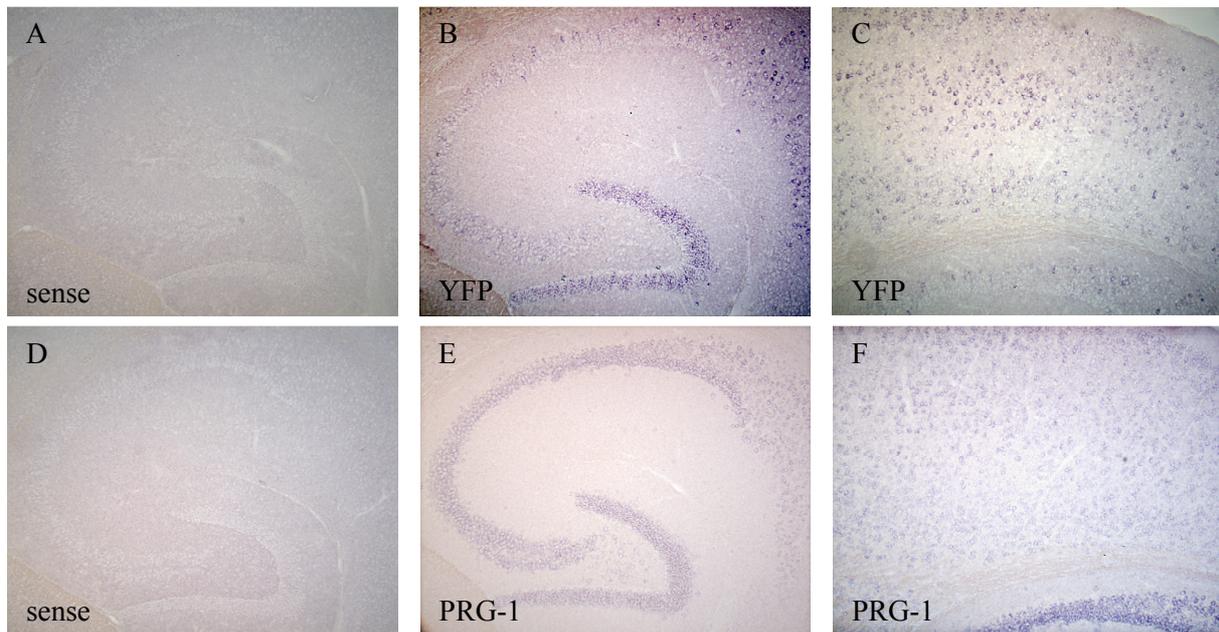


Abb. 13) *In situ* Hybridisierung der PRG-1-YFP-BAC Maus zum Nachweis der mRNS von YFP und PRG-1 mittels Digoxigenin markierter Sonden. A, D) Hippocampale Schnitte markiert mit Negativ-Kontrollsonden (sense). B, E) Hippocampale Schnitte markiert mit Sonden gegen YFP bzw. PRG-1. C, F) Kortikaler Schnitt markiert mit Sonde gegen YFP bzw. PRG-1.

3.1.5.2. Lokalisation des YFP Reporterproteins mittels Immunhistologie

Des Weiteren wurde die Lokalisation des YFP-Reporters in den drei erzeugten Linien untersucht (Abb. 14 A). Alle drei Linien zeigten ein identisches, rein neuronales Verteilungsmuster des Reporterproteins. Allerdings zeigten zwei der drei untersuchten Linien im heterozygoten Tier ein sehr schwaches Fluoreszenzsignal. Da die beiden Linien, die eine schwächere Fluoreszenz aufwiesen auch eine geringere Signalstärke im vorab durchgeführten Southern-Blot zeigten, könnte dies ein Hinweis auf die Anzahl der inserierten Kopien des Transgens sein.

Mittels Immunhistochemie konnte dargestellt werden, daß die mittels Antikörper fluoreszent markierten Dendriten PRG-1 exprimierender Neurone im Hippocampus, mit YFP-exprimierenden Somata korrespondierten (Abb. 14 B).

A

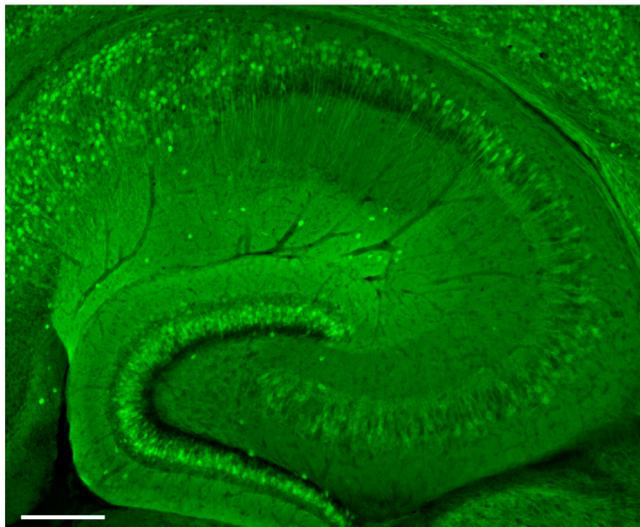


Abb. 14 A) PRG-1-YFP-BAC-Maus endogen exprimierte YFP-Fluoreszenz unter Kontrolle des nativen PRG-1 Promoters, Aufnahme adulter Hippocampus (P30), Axone und Somata von PRG-1 exprimierenden Neuronen sind durch YFP markiert (Maßstabsbalken 200 μm).

B

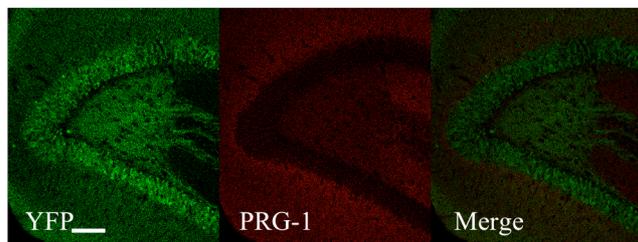


Abb. 14 B) Aufnahme adulter Gyrus dentatus: Die Dendriten PRG-1 exprimierender Neurone sind mittels eines PRG-1 Antikörper markiert. Die korrespondierenden Axone und Somata sind durch YFP-Expression markiert (Maßstabsbalken 100 μm).

Um die Expression des zytoplasmatischen Reporterproteins YFP einfacher mit der Expression des dendritisch lokalisierten PRG-1-Proteins zu vergleichen, wurde die PRG-1-YFP-Reportermaus mit der PRG-1-KO-Maus (Trimbuch et al., 2009) gekreuzt. Durch die in den PRG-1-Locus inserierte β -Gal-Expressionskassette der PRG-1-KO-Maus, konnte bei den heterozygoten Nachkommen dieser Kreuzung die Expression der zytoplasmatischen Proteine YFP und β -Galaktosidase verglichen werden. Mit Hilfe eines gegen β -Galaktosidase gerichteten Antikörpers mit nachfolgender Fluoreszenzmarkierung, wurde die YFP-Expression bei allen drei erzeugten Mauslinien untersucht, die übereinstimmende Ergebnisse lieferten (Abb. 15 A, B, C).

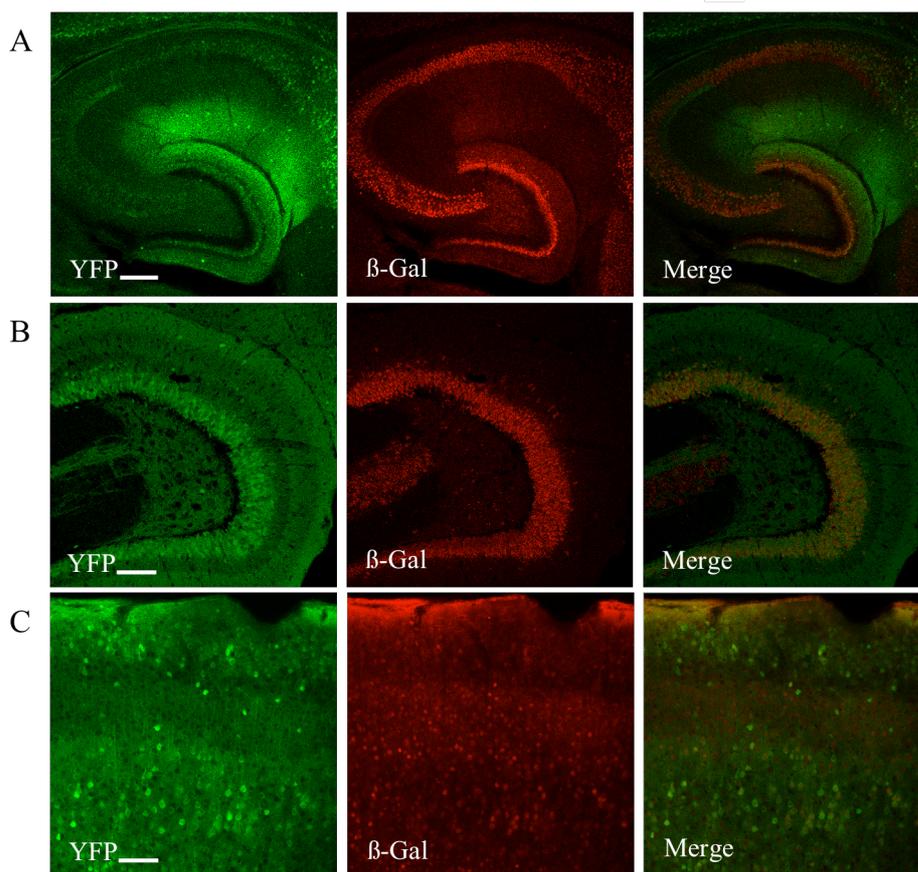


Abb. 15) Kolokalisationsstudien zum Nachweis der korrekten Reporterexpression in der PRG-1-YFP-BAC-Reportermaus. PRG-1-YFP-BAC-Mäuse wurden mit PRG-1-KO-Mäusen, die eine β -Galaktosidase-Reporterkassette in den KO-Locus tragen, gekreuzt. Die beiden zytoplasmatisch lokalisierten Reporter konnten bei den doppelt heterozygoten Nachkommen direkt verglichen werden.

A) Hippocampus einer adulten (P30) Prg-1-YFP-BAC x PRG-1KO Maus, β -Galaktosidase exprimierende Neurone wurden mittels Antikörper markiert (Maßstabsbalken 200 μ m).

B) Gyrus dentatus einer adulten (P30) Prg-1-YFP-BAC x PRG-1KO Maus, β -Galaktosidase exprimierende Neurone wurden mittels Antikörper markiert (Maßstabsbalken 100 μ m).

C) Kortex einer adulten (P30) Prg-1-YFP-BAC x PRG-1KO Maus, β -Galaktosidase exprimierende Neurone wurden mittels Antikörper markiert (Maßstabsbalken 300 μ m).

Im Hippocampus zeigte sich eine übereinstimmende Lokalisation beider Reporterproteine. Im Cortex zeigte sich übereinstimmend mit den detektierten Signalen der *in situ*-Hybridisierung eine geringere Menge YFP-exprimierender Neurone. Konfokale Aufnahmen dieser Neurone in stärkerer Vergrößerung, zeigten allerdings bei allen untersuchten Neuronen eine sehr geringe YFP-Expression. Es wurden keine Neurone gefunden, die lediglich YFP und nicht β -Galaktosidase exprimierten.

Im Anschluß wurden weitere Kolokalisationsstudien mit Antikörpern gegen die Proteine Calbindin, Parvalbumin und Calretinin durchgeführt (Abb. 16 A, B, C), um eine Fehlexpression des Reporterproteins auszuschließen. Es wurde keine Kolokalisation im

Hippocampus mit Parvalbumin und Calretinin positiven Neuronen festgestellt. Im Hippocampus wurde eine Kollokalisierung mit Calbindin exprimierenden Neuronen festgestellt. Diese Kollokalisationsstudien zeigen ebenfalls ein übereinstimmendes Expressionsprofil des Reporterproteins mit PRG-1. Auch hier konnte wie für PRG-1 beschrieben, keine Expression in GABAergen Interneuronen gezeigt werden. Das PRG-1-BAC Reportermausmodell zeigt eine korrekte PRG-1 spezifische Expression von YFP, obwohl in einigen Neuronen die Expression des Reporters an der Nachweisgrenze liegt oder fehlt, konnte keinerlei Mißexpression des Reporterproteins festgestellt werden.

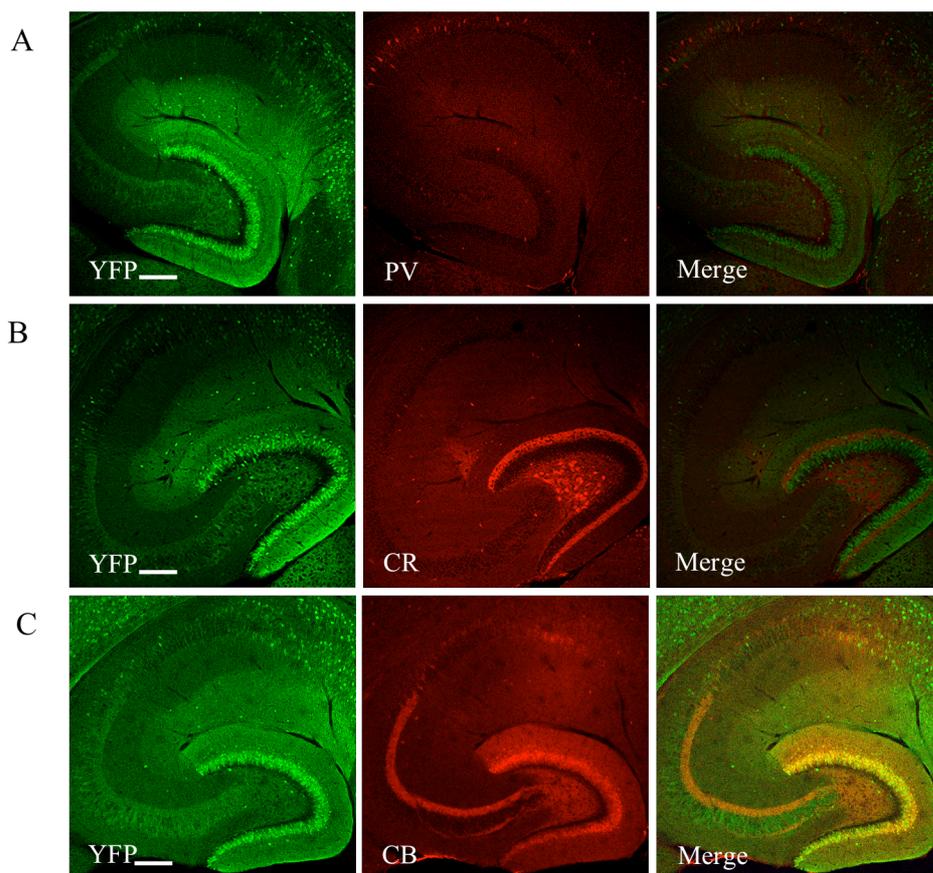


Abb. 16) Immunokolocalisationsstudien zur Bestätigung der korrekten Reporterexpression im Hippocampus der adulten PRG-1-YFP-BAC Maus (P30). A) Antikörpermarkierung mit Parvalbumin (PV), B) Antikörpermarkierung mit Calretinin (CR), C) Antikörpermarkierung mit Calbindin (CB).

3.2. PRG-1 Promotoranalyse

3.2.1. Ermittlung des Transkriptionsstartpunkts von PRG-1

3.2.1.1. „RNA Ligase mediated Rapid amplification of cDNA ends“ (RLM-RACE)-Analyse

Zur Ermittlung des Transkriptionsstartpunkts (TSS) von PRG-1 in Ratte (Wistar) und Maus

(C57/bl6) wurde eine RLM-RACE Analyse durchgeführt. Im Vergleich zur klassischen RACE-Analyse ist diese Methode auf den Nachweis unverkürzter Transkripte, die über eine 7-Methylguanodin-Kappe an ihren 5'-Ende verfügen, spezialisiert. Mit Hilfe des GeneRacer™-Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) wurden aus cDNS mit den Primern: GeneRacer 5'Primer, 3'-RatRace1, 3'-RatRace2, 3'-RatRace3, 3'-MausRace1, 3'-MausRace2, 3'-MausRace3 Amplifikate erzeugt, die den TSS von PRG-1 repräsentierten. In Ratte wie in Maus wurden multiple TSS detektiert (Abb. 17). Bezogen auf den Translationsstartpunkt ATG = +1 wurden in der Ratte TSS an den Positionen: -201, -160, -156, -96, +46, +69 gefunden. In der Maus wurden TSS an den Positionen: -149, -144, -101, +2, +43, +45, +71 und +79 gefunden. In Säugetiersequenzen von *prgl* ist ein zweiter potentieller Translationsstartpunkt konserviert; in Ratte und Maus an Position +148, beim Menschen an Position +145. Einige TSS in Ratte wie in Maus, lagen hinter dem ersten Translationsstartpunkt von PRG-1. Ob der zweite Translationstartpunkt dieser Transkripte genutzt wird, muß noch bestätigt werden.

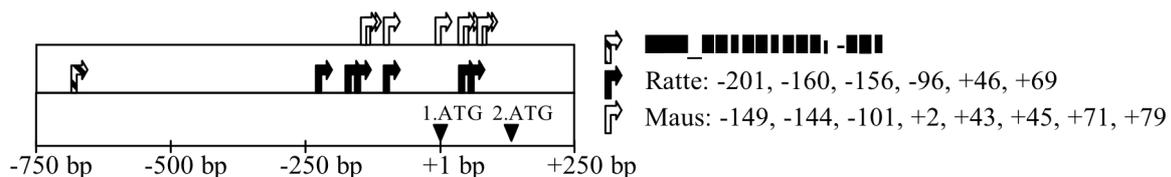


Abb. 17) PRG-1 wird von multiplen Transkriptionsstartpunkten (TSS) in Ratte und Maus transkribiert. Schwarze Pfeile zeigen die ermittelten TSS in der Ratte, weiße Pfeile zeigen die TSS in der Maus. Die Benennung bezieht sich auf die Position des TSS bezüglich des Translationsstartpunkts (ATG=1) von *prgl*. Ein vorab experimentell ermittelter TSS (NM_001001508, gestreifter Pfeil) in der Ratte wurde dieser Abbildung beigegefügt.

3.2.1.2. PCR-Analyse muriner cDNS

Ursprünglich wurde in unserer Arbeitsgruppe ein weiterer Transkriptionsstartpunkt (TSS) in der Ratte ermittelt (NM_001001508). Dieses Transkript oder die Transkripte ähnlicher stromaufwärts Ausdehnung bezüglich des Translationsstartpunkts, konnten mittels RLM-RACE nicht detektiert werden. Daher wurde im Anschluß eine PCR-Analyse muriner cDNS durchgeführt, um den ursprünglich ermittelten TSS zu bestätigen. Mit folgenden Primerkombinationen: m1= M- 119fw/M+222rev; m2= M- 240fw/M+222rev; m3= M- 509fw/M+222rev (Abb. 18 A), erfolgte der Nachweis von murinen Transkripten, die vergleichbar weit vom Translationsstartpunkt entfernt waren, wie der ursprünglich ermittelte TSS in der Ratte (Abb. 18 B, eine von fünf unabhängigen PCR-Analysen abgebildet). Die Benennung der Primerkombinationen entspricht ihrer Entfernung zum Translationsstartpunkt

(ATG) in der Maus. Die PCR-Analyse bestätigte die Existenz von Transkripten in der Maus, die von TSS initiiert wurden, welche vergleichbar weit vom Translationsstartpunkt entfernt waren, wie der ursprünglich ermittelte TSS in der Ratte. Die Menge der Transkripte nahm proportional zu ihrer Entfernung vom Translationstartpunkt ab. Die Mehrheit der Amplifikate wurde mit der Primerkombination m1 erzeugt. Dies könnte als Hinweis darauf gedeutet werden, dass in dieser Region die meisten Transkripte initiiert werden. Amplifikation mit genomischer DNS (gDNS) als Matrize zeigen, dass die Unterschiede in der Menge erzeugter Amplifikate mit cDNS als Matrize kein Resultat unterschiedlicher PCR-Effizienzen der verwendeten Primerkombinationen ist.

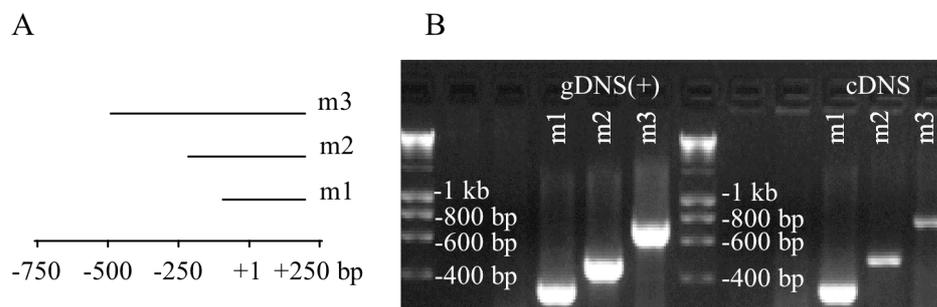


Abb. 18) PCR-Analyse zum Nachweis von Transkripten, die stromaufwärts der ermittelten Transkriptionsstartpunkte liegen. Transkripte, vergleichbarer Länge, wie das zuerst in der Ratte detektierte Transkript (NM_001001508) konnten via PCR bestätigt werden. A) Schematische Darstellung der Lage der erzeugten Amplifikate mit den Primerkombinationen m1, m2 und m3 bezogen auf den Translationsstartpunkt ($\underline{A}TG=1$) von PRG-1. B) Erzeugte Amplifikate aus cDNS und gDNS (Negativ-Kontrolle).

3.2.2. Ermittlung von Regionen mit transkriptionsstimulierender Aktivität in der Promotorregion von PRG-1

Zur Bestimmung der Aktivität von Promotorfragmenten wurden Dual-Luziferase-Assays durchgeführt. Primärzellen (Neurone, Astrozyten) und eine nicht neuronale Zelllinie (HEK293, humane embryonale Nierenzelllinie) wurden mit den erzeugten Reporterplasmiden und dem Plasmid pHRLTK (Promega) in einem festgelegten Verhältnis kotransfiziert. Das auf den Reporterplasmiden vorhandene „Firefly“-Luziferasegen aus *Photinus pyralis* kodiert für ein Enzym, welches Luciferin, unter Zugabe von ATP, O_2 und Mg^{2+} in Oxyluciferin umwandelt und ein luminiszendes Signal erzeugt. Das „Renilla“-Luziferasegen auf pHRLTK aus *Renilla reniformis* kodiert für ein Enzym, daß unter Zugabe von O_2 die Umwandlung von Coelenterazine in Coelenteramide katalysiert, wobei ebenfalls ein luminiszendes Signal erzeugt wird. Durch die Messung der Reaktion zweier Reporterenzyme in einem experimentellen Ansatz können experimentell bedingte Unterschiede (z. B. Transfektionseffizienz, Zell-Lyse-Effizienz, Pipettierfehler) normalisiert werden.

3.2.2.1. Klonierung von Promoter-Deletionskonstrukten

Promotor-Deletionskonstrukte wurden aus genomischer Maus-DNS (C57/bl6) amplifiziert. Benötigte Schnittstellen für die nachfolgende Subklonierung wurden den genspezifischen Primersequenzen angefügt. Danach wurden die Fragmente in den Vektor pGL3 subkloniert. Die subklonierten Fragmente dienten als Promotorsequenzen für die in pGL3 kodierte Fireflyluciferase. Die Benennung der nachfolgend erzeugten Plasmide (pGL3m-160/+145, pGL3m-297/+145, pGL3m-1724/+39, pGL3m-1724/+39, pGL3m-1724/+145, pGL3m-1724/+145rev) bezieht sich auf die Lage der inserierten Sequenz, bezogen auf den Translationsstartpunkt von PRG-1 in der Maus (ATG =1), der Anhang -rev benennt eine reverse Insertion bezüglich des Reportergens.

3.2.2.2. Dual-Luziferase-Assays (DLR) in primären Rattenzellen mit humanen Promoter-Deletionskonstrukten

Primäre Neurone und Astrozyten aus der Ratte wurden mit humanen Promoter-Deletionskonstrukten transfiziert. Die humanen pGL3 Promoter-Deletionskonstrukte wurden freundlicherweise von Pierluca Coiro (Charite, Berlin) zur Verfügung gestellt. Die Benennung der Plasmide bezieht sich auf die Lage der inserierten Sequenz, bezogen auf den Translationsstartpunkt von PRG-1 (ATG =1). Der Anhang rev benennt eine reverse Insertion bezüglich des Reportergens. Die ermittelten Werte aller Transfektionen stellen den Mittelwert aus mind. drei unabhängigen Experimenten dar. Ermittelte Werte wurden als Vielfaches der Werte von Transfektionen mit dem Leervektor pGL3=1 dargestellt (Abb. 19).

Ein Konstrukt aus der humanen Promotorregion, dass sich von -300 bp bis +143 bp bezogen auf den Translationsstartpunkt von PRG-1 erstreckt, vermittelte eine über 40-fache spezifische Aktivierung der Transkription in primären Rattenneuronen im Vergleich zum Leervektor. Wurde dieser 450 bp Minimalpromotor auf eine 300 bp Sequenz verkürzt (von -169 bis +143), so reduzierte sich die neuronale Aktivierung um 50 % auf das Niveau der Aktivierung in primären Astrozyten. Wurde die 300 bp Sequenz in umgekehrter Orientierung transfiziert, so verschwand die Aktivierung fast vollständig. Ein weiteres Konstrukt, daß sich von -1803 bis +143 bezüglich des Translationsstartpunkts erstreckt, vermittelt eine sechsfache Stimulierung der Transkription

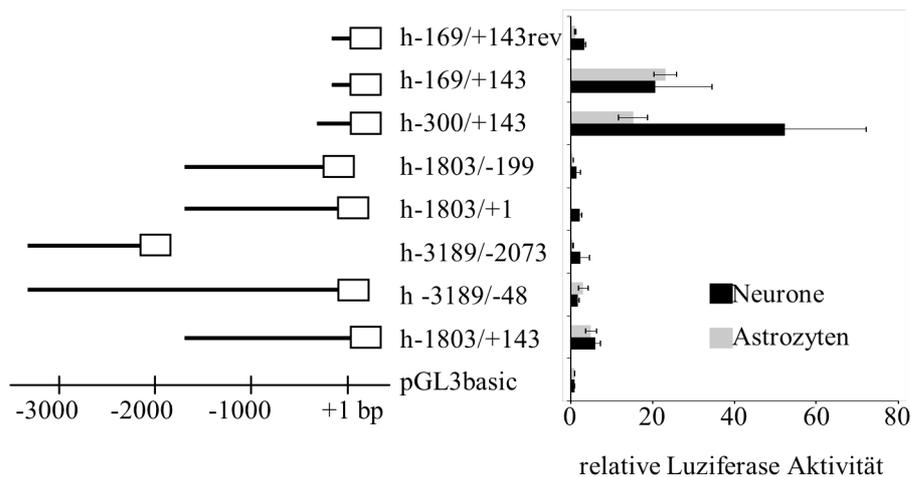


Abb. 19) Relative Luciferase Aktivität humaner PRG-1 Promoter-Deletionskonstrukte in primären Rattenneuronen bzw. Astrozyten. Humane PRG-1 Promoter-Deletionskonstrukte wurden in den Fireflyluciferase-Reportervektor pGL3 kloniert und mit dem Renillaluciferase-Reportervektor pHRLTK kotransfiziert. Die relative Luciferaseaktivität ist als Verhältnis der Firefly- zur Renillaluminiszenz angegeben. Die Luciferaseaktivität mit Leervektor (pGL3) transfizierter Zellen wurde auf 1 festgelegt. Parallel zu ihrer Aktivität ist die Lage der transfizierten Fragmente, bezogen auf den Translationsstartpunkt ($\underline{A}TG=1$) des humanen PRG-1 Promoters dargestellt.

3.2.2.3. Dual-Luciferase-Assays in primären Mauszellen mit murinen Promoter-Deletionskonstrukten

Zur Bestätigung der spezifischen Aktivierung des 450 bp Minimalpromoters, der in einem heterologen System identifiziert wurde, wurden die entsprechenden homologen Sequenzabschnitte aus dem PRG-1 Mauspromoter kloniert und in Dual-Luciferase-Assays mit transfizierten primären Mauszellen getestet. Der murine Minimalpromoter induzierte im homologen System die gleiche mehr als 40-fache Aktivierung der Transkription in Neuronen im Vergleich zum Leervektor (pGL3basic). Auch hier reduzierte eine Verkürzung der Sequenz auf 300 bp (von -160 bis +145) die spezifische neuronale Aktivierung auf 50 %. Die Transfektion weiterer Konstrukte führte nicht zur Identifizierung eines Sequenzabschnittes mit ähnlich aktivierenden Eigenschaften. Ein weiteres Konstrukt, das sich von -1724 bis +145 bezüglich des Translationsstartpunkts erstreckt, vermittelte eine fünffache Stimulierung der Transkription (Abb. 20).

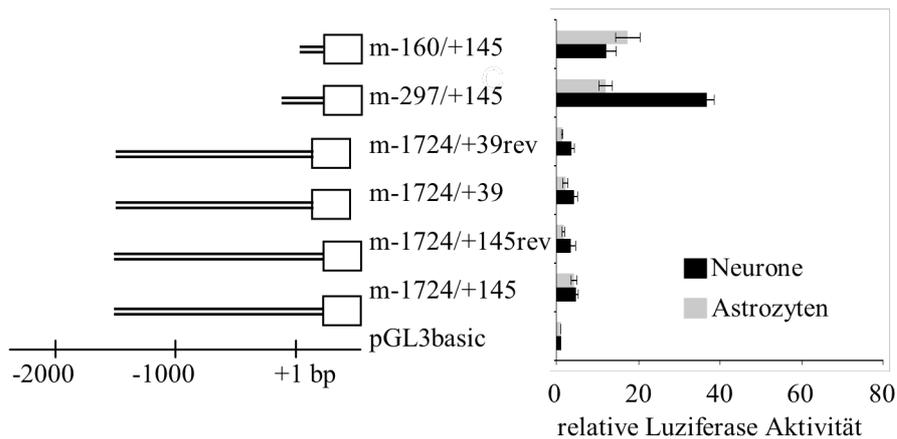


Abb. 20) Relative Luziferase Aktivität muriner PRG-1 Promoter-Deletionskonstrukte in primären Mausneuronen bzw. Astrozyten. Murine PRG-1 Promoter-Deletionskonstrukte wurden in den Fireflyluziferase-Reportervektor pGL3 kloniert und mit dem Renillaluziferase-Reportervektor pHRLTK kotransfiziert. Die relative Luziferaseaktivität ist als Verhältnis der Firefly- zur Renillaluminiszenz angegeben. Die Luziferaseaktivität mit Leervektor (pGL3) transfizierten Zellen wurde auf 1 festgelegt. Parallel zu ihrer Aktivität ist die Lage der transfizierten Fragmente bezogen auf den Translationsstartpunkt (ATG=1) des murinen PRG-1 Promoters dargestellt.

3.2.2.4. Neuronale Expression von GFP mediiert durch den identifizierten Minimalpromoter in organotypischen Slice-Kulturen

Die Funktionalität des identifizierten Minimalpromotors wurde unter *in vivo* Konditionen getestet. Ein Promoter-GFP-Reporterkonstrukt wurde in organotypische Slice-Kulturen fünf Tage alter Mäuse (P5) elektroporiert. Zur Herstellung des Minimalpromoter-GFP-Reporterkonstrukts wurde aus dem in den Dual-Luziferase-Assays verwendeten Vektor pGL3/-m-297/+145, die Luziferasesequenz mittels der Restriktionsendonukleasen HindIII und XbaI ausgeschnitten. Die Sequenz von GFP wurde mittels PCR aus dem Vektor pEGFP-N1 als Matrize, unter Verwendung der Primer sliceGFPfw/sliceGFPprev, die mit passenden Überhängen für die Klonierung zum Promoter-GFP-Reporterkonstrukt ausgestattet waren, amplifiziert. Herstellung, Kultivierung und Elektroporation der Slice-Kulturen wurden von Brita Vorwerk (Charite, Berlin) durchgeführt.

Nach zweitägiger Inkubation wurden die Slices fixiert und 100 µm Schnitte für die danach folgende immunhistochemische Analysen angefertigt (Abb. 21). Durch Markierung mittels eines Antikörpers gegen GFP wurde die Funktionalität des elektroporierten Minimalpromotors dokumentiert. Durch Komarkierung des GFP-Signals mit einem NeuN-Antikörper konnte gezeigt werden, daß der Minimalpromotor in Neuronen funktionell ist.

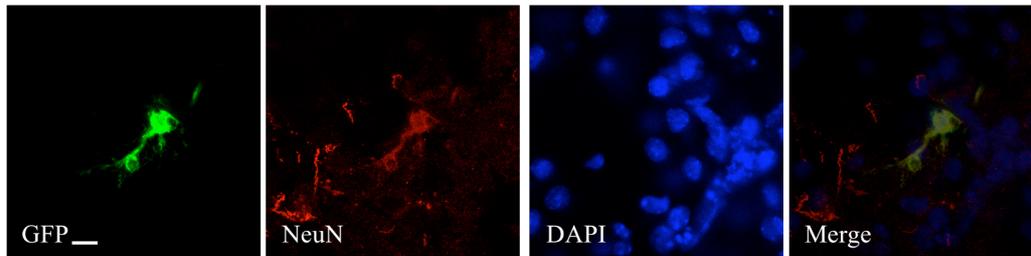


Abb. 21) Funktionelle Analyse des identifizierten Minimalpromoters. Hippokampale Slice-Kulturen wurden mit einem Minimalpromoter-GFP-Reporterkonstrukt elektroporiert. Antikörperkomarkierungen von GFP mit NeuN dokumentieren die Funktionalität des Minimalpromoters in Neuronen (Maßstabsbalken 10 µm).

3.2.2.5. Identifizierung von DNS-Proteinkomplexen auf Sequenzabschnitten des identifizierten Minimalpromoters

Zur weiteren Analyse des identifizierten Minimalpromoters wurden „electrophoretic mobility shift assays“ (EMSA) durchgeführt. Hierbei konzentrierten wir uns auf die ersten 150 bp der Minimalpromotersequenz, da in den Dual-Luziferase-Assays kultivierter Primärzellen eine Abnahme der spezifischen Transkriptionsstimulation in primären Neuronen nach Subtraktion dieses Sequenzabschnittes gezeigt werden konnte. Die homologe Sequenz des Minimalpromoters aus Ratte wurde in fünf Abschnitte unterteilt und überlappende, komplementäre, Oligonukleotide wurden radioaktiv markiert und nachfolgend in Bindungsreaktionen mit Kernextrakten aus primären kultivierten Neuronen von Ratten eingesetzt (Abb. 22 A). Um die Spezifität der DNS-Proteinkomplexe zu bestätigen, wurden Bindungsreaktionen unter Zusatz eines 100-fachen Überschusses des jeweils unmarkierten doppelsträngigen Oligonukleotides durchgeführt. Es wurden nur solche Bindungen als spezifisch gewertet, welche sich kompetetieren ließen. Mit den Oligonukleotiden EMSA1, EMSA3 und EMSA5 konnten DNS-Proteinkomplexe nachgewiesen werden. Zur Identifizierung von Transkriptionsfaktoren, die an diese Sequenzabschnitte binden, wurden mittels der Analysesoftware AliBaba2.1, die homologen Sequenzen von Ratte, Maus und Mensch verglichen. Für die Oligonukleotide EMSA1 und EMSA3 wurden übereinstimmend in allen homologen Sequenzen Bindungsstellen für Sp1 gefunden. Für das Oligonukleotid EMSA3 konnte ein CRE „cAMP responsive binding element“-Bindungsort nachgewiesen werden. Zum Nachweis, ob sich die identifizierten DNS-Proteinkomplexe aus den vorbezeichneten Proteinen und den angebotenen Sequenzen zusammensetzten, wurden erneut Bindungsstudien durchgeführt und parallel zu den unmarkierten doppelsträngigen Oligonukleotiden der angebotenen Sequenzen wurde die Bindung mit unmarkierten doppelsträngigen Oligonukleotiden der Konsensussequenzen von SP1 (für die Sonden EMSA1 und EMSA5) und CREB „cAMP responsive binding element binding protein“ (für

die Sonde EMSA3) kompetetiert (Abb. 22 B). Alle identifizierten DNS-Proteinkomplexe konnten mit den angebotenen Konsensusoligonukleotiden kompetetiert werden, was auf spezifische DNS-Proteinbindungen hindeutet.

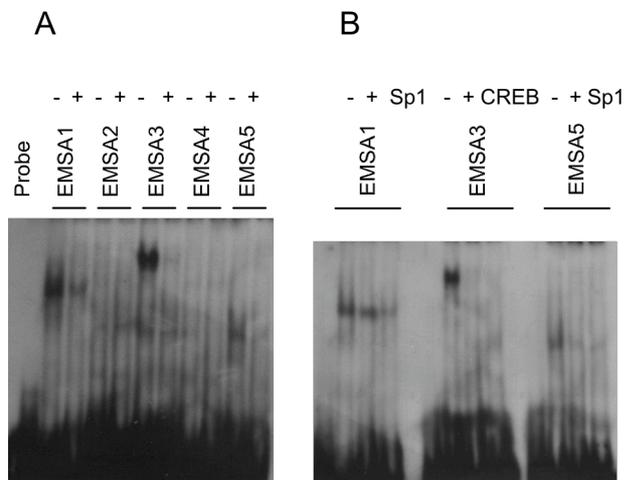


Abb.22) Detektion von DNS-Proteinkomplexen via EMSA. A) Nachweis von DNS-Proteinkomplexen auf den stromaufwärts liegenden 150 bp des identifizierten Minimalpromoters mittels überlappender radioaktiv markierter Oligonukleotide (-). Lediglich jene Komplexe, welche sich durch 100-fachen Überschuß unmarkierter Oligonukleotide kompetetieren (+) ließen, wurden als spezifisch gewertet. B) Kompetetion der identifizierten DNS-Proteinkomplexe mit Oligonukleotiden gegen die Konsensussequenzen von Sp1 und CREB, deren Bindungstellen auf den entsprechenden Sonden via *in silico* Analyse nachgewiesen wurden.

3.2.3. Einfluß des Transkriptionsfaktors Nex1 (Math2/NeuroD6) auf die Transkription von PRG-1

Die aktivierende Wirkung von Nex1 auf die Transkription von PRG-1 wurde im Rahmen der Untersuchung anderer Bereiche der Promotorregion von *prg1* gezeigt (Yamada et al., 2008). Zur Untersuchung von Nex1-vermittelten Effekten wurden alle Promotor-Deletionskonstrukte, die in dieser Studie verwendet wurden, mit einem Nex1-Expressionsvektor oder der Leervektorkontrolle in HEK 293 Zellen transfiziert.

3.2.3.1. Klonierung Nex1-Expressionsvektor und Kontrollvektoren

Zur Erzeugung des Nex1-Expressionsvektor wurde die kodierende Sequenz von Nex1 mittels der Primer Nex-1fw/Nex-1rev aus cDNS (Maus C57/bl6) amplifiziert.

In der vorbezeichneten Studie (Yamada et al., 2008) wurde eine Sequenz aus der PRG-1-Promoterregion der Ratte identifiziert, in der die Bindung von Nex1 an ein E-Box-Motiv mittels Chromatinimmunpräzipitation gezeigt werden konnte. Die Sequenz, welche die stärkste Nex-1 abhängige Stimulation vermittelt (r-1269/-582, Lage der Sequenz bezogen auf

den Translationsstartpunkt von PRG-1 in Ratte) wurde als Kontrolle in pGL3 subkloniert. Ebenso wurden die homologen Regionen der murinen und humanen Sequenz (m-1300/-613, h-1399/-613) in pGL3 subkloniert.

3.2.3.2. Dual-Luziferase-Assays von PRG-1 Promotor- Deletionskonstrukten unter Nex1 Einfluß in HEK 293-Zellen

In HEK293-Zellen konnte bei allen transfizierten Promotor-Deletionskonstrukten nach Kotransfektion des Nex1-Expressionsvektors eine Stimulation der Transkription (Yamada et al., 2008) gezeigt werden (Abb. 23). Im Unterschied zu den Experimenten in Primärzellen zeigt in HEK293-Zellen das 300 bp Promotor-Deletionskonstrukt die stärkste transkriptionelle Aktivierung und nicht der 450 bp Minimalpromoter. Interessanterweise enthält die 300 bp Sequenz kein funktionelles E-Box Motiv, welches die Nex1 abhängige Stimulierung vermitteln könnte. Die Kontrollsequenz aus der Ratte, die in der vorbezeichneten Studie die stärkste Aktivierung hervorrief, zeigte nach Subklonierung in den Vektor pGL3 die gleiche transkriptionelle Aktivierung nach Nex1 Kotransfektion, wie in der publizierten Studie, in welcher die Sequenz in dem Vektor pGL4 verwendet wurde. Die homologen murinen und humanen Sequenzen zeigen ein ähnliches Ausmaß an transkriptioneller Stimulation. Interessanterweise ist das E-Box-Motiv in der humanen Sequenz hinsichtlich seiner Lage nicht konserviert (Abb. 24).

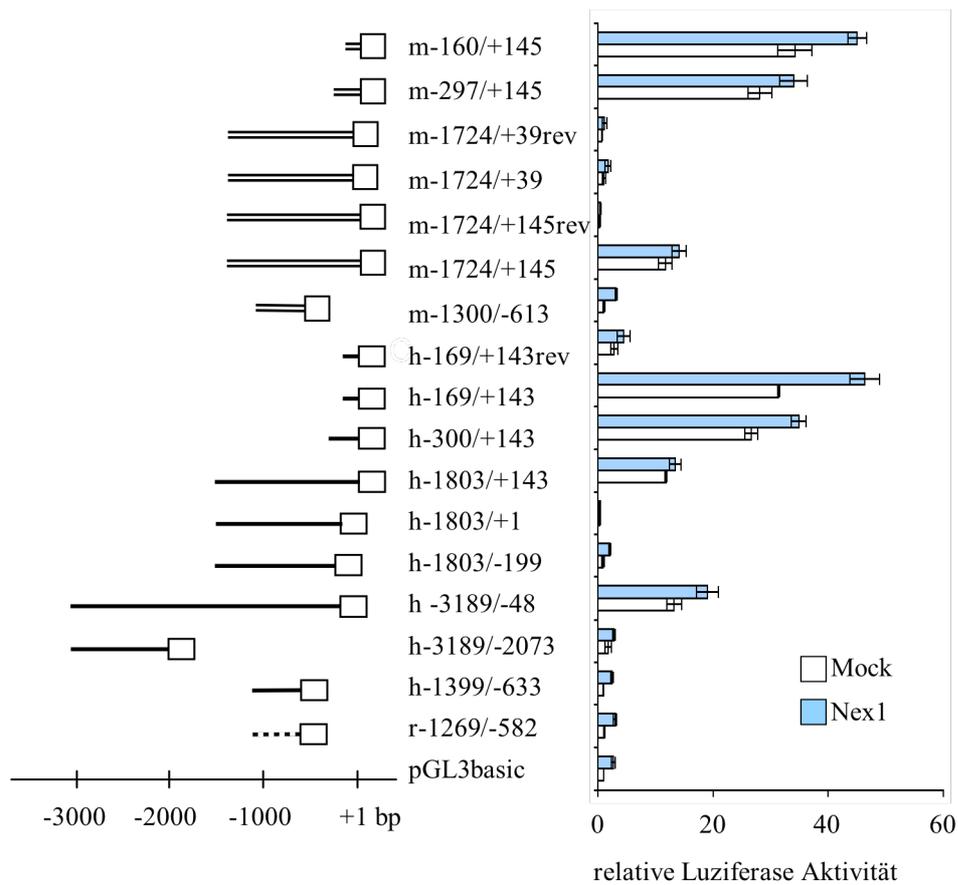


Abb. 23) Relative Luziferase Aktivität von PRG-1 Promoter-Deletionskonstrukten in HEK293-Zellen. Alle PRG-1 Promoter-Deletionskonstrukte wurden mit dem Renillaluziferase-Reportervektor pHRLTK, sowie einem Nex1-Expressionsvektor (bzw. Leervektor) kotransfiziert. Die relative Luziferaseaktivität ist als Verhältnis der Firefly- zur Renillaluminiszenz angegeben. Die Luziferaseaktivität mit Leervektor (pGL3) transfizierter Zellen wurde auf 1 festgelegt. Parallel zu ihrer Aktivität ist die Lage der transfizierten Fragmente bezogen auf den Translationsstartpunkt (ATG=1), des jeweiligen PRG-1 Promoters dargestellt.



Abb. 24) E-Box Konsensussequenzen, die im Nager eine Nex-1 abhängige Transkriptionsaktivierung medieren sind in der humanen Sequenz nicht konserviert. Vergleich der E-Box-Elemente in Ratten, Maus und humaner PRG-1 Promotorsequenzen mittels multipler Sequenz Anlagerung (ClustalW). Die E-Box Konsensussequenz (CANNTG) ist nicht konserviert in der humanen Sequenz. Die Benennung der E-Boxen (-E4/-E3/-E2/-E1/+E1/+E2) erfolgt nach (Yamada et al., 2008).

3.2.3.3. Dual-Luziferase-Assays von PRG-1 Promotor-Deletionskonstrukten unter Nex1-Einfluß in Neuronen

Zur Analyse des Einflusses von Nex1 auf den identifizierten Minimalpromotor und das 300 bp Promotor-Deletionskonstrukt wurden die Konstrukte mit dem Nex1-Expressionsvektor in primäre Neuronen kotransfiziert. Ein leichter, aber nicht signifikanter Anstieg, der Transkription nach Nex1 Transfektion konnte in primären Neuronen dokumentiert werden.

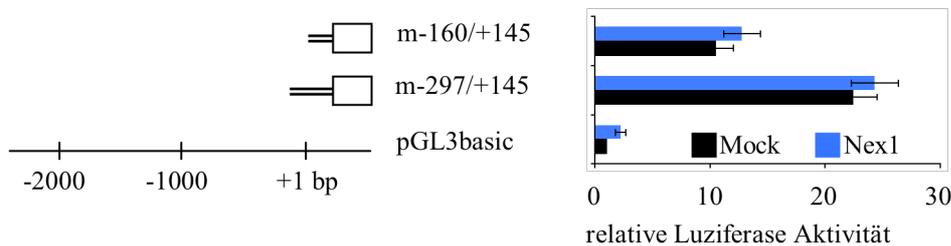


Abb. 25) Relative Luziferase Aktivität von murinen PRG-1 Promotor-Deletionskonstrukten in primären Mausneuronen. Die PRG-1 Promotor-Deletionskonstrukte wurden mit dem Renillaluziferase-Reportervektor pHRLTK, sowie einem Nex1-Expressionsvektor (bzw. Leervektor) kotransfiziert. Die relative Luziferaseaktivität ist als Verhältnis der Firefly- zur Renillaluminiszenz angegeben. Die Luziferaseaktivität mit Leervektor (pGL3) transfizierter Zellen wurde auf 1 festgelegt. Parallel zu ihrer Aktivität ist die Lage der transfizierten Fragmente bezogen auf den Translationsstartpunkt (ATG=1), des jeweiligen PRG-1 Promoters dargestellt.

3.3. Auswirkungen der Nex1 Defizienz auf die PRG-1 Protein Synthese

Zur weiteren Untersuchung des Einflusses von Nex1 auf die Expression von PRG-1 wurden Menge und Lokalisation von PRG-1 in Nex1 defizienten Mausmodellen untersucht.

3.3.1. Western-Blot Analyse von Nex1-KO-Mäusen

Mittels Western-Blot Analyse wurde die Menge des vorhandenen PRG-1 Proteins in Gesamthirnhomogenaten von Nex1 „Knock-out“ und Wildtypmäusen (C57/bl6) verglichen. Es konnte kein Unterschied bezüglich der PRG-1 Proteinmenge in adulten Mäusen festgestellt werden. Bei 15 Tage alten Nex1 defizienten Mäusen konnte zum Zeitpunkt der maximalen PRG-1 Expression ebenfalls keine Veränderung der PRG-1 Proteinmenge dokumentiert werden. Zusätzlich wurde mittels Western-Blot Analyse zum Ausschluß von Feedbackregulationsmechanismen die Menge des exprimierten Nex1 Proteins in PRG-1 KO-Mäusen untersucht. In adulten Mäusen konnte kein Unterschied bezüglich der Nex1 Expression festgestellt werden.

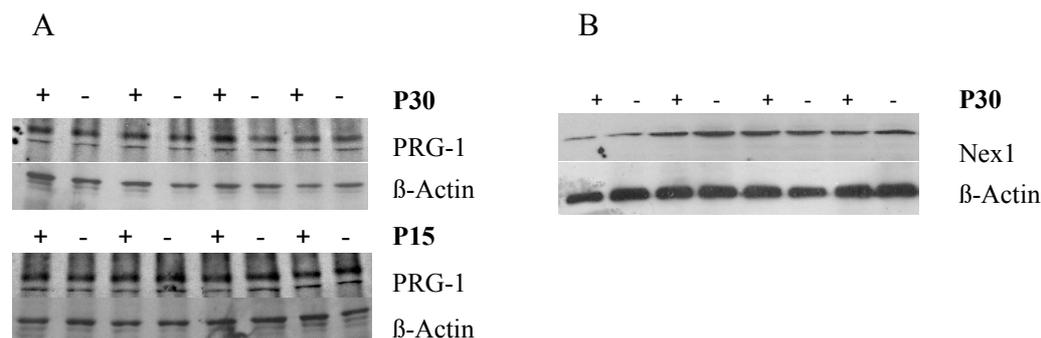


Abb. 26), A) Western Blot Analyse von Nex1 KO-Mäusen (-) und Kontrollen. Keine veränderte PRG-1 Expression ist detektierbar, weder im adulten Tier (P30) noch zum Zeitpunkt des Expressionsmaximums (P15). B) Western Blot Analyse von PRG-1 KO-Mäusen (-) und Kontrollen. Keine Veränderung der Nex1 Proteinmenge ist im adulten Tier (P30) detektierbar. Immunreaktionen mit dem β Aktin-Antikörper sind als Beladungskontrolle dargestellt.

3.3.2. Untersuchungen zur Lokalisationen von PRG-1 in Nex1-KO-Mäusen

Durch Nex1 Defizienz evt. veränderte Lokalisationen von PRG-1 wurden immunhistologisch untersucht. Nex1 KO- Maus Gehirnschnitte wurden mit dem PRG-1 Antikörper markiert und mit WT-Schnitten verglichen (Daten nicht gezeigt). Es konnte kein Unterschied der rein dendritischen Lokalisation des Proteins bei adulten Mäusen (P30) festgestellt werden. Um die Anzahl und Position der PRG-1 exprimierenden neuronalen Somata und Axone zu vergleichen, wurden Nex1 KO-Mäuse mit der PRG-1-YFP-BAC-Reportermauslinie gekreuzt und im Anschluß wurden YPF positive Nex1-KO-Nachkommen und WT-Geschwister

analysiert. Anzahl und Position des Reporters YFP sind unverändert in PRG-1-YFP-BAC-Mäusen im Vergleich zu PRG-1-YFP-BAC-Nex1-KO-Mäusen (Abb. 27).

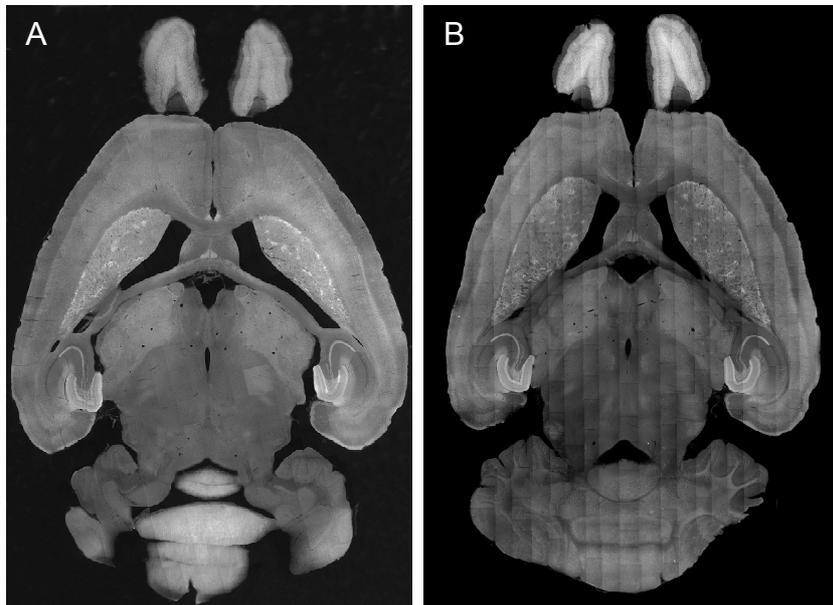


Abb. 27)

Unveränderte Lokalisation des Reporters YFP in Nex1 defizienten PRG-1-YFP-BAC-Mäusen.

PRG-1-YFP-BAC-Nex1-KO

Mäuse (A) zeigen ein unverändertes Expressionsmuster des Reportergen zu PRG-1-YFP-BAC-Kontrollen (B).

3.4. Generierung polyklonaler Peptidantikörper gegen PRG-1 und PRG-2

Im Rahmen dieser Arbeit wurden jeweils zwei Peptidantikörper gegen den intrazellulären C-Terminus von PRG-1 und PRG-2 erzeugt.

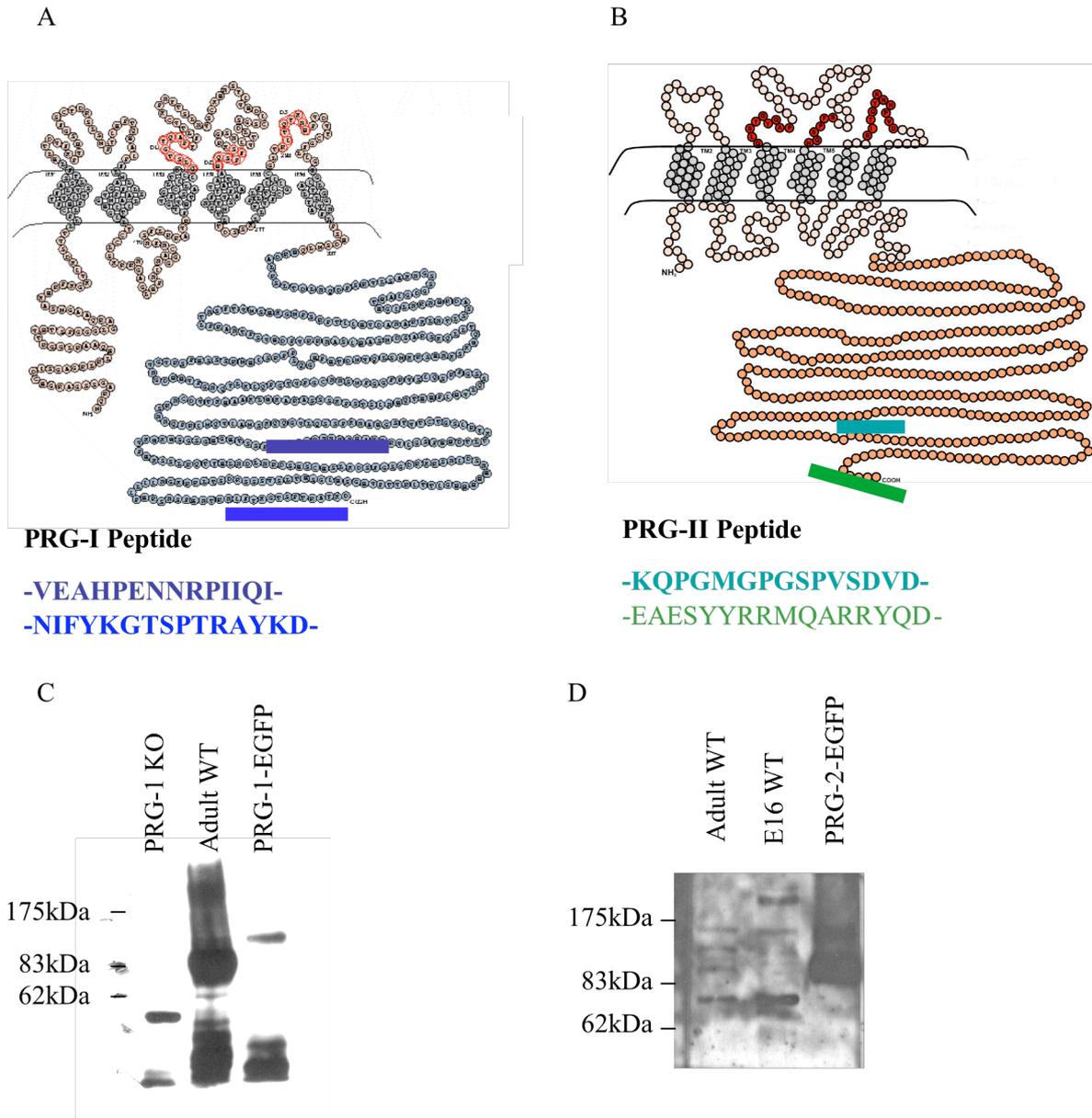
3.4.1. Epitopauswahl

Laut Vorgabe sollten die zu gewinnenden polyklonalen Antipeptid-Antikörper spezifisch gegen die jeweilige gewählte PRG-Sequenz gerichtet sein. Mittels des Sequenzvergleichsprogramms MultAlign wurden homologe Bereiche von PRG-1 und PRG-2 identifiziert. Da die Peptidsequenzen der zu generierenden Antikörper nicht inmitten möglicher Phosphorylierungs- und Glykosylierungsdomänen liegen sollten, wurden diese mittels NetPhos 2.0 und NetNGlyc 1.0 identifiziert und Epitope in diesen Bereichen von der Auswahl ausgeschlossen. Zur Antipeptid-Antikörpererzeugung wurden nachfolgende Peptidsequenzen ausgewählt (Abb. 28 A, B).

PRG-1	-VEAHPENNRPIIQI-
PRG-1	-NIFYKGTSPTRAYKD-
PRG-2	-KQPGMGPGSPVSDVD-
PRG-2	-EAESYYRRMQARRYQD-

Peptidsynthese- und Konjugation sowie Immunisierung und Serenentnahme wurde von Pineda-Antikörperservice (Berlin) durchgeführt. Jeweils drei Kaninchen wurden pro Peptidsequenz immunisiert.

Jeden Monat wurden entnommene Seren aliquots mittels Western Blot getestet. Nach circa sechs Monaten zeigte sich bei allen Seren ein spezifisches Signal sowohl in Zelllysaten transfizierter HEK293-Zellen mit den jeweiligen rekombinaten Proteinen, als auch in Maushirnhomogenaten. Die PRG-1 Seren wurden auf adulten WT und PRG-1-KO-Homogenaten getestet (Abb. 28 C). In Ermangelung einer PRG-2-KO Maus wurden zur Serentestung embryonale (E16) und adulte WT Homogenate verwendet (Abb. 28 D). Die erzeugten Antikörper wurden bezüglich ihrer Eignung für Immunpräzipitationsstudien (IP) getestet, für nachfolgende PRG-1 IP's wurde aufgereinigtes Serum eines mit dem Peptid NIFYKGTSPTRAYKD- immunisierten Kaninchens verwendet. Zum Zeitpunkt der Ausblutung zeigten alle PRG-1 Seren eine Bande in der korrekten Höhe bei 83 kDa und alle PRG-2 Seren detektierten eine Bande auf Höhe von 78 kDa, die der Größe von PRG-2 entsprach.

**Abb. 28)**

A) Übersicht der zur PRG-1 Antikörpererzeugung ausgewählten Epitope, die Lage der Epitope wurde auf die PRG-1-Proteinstruktur projiziert. B) Übersicht der zur PRG-2 Antikörpererzeugung ausgewählten Epitope, die Lage der Epitope wurde auf die PRG-2-Proteinstruktur projiziert. C) Exemplarischer Westernblot zur Serentestung der PRG-1 Antikörper. D) Exemplarischer Westernblot zur Serentestung der PRG-2 Antikörper.

3.5. Suche nach möglichen Interaktionspartnern von PRG-1

Im Rahmen dieser Studie sollten intrazelluläre Interaktionspartner des C-Terminus von PRG-1 identifiziert werden. Hierbei konzentrierten wir uns auf nichthomologe Bereiche des C-Terminus zur restlichen PRG-Familie (Aminosäure 331-766).

3.5.1. Two-Hybrid-Screen

Es wurde ein Two-Hybrid-Screen mit den vorbezeichneten Anteilen des C-Terminus von PRG-1 als Köder durchgeführt. Die korrespondierende cDNS von PRG-1, welche 435 Aminosäuren kodiert, wurde in den Vektor pGBT9 subkloniert, um ein Fusionsprotein mit der GAL4-DNS-Bindungsdomäne zu erzeugen. Nachfolgend wurde der Vektor pGBT9-ΔN-Cterm-PRG-1 vom „Yeast Two-Hybrid Screening Service at DKFZ“ mit einer adulten Maus cDNS-Bibliothek in dem Vektor pGAD/7 (Clontech, Matchmaker) kotransformiert. Positive Klone wurden im Anschluß identifiziert. Mit hoher Signifikanz wurde N-Ethylmaleimide Sensitive Fusion Protein (NSF) als möglicher Interaktionspartner für den cytoplasmatischen C-terminalen Anteil von PRG-1 identifiziert.

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
Bait	Prey gene symbol	number of times this prey has been isolated.	number of times the fragment starts in the 5' UTR	number of times the fragment starts in the coding sequence	number of times the fragment starts in the 3' UTR	average number of bases of the 5UTR that are part of the hybrid prey protein	Prey promiscuity	Description	Link to genes	Number of different screens in which this pair has been found
D3Bwg0562e	Nsf	18	15	3	0	33	2	N-ethylmaleimide sensitive fusion protein	18195	1
Uncertain interactors: Preys that that were isolated only once with this bait										
D3Bwg0562e	AW554918	1	1	0	0	12	1	expressed sequence AW554918	225289	1
D3Bwg0562e	Bub3	1	1	0	0	64	1	budding uninhibited by benzimidazoles 3 homolog (S. cerevisiae)	12237	1
D3Bwg0562e	Mtch1	1	0	1	0	0	1	mitochondrial carrier homolog 1 (C. elegans)	58492	1
D3Bwg0562e	Hbb-b1	1	0	1	0	0	2	hemoglobin, beta adult major chain	15129	1
D3Bwg0562e	Sirt2	1	0	1	0	0	2	sirtuin 2 (silent mating type information regulation 2, homolog)	64383	1
Likely false Positives: promiscuous preys										
D3Bwg0562e	Vbp1	1	0	1	0	0	9	von Hippel-Lindau binding protein 1	22927	1
D3Bwg0562e	COX2	14	0	0	0	0	18	cytochrome c oxidase subunit II	17709	2
False Positives: fragments from the 3' UTR										
D3Bwg0562e	2900097C17Rik	3	0	0	3	0	1	RIKEN cDNA2900097C17 gene	347740	2

Abb. 29) Resultatetabelle der gefundenen Interaktionspartner aus dem Yeast-Two-Hybrid-Screen. Als Köder wurden 435 Aminosäuren des cytoplasmatischen C-Terminus von PRG-1 angeboten. Mit hoher Signifikanz konnte die Bindung von N-Ethylmaleimide Sensitive Fusion Protein (NSF) an diese Ködersequenz nachgewiesen werden.

3.5.2. Koimmunpräzipitation in HEK 293 exprimierter, rekombinanter Proteine

Zur Bestätigung der im Yeast-Two-Hybrid Screen identifizierten Interaktion wurde die als Köder verwendete Nukleotidsequenz Δ N-Cterm-PRG-1 in einen Expressionsvektor (p3xFLAG-CMV-13) umklontiert, der 5'-stromaufwärts des multiplen Klonierungsorts mit drei FLAG-Antikörperepitopsequenzen versehen ist. Das verkürzte, rekombinante C-terminale PRG-1 Protein (55kDa) ist durch seine Größe deutlich von NSF (83 kDa) zu unterscheiden. Die kodierende Sequenz von NSF wurde aus Maus (C57/bl6) cDNS mit den Primern NSFfw/NSFrev amplifiziert und kloniert. Die NSF-Sequenz wurde in einen mit der HA-Epitopsequenz ausgestatteten Expressionvektor (pCMV-HA) umklontiert. Beide Vektoren wurden in HEK293 kotransfiziert. Mittels HA-gekoppelter Agarose Beads wurde das HA-markierte NSF aus dem Zelllysats präzipitiert. Bei der darauffolgenden Westernblotanalyse wurde die gleiche Menge transfiziertes Zelllysats (Input) neben die Koimmunpräzipitation aufgetragen. Das präzipitierte NSF wurde mittels HA-Antikörper nachgewiesen, das kopräzipitierte Δ N-Cterm-PRG-1 konnte über das angefügte FLAG-Epitop mittels des Anti-FLAG (M2) Antikörpers detektiert werden.

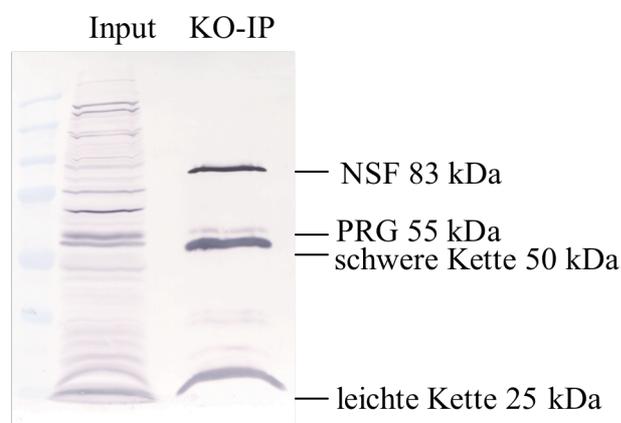


Abb. 30) Koimmunpräzipitation von in HEK293 überexprimierten HA-markiertem NSF und FLAG-markiertem Δ N-Cterm-PRG-1 Proteinen. Immunpräzipitation über das HA-Epitop, Nachweis des präzipitierten NSF mittels HA-Antikörper, Nachweis des kopräzipitierten Δ N-Cterm-PRG-1 mittels FLAG-Antikörper.

3.5.3. Koimmunpräzipitation von NSF/PRG-1 aus Maushirnhomogenaten

Nach Bestätigung der Interaktion mit überexprimierten Proteinen wurde im Anschluß NSF über die Bindung an PRG-1 aus Mausgesamthirnhomogenaten kopräzipitiert. An Protein A-Sepharose-Beads wurde ein im Rahmen dieser Studie erzeugter Anti-PRG-1-Antikörper gebunden. Da NSF zu den sog. AAA-Proteinen gehört (ATPases associated with a wide range of cellular activities), bei denen durch ATP-Bindung eine starke Konformationsänderung induziert wird, wurden die Versuche unter Zugabe von ATP (1 mM) und eines nichtspaltbaren ATP-Analogons (γ -ATP) und ohne Zusätze durchgeführt.

Bei der darauffolgenden Westernblotanalyse wurde die gleiche Menge Gesamthirnhomogenat (Input) neben die Koimmunpräzipitation aufgetragen.

Unter allen Konditionen konnten minimale Mengen kopräzipitiertes NSF mittels Western Blot Analyse nachgewiesen werden. Unter Zugabe von 1 mM γ -ATP wurde die größte Menge NSF mittels anti-NSF-Antikörper nachgewiesen.

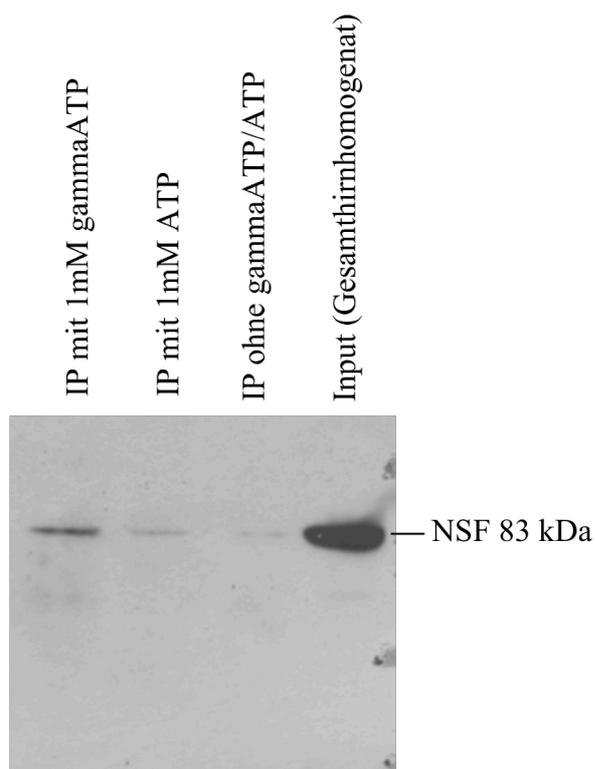


Abb. 31) Koimmunpräzipitation von PRG-1 und NSF aus Maushirnhomogenaten. PRG-1 wurde mittels Sepharose A gebundener AntiPRG-1 Antikörper aus Gesamthirnhomogenaten präzipitiert. Präzipitiert wurde unter Zusatz von 1mM γ -ATP, 1mM ATP, sowie ohne Zusätze. Unter Zusatz von 1mM γ -ATP konnte die größte Menge kopräzipitiertem NSF nachgewiesen werden.

3.5.4. Immunhistologische Kolokalisation von NSF und PRG-1

Zur Bestätigung der NSF/PRG-1-Interaktion wurde der immunhistochemische Nachweis der Kolokalisation beider Proteine geführt. Primäre auf Deckgläschen kultivierte Neuronen wurden zehn Tage nach Präparation fixiert. Es konnte eine Kolokalisation von PRG-1 mit NSF über Antikörpermarkierungen dargestellt werden.

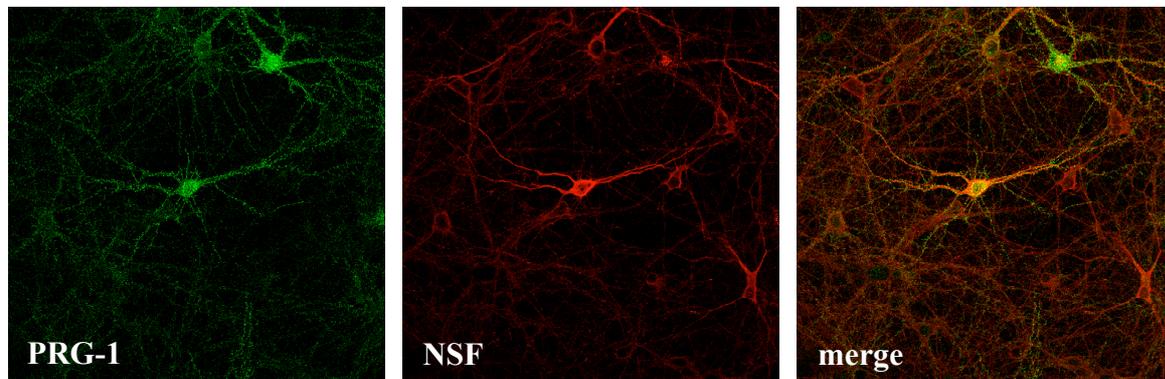


Abb. 32) Immunhistochemische Kolokalisation von PRG-1 und NSF in primären kultivierten Neuronen.

4. Diskussion

4.1. PRG-1-BAC-YFP Reportermaus

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Mausmodell erzeugt, welches das zytoplasmatische, frei diffusible Reporterogen YFP unter Kontrolle von Elementen des nativen PRG-1 Promoters exprimiert. Um möglichst viele der für die korrekte Expression von PRG-1 benötigten regulatorischen Elemente für die Expression des Reportergens bereitzustellen, wurde ein BAC modifiziert, der 200 kb genomische Sequenz um den *prg1* Locus enthielt. Das identische Expressionsmuster dreier unabhängig erzeugter Linien legt nahe, daß ein Einwirken von Positionseffekten auf das inserierte Reporterogen ausgeschlossen werden kann. Die Analyse der Transgene dokumentierte, daß die transferierten 200 kb Sequenz ausreichten, um die rein neuronale PRG-1 spezifische Expression eines Reporterproteins zu mediieren. Da das Reporterprotein wie PRG-1 (Trimbuch et al., 2009) keine Koexpression in GABAergen Interneuronen aufweist, scheinen ebenfalls alle Elemente vorhanden, welche die PRG-1 spezifische nicht-intraneuronale Expression vermitteln. Durch Kolokalisationsstudien von Nachkommen aus PRG-1-YFP-BAC x PRG-1-KO Verpaarungen (die PRG-1-KO-Maus trägt eine β -Galaktosidase-Reporterkassette im *prg1*-Locus), konnte durch den direkten Vergleich zweier zytoplasmatischer Reporterproteine nachgewiesen werden, daß keine YFP-Fehlexpression vorlag. Die minimale oder fehlende Expression des Reporterproteins in einigen Neuronen könnte darauf hindeuten, daß die gewählte BAC-Sequenz nicht alle regulatorischen Sequenzen enthält, die benötigt werden, um eine ausreichend starke Expression in diesen Neuronen zu gewährleisten. Die erzeugte PRG-1-YFP-BAC Reportermaus stellt somit ein geeignetes Werkzeug dar, mit dem Axone und Somata PRG-1-exprimierender Neurone ohne zusätzliche Färbungen abgebildet werden können.

Ein strikt neuronales Expressionsmuster kann durch die Bindung von REST/NRSF (RE 1-„silencing transcription factor“ / „neuron-restrictive silencer factor“) vermittelt werden (Chong et al., 1995; Schoenherr and Anderson, 1995). REST/NRSF interagiert mit wenigstens zwei anderen Proteinen, Sin3 und CoREST, welche ihrerseits mit Histondeacetylasekomplexen assoziieren (Griffith et al., 2001), um die Expression neuronaler Gene in nichtneuronalen Zelltypen zu verhindern. Die Abwesenheit von REST/NRSF Erkennungssequenzen auf der gewählten BAC-Sequenz impliziert, daß das spezifische neuronale Expressionsprofil von PRG-1 durch einen anderen Regulationsmechanismus vermittelt wird. Ob die Bindung eines

anderen Proteins die Transkription von PRG-1 in nicht neuronalen Zellen unterdrückt oder ob die Expression von PRG-1 modular in neuronalen Subtypen stimuliert wird, muß in weiteren Studien ermittelt werden. Die spezifisch neuronale Expression von YFP und das korrekte intraneuronale Expressionsmuster, sowie die mangelnde Reportergenexpression in einigen Neuronen der PRG-1-YFP-BAC Maus könnte als Hinweis auf eine modulare transkriptionelle Regulation gedeutet werden.

4.2. Promoteranalyse von PRG-1

Zur Analyse der Promoterarchitektur von PRG-1 wurden erneut Transkriptionsstartpunkte (TSS) in Ratte wie in Maus ermittelt, da Hinweise auf weitere TSS neben dem von unserer Arbeitsgruppe publizierten Transkriptionsstart in Ratte (NM_001001508) existierten. Mit Hilfe der RLM-Race Analyse, die Transkripte mit einer 7-Methylguanosin-Kappe detektierte, konnten weitere TSS in Ratte wie in Maus nachgewiesen werden, so daß gezeigt werden konnte, daß die Transkription von PRG-1 in Nagern über multiple Transkriptionsstartpunkte initiiert wird. PRG-1 besitzt einen sog. Typ „null“-Promoter, welcher weder über eine TATA-Box noch über eine Initiatorregion verfügt, multiple TSS sind für diesen Promotertyp üblich (Novina and Roy, 1996). Einige der identifizierten TSS lagen hinter dem Translationsstartpunkt (ATG) von PRG-1. Dadurch wurde die Existenz eines potentiellen zweiten Translationsstartpunkts von PRG-1 aufgezeigt, welcher in Säugetiersequenzen konserviert ist. Das Vorhandensein von TSS stromabwärts des ersten ATG von PRG-1 impliziert das Vorhandensein eines zweiten, alternativen N-Terminus des Proteins. Die Existenz einer kürzeren Form von PRG-1, die von dem zweiten ATG aus translatiert wird und welcher N-terminal 49 Aminosäuren fehlen, muß noch bestätigt werden. Die postulierte kürzere Form von PRG-1 gleicht N-terminal dem homologen Protein PRG-2 (Bräuer et al., 2003). PRG-2 wird pränatal exprimiert und hat im Vergleich zu PRG-1 ein unterschiedliches Expressionsmuster, daher ist es möglich, daß die kürzere Form von PRG-1 die Funktion von PRG-2 postnatal substituiert. Die Analyse von EST-Datenbanken zeigt die Existenz von Orthologen von PRG-1 in allen untersuchten Vertebraten, aber die lange Form von PRG-1 mit den zusätzlichen 49 Aminosäuren am N-Terminus wurde nur in Säugetieren gefunden. Ob dieser N-terminalen Verlängerung, die nur in Säugetiere gefunden wurde, eine spezifische Funktion innewohnt muß in folgenden Studien geklärt werden.

Der ursprünglich gefundene TSS (NM_001001508), oder TSS in ähnlicher Entfernung zum Translationsstartpunkt von PRG-1, wurde im Rahmen dieser Analyse nicht gefunden. Daher wurde die Existenz von Transkripten vergleichbarer Länge, wie jene welche vom diesem vorab identifizierten TSS (NM_001001508) initiiert wurden, mittels PCR-Analyse bestätigt.

Die Amplifikatmengen wurden proportional zur Entfernung des stromaufwärts bindenden Primers zum Translationsstart geringer. Dies könnte als Hinweis darauf gedeutet werden, daß die Mehrheit der Transkripte ca. 100-150 bp vor dem Translationsstart abgelesen werden.

Zur weiteren Charakterisierung der Promoterarchitektur von PRG-1 wurden Dualluziferaseassays mit Promotor-Deletionskonstrukten durchgeführt, um Sequenzelemente zu identifizieren, die spezifisch die Transkription in Neuronen stimulieren. Durch Transfektion humaner Promoter-Reportergenkonstrukte in primäre Rattenneurone bzw. Astrozyten konnte ein 450 bp Sequenzelement identifiziert werden, das eine ca. 40-fache transkriptionelle Stimulation in Neuronen hervorrief. Eine Verkürzung dieses Fragmentes um 150 bp am 5'-Ende führte zum Verlust der spezifischen neuronalen Stimulation. Die gleichen Effekte konnten mit den homologen Sequenzen aus Maus in primären Mauszellen dokumentiert werden.

Die Funktionalität des identifizierten Minimalpromoters konnte durch Elektroporation eines Minimalpromotor-Reportergenkonstrukts in organotypischen Slice-Kulturen bestätigt werden. Zur Identifizierung von Transkriptionsfaktoren, die an den Anteil des Minimalpromoters binden, der die spezifische Stimulation in Neuronen vermittelt, wurde diese 150 bp Sequenz mittels „electrophoretic mobility shift analyse“ (EMSA) untersucht. Mittels EMSA konnten DNS-Proteinkomplexe nachgewiesen werden, welche sich durch Oligonukleotide gegen die Konsensussequenzen der Transkriptionsfaktoren Sp1 und CREB kompetetieren ließen.

Da Sp1 als ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor in die Transkription einer Vielzahl von Promotoren ohne TATA-Box oder Initiatorregion involviert ist und dessen Bindung für die Transkription von einigen dieser Promotoren unerlässlich ist (Wierstra, 2008), ist es eher unwahrscheinlich, daß die spezifische transkriptionelle Stimulation in Neuronen die von dem identifizierten Minimalpromoter in Dualluziferaseassays gezeigt wurde, von diesem Faktor vermittelt wird.

Das „cAMP responsive element binding protein“ (CREB) ist ein Transkriptionsfaktor, welcher die Transkription von Genen mit „cAMP responsive element“ (CRE)-Bindungssequenzen in ihren Promotoren moduliert (Montminy et al., 1986; Sassone-Corsi, 1995). Das „cAMP responsive element“ zeigt Eigenschaften einer klassischen Enhancersequenz, indem es die Transkription unabhängig von seiner Orientierung und Distanz vom Transkriptionsstart stimuliert. Die CRE-Bindungssequenz wird durch das Palindrom 5'-TGACGTCA-3' repräsentiert. Variationen dieser Sequenz können erkannt werden, z. B. binden intakte Halbmotive (5'-CGTCA-3') noch immer CREB und verwandte

Proteine, allerdings mit geringerer Affinität als die vollständige Konsensussequenz (Habener et al., 1995). CRE-Bindungssequenzen können von Mitgliedern der Multigenfamilie der CRE-Bindungsproteine, zu der u. a. CREB, CREM, ICER und ATF-1 zählen, gebunden werden. Mit veränderter Affinität binden aber auch strukturell verwandte Transkriptionsfaktoren der bZIP-Familie (z. B. C/EBP und Fos/Jun verwandte Proteine), die über eine konservierte basische Domäne für die DNS-Bindung und eine „Leucinzipper“-Domäne zur Dimerisierung verfügen. Alle bislang identifizierten Transkriptionsfaktoren der bZIP-Familie binden DNS als Homo- oder Heterodimer. Eine symmetrische Bindung des CRE-Konsensusmotivs von CREB, ATF-2 und Jun als Homodimer wurde beschrieben (Habener et al., 1995), eine Bindung diverser Heterodimere mit unterschiedlichen Affinitäten wurde ebenfalls gezeigt (Hai and Curran, 1991).

CREB wurde als erster Faktor identifiziert, der durch Bindung an das CRE-Konsensusmotiv die Induktion von Genexpression durch cAMP mediiert (Hoeffler et al., 1988). Durch Phosphorylierung eines Serinrestes (Ser133) in seiner Kinase induzierbaren Domäne wird die Aktivität von CREB reguliert. Nach Phosphorylierung wird CREB von dem transkriptionellen Koaktivator „CREB binding protein“ (CBP) oder dessen Paralog p300, mittels KIX-Domäne gebunden (Parker et al., 1996). Neben der Erhöhung des cAMP (Gonzalez and Montminy, 1989) oder Calciumspiegels (Matthews et al., 1994), bewirken eine Vielzahl weiterer Stimuli die Phosphorylierung und damit die Aktivierung von CREB z. B. Neurotrophine, Cytokine oder oxidativer Stress (Mayr and Montminy, 2001; Johannessen et al., 2004).

CREB wird ubiquitär exprimiert, jedoch wurden gewebespezifische Regulationen vieler biologischer Funktionen wie unter anderen von Lernen und Gedächtnisbildung dokumentiert. Die ersten Studien, die nahe legten, daß CREB im Rahmen der Gedächtnisbildung benötigt wird, wurden mit kultivierten Neuronen der marinen Molluske *Aplysia* durchgeführt. Durch paarweise Kultivierung sensorischer und motorischer Neuronen die synaptische Verbindungen zueinander ausbildeten und nachfolgender Serotoningabe in definierten Abständen, konnte elektrophysiologisch nachgewiesen werden, daß die kultivierten Neuronenpaare „long term facilitation“ (LTF), eine stabile Steigerung der synaptischen Funktion zeigen. Nach Injektion von CRE-Sequenz-Oligonukleotiden in die sensorischen Neurone konnte keine LTF gezeigt werden (Dash et al., 1990). Durch Injektion eines CRE-Promoter-Reportergens in sensorische Neuronen wurde gezeigt, daß die Induktion von LTF die Aktivierung von CREB stimuliert (Kaang et al., 1993).

In *Drosophila* setzt sich das konsolidierte Gedächtnis nach olfaktorischen Lernprozessen aus zwei unterschiedlichen Komponenten zusammen, dem narkoseresistenten Gedächtnis

„anesthesia-resistant memory“ sowie dem Langzeitgedächtnis „long term memory“ (Tully et al., 1994). Durch die Expression einer induzierbaren, dominant negativen CREB-Isoform vor der Durchführung von Lerneinheiten in transgenen Fruchtfliegen konnte die Bildung des Langzeitgedächtnis blockiert werden (Yin et al., 1994).

Auch in Nagern konnte eine Beteiligung von CREB an Lern- und Gedächtnisbildungsprozessen dokumentiert werden. In transgenen Mäusen (CREB^{αΔ}) deren CREB-Isoformen α und Δ ausgeschaltet wurden, konnten Gedächtnisdefizite nachgewiesen werden (Bourtchuladze et al., 1994). In Ratten wurde durch intrahippocampale Infusion von CREB-Antisense-Oligonukleotiden vor dem Training in „Water-Maze“-Tests gezeigt, daß im Gegensatz zum räumlichen Kurzzeitgedächtnis, die Langzeitgedächtnisbildung beeinträchtigt wird (Guzowski and McGaugh, 1997).

Im Rahmen einer genomischen Sichtung nach Genen die durch CREB reguliert werden, wurde mittels „serial analysis of chromatin occupancy“ (SACO) PRG-1 als mögliches Zielgen des CREB-Regulons in PC12 Zellen prognostiziert (Impey et al., 2004). Eine weitere Studie identifizierte unabhängig die in Nagern und Mensch konservierte CRE-Konsensussequenz des PRG-1 Promoters, als Zielort für eine mögliche CREB-Regulation (Zhang et al., 2005). *In silico*-Analysen identifizierten zusätzlich eine CpG-methylierungsfreie Zone um die konservierte CRE-Konsensussequenz des PRG-1 Promoters. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit einer möglichen transkriptionellen Regulation von PRG-1 durch CREB, da eine Methylierung des Konsensusmotivs die Bindung von CREB beeinträchtigt (Iguchi-Arigo and Schaffner, 1989).

Zwei Varianten des CREB vermittelten Regulationsmechanismus auf den identifizierten Minimalpromoter wären denkbar. Einerseits könnte die Bindung von CREB die direkte Stimulation der Transkription in Neuronen vermitteln ohne die Notwendigkeit der Bindung weiterer Transkriptionsfaktoren, andererseits könnte ein kooperativer Mechanismus denkbar sein. In letzterem Falle würde der um 150 bp verkürzte Abschnitt des Minimalpromoters, welcher in kultivierten Neuronen wie Astrozyten ein ähnliches Ausmaß transkriptioneller Aktivierung vermittelt, für eine basale Stimulation benötigt und die Bindung von CREB an den stromaufwärts gelegenen Anteil würde diesen Effekt in Neuronen verstärken. Dieses Modell beinhaltet die Bindung weiterer Transkriptionsfaktoren an den stromabwärts gelegenen Anteil des Minimalpromoters.

Anhand der ermittelten Ergebnisse und der Einbindung in die Regulation von Gedächtnisbildung stellt CREB einen wahrscheinlichen Kandidaten zur transkriptionellen Regulation des neuronal exprimierten PRG-1 dar. Der Nachweis einer direkten

transkriptionelle Stimulation muß in weiterführenden Studien noch geführt werden.

4.3. Transkriptionelle Regulation von PRG-1 durch Nex1

Die transkriptionelle Regulation von PRG-1 durch Nex-1 über eine spezifische E-Box innerhalb der Rattenpromotersequenz wurde kürzlich gezeigt (Yamada et al., 2008). Da im Rahmen dieser Arbeit weitere Sequenzabschnitte untersucht wurden, welche nicht im Umfang der vorbezeichneten Studie enthalten waren (u. a. der identifizierte Minimalpromoter), wurden alle verwendeten Konstrukte gemeinsam mit einem Nex1-Expressionsvektor kotransfiziert. Diese Transfektionsversuche wurden nicht in kultivierten Primärzellen, sondern wie die Analysen von Yamada et al. in HEK 293-Zellen durchgeführt. Bei allen transfizierten Konstrukten konnte nach Nex1 Kotransfektion eine erhöhte transkriptionelle Stimulation aufgezeigt werden. Nach Subklonierung in den Reportervektor, der in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, zeigte das Fragment der Rattenpromotersequenz, welches bei Yamada et al. die stärkste transkriptionelle Stimulation vermittelte, ein vergleichbares Ausmaß der Aktivierung nach Kotransfektion in HEK 293-Zellen. Die zu diesem Fragment homologen Sequenzabschnitte aus Mensch und Maus zeigten nach Subklonierung und Kotransfektion ein ähnliches Ausmaß der Aktivierung wie die Rattensequenz. Da in der humanen und in der Maussequenz die spezifische E-Box, an welcher die Nex1 Bindung mittels Chromatin-Immunpräzipitation von Yamada et al. gezeigt wurde nicht konserviert ist, besteht die Möglichkeit, daß die transkriptionelle Regulation von PRG-1 über benachbarte E-Boxen ausgeübt wird.

Allerdings konnte auch bei einem Fragment, welches keine funktionelle E-Box enthält (m-160/+145) eine transkriptionelle Stimulation nach Nex1 Kotransfektion beobachtet werden. Dies könnte als Hinweis darauf gedeutet werden, daß eine von Nex1 medierte Modulation der Transkription indirekt vermittelt wird und ein direkter Interaktionspartner dieser Regulation noch ermittelt werden muß.

Des Weiteren zeigte in den Dual-Luziferase-Assays in HEK 293-Zellen nicht der identifizierte Minimalpromoter (m-297/+145, h-300/+143), sondern die um 150 bp am 5'-Ende verkürzte Sequenz (m-160/+145, h-169/+143) die stärkste transkriptionelle Stimulationskapazität. Dieses Resultat zeigte sich auch bei den Transfektionen der vorbezeichneten Konstrukte in primäre Astrozyten aus Ratte und Maus. Dies könnte durch die mögliche Bindung eines weiteren Transkriptionsfaktors der in nicht neuronalen Zellen an den stromabwärts gelegenen Anteil des Minimalpromoters bindet, mediiert werden.

In primären kultivierten Neuronen scheint Nex1 keinen großen Einfluß auf die Transkription durch den identifizierten Minimalpromoter auszuüben, da Kotransfektionen von Nex1 mit

Reportergenkonstrukten des Minimalpromoters (m-297/+145) sowie der verkürzten Sequenz ohne funktionelle E-Box (m-160/+145) lediglich eine leichte, aber nicht signifikante Stimulation der Transkription bewirken.

Die durch den identifizierten Minimalpromoter ausgeübte transkriptionelle Stimulation der Transkription in Neuronen und der von Yamada et al. beschriebene, Nex1 vermittelte Regulationsmechanismus scheinen somit zwei nicht direkt voneinander abhängige Mechanismen zu sein, durch welche die Transkription von PRG-1 moduliert wird.

4.4. Untersuchung der PRG-1 Expression in Nex1 defizienten Mäusen

Wie einleitend beschrieben, zeichnen sich Nex1 defiziente Mäuse durch keine offensichtlichen morphologischen Veränderungen in ihrem Phänotyp aus. Mögliche von Nex1 vermittelte Regulationsmechanismen, wären durch quantitative Untersuchungen der Zielproteine zu ermitteln. Eine quantitative Veränderung des PRG-1 Gehalts durch fehlende transkriptionelle Stimulation von Nex1 erschien möglich, da PRG-1 heterozygote transgene Mäuse, welche gleichfalls keine offensichtlichen morphologischen Veränderungen zeigen, nur ca. 50% der Proteinmenge des Wildtyps exprimieren (Trimbuch et al., 2009). Dies kann als Anzeichen für einen Regulationsmechanismus gedeutet werden, der keine Dosiskompensation des Zielgens beinhaltet. Durch Western-Blot Analysen von Gesamthirnhomogenaten konnte dokumentiert werden, daß Nex1 Defizienz keinen Einfluß auf die Menge der PRG-1 Proteinexpression ausübt. Weder in adulten Nex1-KO-Mäusen noch in juvenilen Tieren (P15), zum Zeitpunkt des Expressionsmaximums von PRG-1, konnten Veränderungen der Gesamtproteinmenge gezeigt werden.

Positive Autoregulationsmechanismen für bHLH-Transkriptionsfaktoren wie im Fall von Nex1 (Bartholomä and Nave, 1994), NDRF (Oda et al., 2000; Lin et al., 2004) und MyoD1 (Thayer et al., 1989) sind bekannt. Zum Ausschluß möglicher „feedback“-Regulationsmechanismen durch PRG-1 wurde mittels Western-Blot Analysen von PRG-1 defizienten Tieren nachgewiesen, daß die Nex1 Proteinmenge in Gesamthirnhomogenaten von adulten Tieren sowie zum Zeitpunkt des PRG-1 Expressionsmaximums unverändert ist.

Lokalisationsveränderungen der PRG-1 Expression in Nex1 defizienten Tieren konnten ebenfalls nicht ermittelt werden. Durch den Vergleich von Gehirnschnitten der im Rahmen dieser Arbeit erzeugten PRG-1-BAC-YFP-Reportermaus mit Schnitten von transgenen Tieren die auf einen Nex1-KO-Hintergrund verkreuzt wurden, konnte keine Veränderung bezüglich Menge und Lokalisation des Reporters festgestellt werden. Immunhistologische Analysen (Daten nicht gezeigt) mittels PRG-1 Antikörpermarkierung zeigten gleichfalls keine Veränderung der PRG-1 Expression bei Nex1 Defizienz.

Zusammenfassend konnte keine direkte Auswirkung einer Nex1 Defizienz auf die Proteinexpression von PRG-1 in dieser Arbeit gezeigt werden. Funktionelle Kompensationsmechanismen sind in der Familie der bHLH-Transkriptionsfaktoren bekannt und wurden u. a. auch für neuronale Differenzierungsfaktoren gezeigt, wie im Fall von NeuroD1/Beta2 in der murinen Retina (Cho et al., 2007) oder in den NeuroD1/Beta2&Nex1 Doppelmutanten, bei denen im Vergleich zu den Einzelmutanten durch fehlende Kompensation ein deutlich morphologisch veränderter stabiler neuronaler Phänotyp erzeugt werden konnte (Schwab et al., 2000).

Obwohl in dieser Arbeit keine Daten ermittelt wurden, die eine direkte Regulation von PRG-1 durch den bHLH-Transkriptionsfaktor Nex1 dokumentieren, scheint Nex1 aufgrund seines räumlichen und zeitlichen Expressionsmusters ein idealer Kandidat für die transkriptionelle Regulation von PRG-1. Zusätzlich bestehen Gemeinsamkeiten bezüglich der Faktoren, welche die Transkription von Nex1 selbst regulieren. Einer der beiden Promotoren, durch den die Transkription von Nex1 gesteuert wird, enthält vier konservierte E-Boxen und ein konserviertes CRE-Bindemotiv. Proteinbindung konnte an zwei der E-Boxen ebenso wie an das CRE-Motiv über DNAaseI footprinting Analysen nachgewiesen werden (Uittenbogaard et al., 2007). Zusätzlich von der von Yamada et. al. vertretenen These, daß Nex1 direkt die Transkription von PRG-1 reguliere, scheinen diverse Regulationsszenarien denkbar. Einerseits wäre ein Mechanismus möglich, bei dem CREB und Nex1 kooperativ die Transkription von PRG-1 modulieren, so daß möglicherweise die Stimulation durch jeden Faktor für sich zu gering ist, um direkte Auswirkungen auf den Spiegel von PRG-1 zu zeigen. Andererseits wäre auch ein Regulationsmodus denkbar, bei dem CREB die Transkription von PRG-1 und Nex1 reguliert, so daß erst nach Induktion der CREB medierten Stimulation nachgeschaltete, durch Nex1 vermittelte, Regulationsmechanismen auf PRG-1 eingreifen würden.

In einer konstitutiv Nex1 exprimierenden PC 12- Zelllinie konnte gezeigt werden, daß Nex1 die Expression eines breiten Spektrums von Genen, die u. a. in Transkription, Zelladhäsion, Zytoskelett und Metabolismus involviert sind, direkt oder indirekt induziert (Uittenbogaard and Chiaramello, 2004). Die konstitutive Expression von Nex1 in dieser Zelllinie resultiert auch in einer erhöhten NGF-induzierten Neuritogenese. In Anwesenheit des cAMP-Analogons dbc AMP konnte eine deutlich gesteigerte Neuritogenese in dieser Zelllinie dokumentiert werden, so daß postuliert wurde, die konstitutive Expression von Nex1 löse ein transkriptionelles Programm aus, welches mit der cAMP Signalkaskade interagiert. Ein synergistischer Effekt von dbcAMP und Nex1 konnte in dieser Zelllinie auch bei der

Regeneration von Neuriten gezeigt werden.

Ob die Interaktion der cAMP Signalkaskade und Nex1 in Neuronen in gleicher Form wie in der immortalisierten PC12 Zelllinie verläuft und in welcher Art und Weise die Transkription von PRG-1 durch diese Interaktion moduliert wird, muß in zukünftigen Studien geklärt werden.

4.5. Identifizierung möglicher Interaktionspartner von PRG-1

Als einziger Interaktionspartner von PRG-1 ist bislang Calmodulin bekannt (Tokumitsu et al., 2010). Das Calcium²⁺-bindende Protein Calmodulin (CaM) wird in den meisten eukaryotischen Zellen gefunden, die höchsten Konzentrationen finden sich in Hirn und Hoden (Watterson et al., 1976; Dedman et al., 1977). CaM zeigt einen hohen Grad der Konservierung innerhalb vieler Spezies und agiert als Übermittler von Calcium²⁺-Signalen. Zu den Enzymen, die durch den Ca²⁺-Calmodulin-Komplex stimuliert werden zählen z. B. zyklische Nukleotidphosphodiesterase, Myosin „light chain“-Kinase, Phosphorylase b-Kinase und die NAD-Kinase in Pflanzen (Klee et al., 1980). Eine Einbindung von CaM mediierten Ca²⁺-Signalwegen wurden u. a. im Rahmen von Synaptogenese, synaptischer Plastizität und dendritischer Verzweigung gezeigt (Xia and Storm, 2005; Wayman et al., 2006; Saneyoshi et al., 2008). Tokumitsu et al. zeigten eine Ca²⁺-abhängige Calmodulinbindung von PRG-1 mittels Affinitätschromatographie, CaM-Overlay, Fluoreszenzmessungen und „surface plasmon resonance“-Analysen. Als minimale Bindungsregion wurde die Rattenproteinsequenz Ser⁵⁵⁴-Gln⁵⁸⁸ von PRG-1 bestimmt, die in Mensch und Maus konserviert ist. Die in dieser Studie identifizierte CaM-Bindungsregion von PRG-1 ist länger als konventionelle CaM-Bindungsregionen. Um eine mögliche Phosphataseaktivität in Anwesenheit von Ca²⁺/CaM zu untersuchen, wurden Zellkulturversuche mit PRG-1 überexprimierenden COS-7-Zellen und radioaktiv markiertem oleoyl-LPA als Substrat durchgeführt. Weder in Anwesenheit noch in Abwesenheit von Ca²⁺/CaM konnte eine LPA Hydrolyse durch PRG-1 nachgewiesen werden.

Zur Identifizierung weiterer Interaktionspartner wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Two-Hybrid-Screen mit dem cytoplasmatisch lokalisierten C-Terminus (Aminosäure 331-766) des murinen PRG-1 durchgeführt. Mit hoher Signifikanz wurde N-ethylmaleimide sensitive fusion protein (NSF) als Interaktionspartner prognostiziert. NSF ist strukturell in drei Domänen gegliedert, die alle für Struktur und Funktion des Proteins erforderlich sind. Die Tatsache, daß im Two-Hybrid-Screen nur vollständige NSF-Sequenzen nachgewiesen wurden, erhöhte die Wahrscheinlichkeit, daß die nachgewiesene Bindung *in vivo* funktionell

sein könnte.

In nachfolgenden Immunpräzipitationsversuchen konnte diese Interaktion sowohl mit überexprimierten affinitätsmarkierten Proteinen bestätigt werden, als auch direkt aus Maushirnhomogenaten mit Hilfe eines für diese Versuche im Rahmen dieser Studie hergestellten Antikörpers.

NSF wurde ursprünglich als Protein charakterisiert, welches Transportvorgänge innerhalb der Zisternen des Golgiapparates in einem zellfreien System mediiert (Glick and Rothman, 1987). Nach Inaktivierung der verwendeten Golgimembranen mittels N-Ethylmaleimide im zellfreien Transport-Assay, konnten die Transportvorgänge durch Zugabe unbehandelter Golgimembranen in Anwesenheit von ATP wiederhergestellt werden. Im Anschluß an diesen Komplementierungsversuch konnte NSF aufgereinigt werden (Block et al., 1988). NSF hat eine zentrale Rolle in den meisten vesikulären Transportwegen inne. In Säugetierzellen wird NSF für den Transport vom Endoplasmatischen Reticulum (ER) zum Golgiapparat benötigt (Beckers et al., 1989) und für den Transport synthetisierter Proteine zur apikalen (Apodaca et al., 1996) oder basolateralen (Ikonen et al., 1995) Plasmamembran. Im ZNS konnte eine Beteiligung von NSF bei der Exozytose synaptischer Vesikel festgestellt werden (Hong et al., 1994; Schweizer et al., 1998). Die Bindung von NSF an Golgimembranen konnte nur in Gegenwart zusätzlicher „soluble NSF attachment proteins“ (SNAPs) nachgewiesen werden, drei nahe verwandte Proteine α -, β - und γ -SNAP konnten aus dem Cytosol von Rinderhirn aufgereinigt werden (Clary et al., 1990). Die ersten Zielproteine an die NSF und SNAPs binden wurden in ebenfalls in Gehirnpräparationen nachgewiesen. Die identifizierten SNAP Rezeptoren (SNARE) beinhalten das synaptische Vesikelprotein Synaptobrevin und die synaptischen Membranproteine SNAP-25 und Syntaxin (Söllner et al., 1993). Die cytoplasmatischen Domänen der SNAREs bilden einen Komplex, der die zu fusionierenden Membranen miteinander verbindet, dabei müssen zueinander komplementäre Paare von SNAREs auf Vesikel und Membranen vorhanden sein, um eine Fusion zu ermöglichen. Zuerst binden SNAPs an die SNARE-Komplexe danach wird NSF gebunden. Die Bindung von NSF ist ATP abhängig, dessen Hydrolyse liefert die Energie für die Demontage des Gesamtkomplexes. Dadurch werden die SNARE-Monomere wieder für neue vesikuläre Transportprozesse verfügbar. Neben der Interaktion mit SNAP-SNARE-Komplexen assoziiert NSF noch mit weiteren Proteinen und Komplexen (Jahn, 1998). Bislang wurden folgende Interaktionen dokumentiert: GluR2-Untereinheit des AMPA Rezeptors, β 2-adrenerger

Rezeptor, β -Arrestin 1, Rab sowie rab enthaltende Komplexe, GATE-16 und LMA1 (Whiteheart and Matveeva, 2004).

NSF ist ein Familienmitglied der AAA „ATPases associated with various cellular activities“-ATPasen, die ein konserviertes 220-250 Aminosäure Motiv beinhalten, dieses Motiv (AAA-Kassette) beinhaltet eine Nukleotidbinderegion und weitere homologe Region, die als SRH-Dömäne „second region of homology“ bezeichnet wird. NSF besitzt zwei AAA-Kassetten die sich voneinander bezüglich ihrer ATPaseaktivität unterscheiden. Funktionell scheinen AAA-Proteine, ähnlich wie Chaperone eine Vielzahl zellulärer Prozesse zu erleichtern, zu denen Membranfusionen, Proteindegredationen und DNS-Replikationen zählen. Hierbei wird die benötigte Energie durch Hydrolyse von ATP erzeugt (Whiteheart et al., 2001).

Bei den Interaktionen von NSF mit dem AMPA Rezeptors und dem β 2-adrenergen Rezeptor konnte jeweils eine Regulation des Rezeptorrecyclings gezeigt werden (Nishimune et al., 1998; Cong et al., 2001).

Der durch die PRG-1/NSF- Interaktion vermittelte Mechanismus muß in nachfolgenden Studien aufgeklärt werden. Als weitere Möglichkeit wäre denkbar, daß NSF als Verankerungsprotein PRG-1 in der postsynaptischen Membran stabilisiert, so daß die Menge von PRG-1 nicht durch laterale Diffusionsvorgänge moduliert wird.

4.6. Ausblick auf weiterführende Studien

Um den Einfluß des Transkriptionsfaktors CREB auf den identifizierten Minimalpromoter zu bestätigen, können erneute Dual-Luziferase-Assays transfizierter primärer Neuronen unter Zusatz von Forskolin (Induktor der Adenylatzyklase) oder dbcAMP (cAMP-Analogon) den Nachweis einer direkten Stimulation liefern. Um den Mechanismus des identifizierten Minimalpromoters aufzuklären sind Transfektion eines Deletionskonstrukts, welches die stromaufwärts gelegenen 150 bp enthält, die die spezifische transkriptionelle Stimulation in Neuronen vermitteln, notwendig. Diese Daten könnten die Frage klären, ob diese Region nur die neuronale Spezifität vermittelt oder auch selbst die Transkription stimuliert.

Um dem Einfluß von Nex1 auf die Expression von PRG-1 aufzuklären, sind weitere Untersuchungen mit Mausmodellen notwendig, die zusätzlich defizient für NeuroD1 bzw NDRF oder für alle drei genannten neuronalen Differenzierungsfaktoren sind, um die funktionellen Kompensationsmechanismen auszuschalten, die innerhalb dieser Genfamilie wirksam werden.

Die Identifizierung von PRG-1 als Interaktionspartner von NSF ist ein Ansatz um weitere funktionelle Mechanismen die durch PRG-1 vermittelt werden zu klären. Als nächster Schritt könnte die Identifizierung des Bindemotivs dieser Interaktion, mit nachfolgender Mutation des Bindungsorts aufklären, in welchen zellüären Mechanismus beide Interaktionspartner eingebunden sind.

5. Abkürzungsverzeichnis

A, T, G, C	Basen der DNS: Adenin, Thymin, Guanin, Cytosin
Abb.	Abbildung
<i>A. bidest</i>	<i>Aqua bidestillata</i>
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BAC	bacterial artificial chromosome
BSA	Rinderserumalbumin
bp	Basenpaare
C	Celsius
ca.	circa
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotide
DEPC	Diethylpyrocarbonat
E	Embryonal
EDTA	Ethylendiaminessigsäure
et. al.	et altera
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EST	Expressed Sequence Tags
EtOH	Ethanol
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
IPTG	Isopropyl- β -thiogalaktopyranosid
kDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
l	Liter
LB	Luria Bertani
MCS	Mehrfach Klonierungsort (multiple cloning site)
min	Minute
mRNS	Botenribonukleinsäure
NGF	nerve growth factor
OD	Optische Dichte

P	Postnatal
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
pers.	persönliche
PSD	postsynaptische Dichte
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
sog.	sogenannt
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TM	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	Transkriptionsstartpunkt
ü.N.	über Nacht
U	katalytische Einheit
UV	Ultraviolett
Vol	Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid
ZNS	zentrales Nervensystem

6. Publikationen und Posterpräsentationen

6.1. Publikationen

Geist B, Vorwerk B, Coiro P, Ninnemann O, Nitsch R.

Determination of PRG-1 transcriptional regulation independent from Nex1/Math2 mediated activation. **J. Neuroscience**/ under submission

Trimbuch T, Beed P, Vogt J, Schuchmann S, Maier N, Kintscher M, Breustedt J, Schuelke M, Streu N, Kieselmann O, Brunk I, Laube G, Strauss U, Bettefeld A, Wende H, Birchmeier C, Wiese S, Sendtner M, Kawabe H, Kishimoto-Suga M, Brose N, Baumgart J, **Geist B**, Aoki J, Savaskan NE, Bräuer AU, Chun J, Ninnemann O, Schmitz D, Nitsch R. Synaptic PRG-1 modulates excitatory transmission via lipid phosphate-mediated signaling

Cell. 2009 Sep 18;138(6):1222-35.

Wasner U, **Geist B**, Bettefeld A, Bauer P, Müller J, Rolfs A, Strauss U. Specific properties of sodium currents in multipotent striatal progenitor cells. **Eur J Neurosci**. 2008 Sep;28(6):1068-79.

Welker P, **Geist B**, Frühauf JH, Salanova M, Groneberg DA, Krause E, Bachmann S. Role of lipid rafts in membrane delivery of renal epithelial Na⁺-K⁺-ATPase, thick ascending limb. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. 2007 Mar; 292(3): R1328-37.

Bachmann S, Mutig K, Bates J, Welker P, **Geist B**, Gross V, Luft FC, Alenina N, Bader M, Thiele BJ, Prasad K, Raffi HS, Kumar S: Renal effects of Tamm Horsfall protein (uromodulin) deficiency in mice. **AJP Renal** 288(3): 559-567, 2005.

Bachmann S, Schlichting U, **Geist B**, Mutig K, Petsch T, Bacic D, Wagner CA, Kaissling B, Biber J, Murer H, Willnow T: Kidney-specific inactivation of the megalin gene impairs trafficking of renal inorganic sodium phosphate-cotransporter (NaPi-IIa). **J Am Soc Nephrol** 15(4): 892-900, 2004.

6.2. Konferenzbeiträge durch Posterpräsentationen

Aus Datenschutzgründen entfernt

7. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, den 30.06.2010

8. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Aus Datenschutzgründen entfernt

9. Literaturverzeichnis:

- An S, Bleu T, Hallmark OG, Goetzl EJ (1998) Characterization of a novel subtype of human G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* 273:7906-7910.
- Aoki J, Inoue A, Okudaira S (2008) Two pathways for lysophosphatidic acid production. *Biochim Biophys Acta* 1781:513-518.
- Apodaca G, Cardone MH, Whiteheart SW, DasGupta BR, Mostov KE (1996) Reconstitution of transcytosis in SLO-permeabilized MDCK cells: existence of an NSF-dependent fusion mechanism with the apical surface of MDCK cells. *EMBO J* 15:1471-1481.
- Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ (1999) Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284:770-776.
- Atchley WR, Fitch WM (1997) A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:5172-5176.
- Balazs L, Okolicany J, Ferrebee M, Tolley B, Tigyi G (2001) Topical application of the phospholipid growth factor lysophosphatidic acid promotes wound healing in vivo. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280:466-472.
- Bandoh K, Aoki J, Hosono H, Kobayashi S, Kobayashi T, Murakami-Murofushi K, Tsujimoto M, Arai H, Inoue K (1999) Molecular cloning and characterization of a novel human G-protein-coupled receptor, EDG7, for lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* 274:27776-27785.
- Bartholomä A, Nave KA (1994) NEX-1: a novel brain-specific helix-loop-helix protein with autoregulation and sustained expression in mature cortical neurons. *Mech Dev* 48:217-228.
- Beckers CJ, Block MR, Glick BS, Rothman JE, Balch WE (1989) Vesicular transport between the endoplasmic reticulum and the Golgi stack requires the NEM-sensitive fusion protein. *Nature* 339:397-398.
- Berben G, Legrain M, Gilliquet V, Hilger F (1990) The yeast regulatory gene PHO4 encodes a helix-loop-helix motif. *Yeast* 6:451-454.
- Bertrand N, Castro DS, Guillemot F (2002) Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci* 3:517-530.
- Block MR, Glick BS, Wilcox CA, Wieland FT, Rothman JE (1988) Purification of an N-ethylmaleimide-sensitive protein catalyzing vesicular transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:7852-7856.
- Botas J, Moscoso del Prado J, García-Bellido A (1982) Gene-dose titration analysis in the search of trans-regulatory genes in *Drosophila*. *EMBO J* 1:307-310.
- Bourtchuladze R, Frenguelli B, Blendy J, Cioffi D, Schutz G, Silva AJ (1994) Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell* 79:59-68.
- Bräuer AU, Nitsch R (2008) Plasticity-related genes (PRGs/LRPs): a brain-specific class of lysophospholipid-modifying proteins. *Biochim Biophys Acta* 1781:595-600.
- Bräuer AU, Savaskan NE, Kühn H, Prehn S, Ninnemann O, Nitsch R (2003) A new phospholipid phosphatase, PRG-1, is involved in axon growth and regenerative sprouting. *Nat Neurosci* 2003 6:572-578.
- Braun T, Arnold HH (1995) Inactivation of Myf-6 and Myf-5 genes in mice leads to alterations in skeletal muscle development. *EMBO J* 14:1176-1186.
- Brindley DN, English D, Pilquil C, Buri K, Ling ZC (2002) Lipid phosphate phosphatases regulate signal transduction through glycerolipids and sphingolipids. *Biochim Biophys Acta* 1582:33-44.
- Broggini T, Nitsch R, Savaskan NE (2010) Plasticity-related gene 5 (PRG5) induces filopodia

- and neurite growth and impedes lysophosphatidic acid- and nogo-A-mediated axonal retraction. *Mol Biol Cell* 21:521-537.
- Cabrera CV, Alonso MC (1991) Transcriptional activation by heterodimers of the achaete-scute and daughterless gene products of *Drosophila*. *EMBO J* 10:2965-2973.
- Campos-Ortega JA (1994) Genetic mechanisms of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *J Physiol Paris* 88:111-122.
- Campuzano S, Modolell J (1992) Patterning of the *Drosophila* nervous system: the achaete-scute gene complex. *Trends Genet* 8:202-208.
- Chen C, Tonegawa S (1997) Molecular genetic analysis of synaptic plasticity, activity-dependent neural development, learning, and memory in the mammalian brain. *Annu Rev Neurosci* 20:157-184.
- Chen G, Courey AJ (2000) Groucho/TLE family proteins and transcriptional repression. *Gene* 249:1-16.
- Cho JH, Klein WH, Tsai MJ (2007) Compensational regulation of bHLH transcription factors in the postnatal development of BETA2/NeuroD1-null retina. *Mech Dev* 124:543-550.
- Choi JW, Herr DR, Noguchi K, Yung YC, Lee CW, Mutoh T, Lin ME, Teo ST, Park KE, Mosley AN, Chun J (2010) LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50:157-186.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
- Chong JA, Tapia-Ramírez J, Kim S, Toledo-Aral JJ, Zheng Y, Boutros MC, Altshuler YM, Frohman MA, Kraner SD, Mandel G (1995) REST: a mammalian silencer protein that restricts sodium channel gene expression to neurons. *Cell* 80:949-957.
- Church GM, Gilbert W (1984) Genomic Sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81, . *Proc Natl Acad Sci* 81:1991-1995.
- Clary DO, Griff IC, Rothman JE (1990) SNAPS, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast. *Cell* 61:709-721.
- Cohen SN, Chang AC, Hsu L (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci* 69:2110-2114.
- Cong M, Perry SJ, Hu LA, Hanson PI, Claing A, Lefkowitz RJ (2001) Binding of the beta2 adrenergic receptor to N-ethylmaleimide-sensitive factor regulates receptor recycling. *J Biol Chem* 276:45145-45152.
- Dambly-Chaudière C, Vervoort M (1998) The bHLH genes in neural development. *Int J Dev Biol* 42:269-273.
- Dash PK, Hochner B, Kandel ER (1990) Injection of the cAMP-responsive element into the nucleus of *Aplysia* sensory neurons blocks long-term facilitation. *Nature* 345:718-721.
- Dedman JR, Potter JD, Jackson RL, Johnson JD, Means AR (1977) Physicochemical properties of rat testis Ca²⁺-dependent regulator protein of cyclic nucleotide phosphodiesterase. Relationship of Ca²⁺-binding, conformational changes, and phosphodiesterase activity. *J Biol Chem* 252:8415-8422.
- Deller T, Haas CA, Frotscher M (2001) Sprouting in the hippocampus after entorhinal cortex lesion is layer-specific but not translaminal: which molecules may be involved? *Restor Neurol Neurosci* 19:159-167.
- Fang X, Yu S, LaPushin R, Lu Y, Furui T, Penn LZ, Stokoe D, Erickson JR, Bast RCJr, Mills GB (2000) Lysophosphatidic acid prevents apoptosis in fibroblasts via G(i)-protein-mediated activation of mitogen-activated protein kinase. *Biochem J* 352:135-143.
- Ferré-D'Amaré AR, Prendergast GC, Ziff EB, Burley SK (1993) Recognition by Max of its cognate DNA through a dimeric b/HLH/Z domain. *Nature* 363:38-45.
- Fischer A, Gessler M (2007) Delta-Notch--and then? Protein interactions and proposed modes of repression by Hes and Hey bHLH factors. *Nucleic Acids Res* 35:4583-4596.

- Fisher A, Caudy M (1998) The function of hairy-related bHLH repressor proteins in cell fate decisions. *Bioessays* 20:298-306.
- Frengen E, Weichenhan D, Zhao B, Osoegawa K, van Geel M, de Jong PJ (1999) A modular, positive selection bacterial artificial chromosome vector with multiple cloning sites. *Genomics* 58:250-253.
- Fromm C, Coso OA, Monttaner S, Xu N, Gutkind JS (1997) The small GTP-binding protein Rho links G protein-coupled receptors and Galpha12 to the serum response element and to cellular transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:10098-10103.
- Frotscher M, Heimrich B, Deller T (1997) Sprouting in the hippocampus is layer-specific. *Trends Neurosci* 20:218-223.
- Fukushima N, Shano S, Moriyama R, Chun J (2007) Lysophosphatidic acid stimulates neuronal differentiation of cortical neuroblasts through the LPA1-G(i/o) pathway. *Neurochem Int* 50:302-307.
- Fukushima N, Ishii I, Contos JJ, Weiner JA, Chun J (2001) Lysophospholipid receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:507-534.
- García-Bellido A, Santamaria P (1978) Developmental Analysis of the Achaete-Scute System of *DROSOPHILA MELANOGASTER*. *Genetics* 88:469-486.
- Gautier P, Ledent V, Massaer M, Dambly-Chaudière C, Ghysen A (1997) tap, a Drosophila bHLH gene expressed in chemosensory organs. *Gene* 191:15-21.
- Ghysen A, Dambly-Chaudière C (1988) From DNA to form: the achaete-scute complex. *Genes Dev* 2:495-501.
- Glick BS, Rothman JE (1987) Possible role for fatty acyl-coenzyme A in intracellular protein transport. *Nature* 326:309-312.
- Gong S, Zheng C, Doughty ML, Losos K, Didkovsky N, Schambra UB, Nowak NJ, Joyner A, Leblanc G, Hatten ME, Heintz N (2003) A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes. *Nature* 425:917-925.
- Gonzalez GA, Montminy MR (1989) Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* 59:675-680.
- Goulding SE, zur Lage P, Jarman AP (2000a) amos, a proneural gene for Drosophila olfactory sense organs that is regulated by lozenge. *Neuron* 25:69-78.
- Goulding SE, White NM, Jarman AP (2000b) cato encodes a basic helix-loop-helix transcription factor implicated in the correct differentiation of Drosophila sense organs. *Dev Biol* 221:120-131.
- Griffith EC, Cowan CW, Greenberg ME (2001) REST acts through multiple deacetylase complexes. *Neuron* 31:339-340.
- Guillemot F (1999) Vertebrate bHLH genes and the determination of neuronal fates. *Exp Cell Res* 253:357-364.
- Guillemot F (2007) Spatial and temporal specification of neural fates by transcription factor codes. *Development* 134:3771-3780.
- Guillemot F, Lo LC, Johnson JE, Auerbach A, Anderson DJ, Joyner AL (1993) Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. *Cell* 75:463-476.
- Guzowski JF, McGaugh JL (1997) Antisense oligodeoxynucleotide-mediated disruption of hippocampal cAMP response element binding protein levels impairs consolidation of memory for water maze training. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:2693-2698.
- Habener JF, Miller CP, Vallejo M (1995) cAMP-dependent regulation of gene transcription by cAMP response element-binding protein and cAMP response element modulator. *Vitam Horm* 51:1-57.
- Hai T, Curran T (1991) Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:3720-3724.
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*

- 166:557-580.
- Hassan BA, Bellen HJ (2000) Doing the MATH: is the mouse a good model for fly development? *Genes Dev* 14:1852-1865.
- Hecht JH, Weiner JA, Post SR, Chun J (1996) Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex. *J Cell Biol* 135:1071-1083.
- Hoeffler JP, Meyer TE, Yun Y, Jameson JL, Habener JF (1988) Cyclic AMP-responsive DNA-binding protein: structure based on a cloned placental cDNA. *Science* 242:1430-1433.
- Hong RM, Mori H, Fukui T, Moriyama Y, Futai M, Yamamoto A, Tashiro Y, Tagaya M (1994) Association of N-ethylmaleimide-sensitive factor with synaptic vesicles. *FEBS Lett* 350:253-257.
- Hooks SB, Santos WL, Im DS, Heise CE, Macdonald TL, Lynch KR (2001) Lysophosphatidic acid-induced mitogenesis is regulated by lipid phosphate phosphatases and is Edg-receptor independent. *J Biol Chem* 276:4611-4621.
- Hoshizaki DK, Hill JE, Henry SA (1990) The *Saccharomyces cerevisiae* INO4 gene encodes a small, highly basic protein required for derepression of phospholipid biosynthetic enzymes. *J Biol Chem* 265:4736-4745.
- Iguchi-Arigo SM, Schaffner W (1989) CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. *Genes Dev* 3:612-619.
- Ikonen E, Tagaya M, Ullrich O, Montecucco C, Simons K (1995) Different requirements for NSF, SNAP, and Rab proteins in apical and basolateral transport in MDCK cells. *Cell* 81:571-580.
- Impey S, McCorkle SR, Cha-Molstad H, Dwyer JM, Yochum GS, Boss JM, McWeeney S, Dunn JJ, Mandel G, Goodman RH (2004) Defining the CREB regulon: a genome-wide analysis of transcription factor regulatory regions. *Cell* 119:1041-1054.
- Ishii I, Contos JJ, Fukushima N, Chun J (2000) Functional comparisons of the lysophosphatidic acid receptors, LP(A1)/VZG-1/EDG-2, LP(A2)/EDG-4, and LP(A3)/EDG-7 in neuronal cell lines using a retrovirus expression system. *Mol Pharmacol* 58:895-902.
- Jahn R (1998) Synaptic transmission: two players team up for a new tune. *Curr Biol* 8:R856-858.
- Jan YN, Jan LY (1993) HLH proteins, fly neurogenesis, and vertebrate myogenesis. *Cell* 75:827-830.
- Jarman AP, Grau Y, Jan LY, Jan YN (1993a) atonal is a proneural gene that directs chordotonal organ formation in the *Drosophila* peripheral nervous system. *Cell* 73:1307-1321.
- Jarman AP, Brand M, Jan LY, Jan YN (1993b) The regulation and function of the helix-loop-helix gene, *asense*, in *Drosophila* neural precursors. *Development* 119:19-29.
- Jasinska R, Zhang QX, Pilquil C, Singh I, Xu J, Dewald J, Dillon DA, Berthiaume LG, Carman GM, Waggoner DW, Brindley DN (1999) Lipid phosphate phosphohydrolase-1 degrades exogenous glycerolipid and sphingolipid phosphate esters. *Biochem J* 340:677-686.
- Johannessen M, Delghandi MP, Moens U (2004) What turns CREB on? *Cell Signal* 16:1211-1227.
- Kaang BK, Kandel ER, Grant SG (1993) Activation of cAMP-responsive genes by stimuli that produce long-term facilitation in *Aplysia* sensory neurons. *Neuron* 10:427-435.
- Kageyama R, Ishibashi M, Takebayashi K, Tomita K (1997) bHLH transcription factors and mammalian neuronal differentiation. *Int J Biochem Cell Biol* 29:1389-1399.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (2000) *Principles of Neural Science*. New York

McGraw-Hill.

- Kingsbury MA, Rehen SK, Contos JJ, Higgins CM, Chun J (2003) Non-proliferative effects of lysophosphatidic acid enhance cortical growth and folding. *Nat Neurosci* 6:1292-1299.
- Klee CB, Crouch TH, Richman PG (1980) Calmodulin. *Annu Rev Biochem* 49:489-515.
- Kotarsky K, Boketoft A, Bristulf J, Nilsson NE, Norberg A, Hansson S, Owman C, Sillard R, Leeb-Lundberg LM, Olde B (2006) Lysophosphatidic acid binds to and activates GPR92, a G protein-coupled receptor highly expressed in gastrointestinal lymphocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 318:619-628.
- Kranenburg O, Poland M, van Horck FP, Drechsel D, Hall A, Moolenaar WH (1999) Activation of RhoA by lysophosphatidic acid and G α 12/13 subunits in neuronal cells: induction of neurite retraction. *Mol Biol Cell* 10:1851-1857.
- Ledent V, Vervoort M (2001) The basic helix-loop-helix protein family: comparative genomics and phylogenetic analysis. *Genome Res* 11:754-770.
- Ledent V, Gaillard F, Gautier P, Ghysen A, Dambly-Chaudière C (1998) Expression and function of tap in the gustatory and olfactory organs of *Drosophila*. *Int J Dev Biol* 42:163-170.
- Lee JE (1997) Basic helix-loop-helix genes in neural development. *Curr Opin Neurobiol* 7:13-20.
- Lee YS, Silva AJ (2009) The molecular and cellular biology of enhanced cognition. *Nat Rev Neurosci* 10:126-140.
- Lin CH, Stoeck J, Ravanpay AC, Guillemot F, Tapscott SJ, Olson JM (2004) Regulation of neuroD2 expression in mouse brain. *Dev Biol* 265:234-245.
- Liu P, Jenkins NA, Copeland NG (2003) A highly efficient recombineering-based method for generating conditional knockout mutations. *Genome Res* 13:476-484.
- Lümmen G, Virchow S, Rümennapp U, Schmidt M, Wieland T, Otto T, Rübber H, Jakobs KH (1997) Identification of G protein-coupled receptors potently stimulating migration of human transitional-cell carcinoma cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 356:769-776.
- Massari ME, Murre C (2000) Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol* 20:429-440.
- Matthews RP, Guthrie CR, Wailes LM, Zhao X, Means AR, McKnight GS (1994) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase types II and IV differentially regulate CREB-dependent gene expression. *Mol Cell Biol* 14:6107-6116.
- Mayr B, Montminy M (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:599-609.
- McDermott MI, Sigal YJ, A. SV, Morris AJ (2004) Is PRG-1 a new lipid phosphatase? *Nat Neurosci* 7:789-790.
- McIntyre TM, Pontsler AV, Silva AR, St Hilaire A, Xu Y, Hinshaw JC, Zimmerman GA, Hama K, Aoki J, Arai H, Prestwich GD (2003) Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPAR γ agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:131-136.
- Mills GB, Moolenaar WH (2003) The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat Rev Cancer* 3:582-591.
- Montminy MR, Sevarino KA, Wagner JA, Mandel G, Goodman RH (1986) Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:6682-6686.
- Murakami M, Shiraishi A, Tabata K, Fujita N (2008) Identification of the orphan GPCR, P2Y(10) receptor as the sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 371:707-712.
- Murre C, McCaw PS, Baltimore D (1989) A new DNA binding and dimerization motif in

- immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* 56:777-783.
- Muskavitch MA (1994) Delta-notch signaling and Drosophila cell fate choice. *Dev Biol* 166:415-430.
- Navarro X (2009) Chapter 27: Neural plasticity after nerve injury and regeneration. *Int Rev Neurobiol* 87:483-505.
- Nieto M, Schuurmans C, Britz O, Guillemot F (2001) Neural bHLH genes control the neuronal versus glial fate decision in cortical progenitors. *Neuron* 29:401-413.
- Nikoloff DM, McGraw P, Henry SA (1992) The INO2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a helix-loop-helix protein that is required for activation of phospholipid synthesis. *Nucleic Acids Res* 20:3253.
- Nishimune A, Isaac JT, Molnar E, Noel J, Nash SR, Tagaya M, Collingridge GL, Nakanishi S, Henley JM (1998) NSF binding to GluR2 regulates synaptic transmission. *Neuron* 21:87-97.
- Nishizawa M, Komai T, Katou Y, Shirahige K, Ito T, Toh-E A (2008) Nutrient-regulated antisense and intragenic RNAs modulate a signal transduction pathway in yeast. *PLoS Biol* 6:2817-2830.
- Noguchi K, Ishii S, Shimizu T (2003) Identification of p2y9/GPR23 as a novel G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid, structurally distant from the Edg family. *J Biol Chem* 278:25600-25606.
- Noguchi K, Herr D, Mutoh T, Chun J (2009) Lysophosphatidic acid (LPA) and its receptors. *Curr Opin Pharmacol* 9:15-23.
- Novina CD, Roy AL (1996) Core promoters and transcriptional control. *Trends Genet* 12:351-355.
- Oda H, Iwata I, Yasunami M, Ohkubo H (2000) Structure of the mouse NDRF gene and its regulation during neuronal differentiation of P19 cells. *Brain Res Mol Brain Res* 77:37-46.
- Osoegawa K, Tateno M, Woon PY, Frengen E, Mammoser AG, Catanese JJ, Hayashizaki Y, de Jong PJ (2000) Bacterial artificial chromosome libraries for mouse sequencing and functional analysis. *Genome Res* 10:116-128.
- Parker D, Ferreri K, Nakajima T, LaMorte VJ, Evans R, Koerber SC, Hoeger C, Montminy MR (1996) Phosphorylation of CREB at Ser-133 induces complex formation with CREB-binding protein via a direct mechanism. *Mol Cell Biol* 16:694-703.
- Pasternack SM, von Kügelgen I, Aboud KA, Lee YA, Rüschenhoff F VK, Hillmer AM, Molderings GJ, Franz T, Ramirez A, Nürnberg P, Nöthen MM, Betz RC. (2008) G protein-coupled receptor P2Y5 and its ligand LPA are involved in maintenance of human hair growth. *Nat Genet* 40:329-334.
- Peeva GP, Angelova SK, Guntinas-Lichius O, Streppel M, Irintchev A, Schütz U, Popratiloff A, Savaskan NE, Bräuer AU, Alvanou A, Nitsch R, Angelov DN (2006) Improved outcome of facial nerve repair in rats is associated with enhanced regenerative response of motoneurons and augmented neocortical plasticity. *Eur J Neurosci* 8:2152-2162.
- Porcher C, Swat W, Rockwell K, Fujiwara Y, Alt FW, Orkin SH (1996) The T cell leukemia oncoprotein SCL/tal-1 is essential for development of all hematopoietic lineages. *Cell* 86:47-57.
- Radeff-Huang J, Seasholtz TM, Matteo RG, Brown JH (2004) G protein mediated signaling pathways in lysophospholipid induced cell proliferation and survival. *J Cell Biochem* 92:949-966.
- Ramakers GJ, Moolenaar WH (1998) Regulation of astrocyte morphology by RhoA and lysophosphatidic acid. *Exp Cell Res* 245:252-262.
- Ross SE, Greenberg ME, Stiles CD (2003) Basic helix-loop-helix factors in cortical

- development. *Neuron* 39:13-25.
- Rudnicki MA, Schnegelsberg PN, Stead RH, Braun T, Arnold HH, Jaenisch R (1993) MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* 75:1351-1359.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Saneyoshi T, Wayman G, Fortin D, Davare M, Hoshi N, Nozaki N, Natsume T, Soderling TR (2008) Activity-dependent synaptogenesis: regulation by a CaM-kinase kinase/CaM-kinase I/betaPIX signaling complex. *Neuron* 57:94-107.
- Sassone-Corsi P (1995) Transcription factors responsive to cAMP. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11:355-377.
- Savaskan NE, Bräuer AU, Nitsch R (2004) Molecular cloning and expression regulation of PRG-3, a new member of the plasticity-related gene family. *Eur J Neurosci* 1:212-220.
- Schoenherr CJ, Anderson DJ (1995) Silencing is golden: negative regulation in the control of neuronal gene transcription. *Curr Opin Neurobiol* 5:566-571.
- Schumacher KA, Classen HG, Späth M (1979) Platelet aggregation evoked in vitro and in vivo by phosphatidic acids and lysoderivatives: identity with substances in aged serum (DAS). *Thromb Haemost* 42:631-640.
- Schwab MH, Druffel-Augustin S, Gass P, Jung M, Klugmann M, Bartholomae A, Rossner MJ, Nave KA (1998) Neuronal basic helix-loop-helix proteins (NEX, neuroD, NDRF): spatiotemporal expression and targeted disruption of the NEX gene in transgenic mice. *J Neurosci* 18:1408-1418.
- Schwab MH, Bartholomae A, Heimrich B, Feldmeyer D, Druffel-Augustin S, Goebbels S, Naya FJ, Zhao S, Frotscher M, Tsai MJ, Nave KA (2000) Neuronal basic helix-loop-helix proteins (NEX and BETA2/Neuro D) regulate terminal granule cell differentiation in the hippocampus. *J Neurosci* 20:3714-3724.
- Schweizer FE, Dresbach T, DeBello WM, O'Connor V, Augustine GJ, Betz H (1998) Regulation of neurotransmitter release kinetics by NSF. *Science* 279:1203-1206.
- Shah BH, Catt KJ (2005) Roles of LPA3 and COX-2 in implantation. *Trends Endocrinol Metab* 16:397-399.
- Shieh SY, Tsai MJ (1991) Cell-specific and ubiquitous factors are responsible for the enhancer activity of the rat insulin II gene. *J Biol Chem* 266:16708-16714.
- Shimizu C, Akazawa C, Nakanishi S, Kageyama R (1995) MATH-2, a mammalian helix-loop-helix factor structurally related to the product of *Drosophila* proneural gene *atonal*, is specifically expressed in the nervous system. *Eur J Biochem* 229:239-248.
- Sigal YJ, McDermott MI, Morris AJ (2005) Integral membrane lipid phosphatases/phosphotransferases: common structure and diverse functions. *Biochem J* 387:281-293.
- Sigal YJ, Quintero OA, Cheney RE, Morris AJ (2007) Cdc42 and ARP2/3-independent regulation of filopodia by an integral membrane lipid-phosphatase-related protein. *J Cell Sci* 120:340-352.
- Söllner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, Rothman JE (1993) SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362:318-324.
- Spohr TC, Choi JW, Gardell SE, Herr DR, Rehen SK, Gomes FC, Chun J (2008) Lysophosphatidic acid receptor-dependent secondary effects via astrocytes promote neuronal differentiation. *J Biol Chem* 283:7470-7479.
- Stukey J, Carman GM (1997) Identification of a novel phosphatase sequence motif. *Protein Sci* 6:469-472.
- Tabata K, Baba K, Shiraishi A, Ito M, Fujita N (2007) The orphan GPCR GPR87 was deorphanized and shown to be a lysophosphatidic acid receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 363:861-866.

- Thayer MJ, Tapscott SJ, Davis RL, Wright WE, Lassar AB, Weintraub H (1989) Positive autoregulation of the myogenic determination gene MyoD1. *Cell* 58:241-248.
- Tokumitsu H, Hatano N, Tsuchiya M, Yurimoto S, Fujimoto T, Ohara N, Kobayashi R, Sakagami H (2010) Identification and characterization of PRG-1 as a neuronal calmodulin-binding protein. *Biochem J* 431:81-91.
- Trimbuch T et al. (2009) Synaptic PRG-1 modulates excitatory transmission via lipid phosphate-mediated signaling. *Cell* 138:1222-1235.
- Tully T, Preat T, Boynton SC, Del Vecchio M (1994) Genetic dissection of consolidated memory in *Drosophila*. *Cell* 79:35-47.
- Uesaka N, Hirai S, Maruyama T, Ruthazer ES, Yamamoto N (2005) Activity dependence of cortical axon branch formation: a morphological and electrophysiological study using organotypic slice cultures. *J Neurosci* 25:1-9.
- Uittenbogaard M, Chiaramello A (2002) Constitutive overexpression of the basic helix-loop-helix Nex1/MATH-2 transcription factor promotes neuronal differentiation of PC12 cells and neurite regeneration. *J Neurosci Res* 67:235-245.
- Uittenbogaard M, Chiaramello A (2004) Expression profiling upon Nex1/MATH-2-mediated neurogenesis in PC12 cells and its implication in regeneration. *J Neurochem* 91:1332-1343.
- Uittenbogaard M, Baxter KK, Chiaramello A (2010a) NeuroD6 genomic signature bridging neuronal differentiation to survival via the molecular chaperone network. *J Neurosci Res* 88:33-54.
- Uittenbogaard M, Baxter KK, Chiaramello A (2010b) The neurogenic basic helix-loop-helix transcription factor NeuroD6 confers tolerance to oxidative stress by triggering an antioxidant response and sustaining the mitochondrial biomass. *ASN Neuro* 2:e00034.
- Uittenbogaard M, Martinka DL, Johnson PF, Vinson C, Chiaramello A (2007) 5'UTR of the neurogenic bHLH Nex1/MATH-2/NeuroD6 gene is regulated by two distinct promoters through CRE and C/EBP binding sites. *J Neurosci Res* 85:1-18.
- van Corven EJ, Groenink A, Jalink K, Eichholtz T, Moolenaar WH (1989) Lysophosphatidate-induced cell proliferation: identification and dissection of signaling pathways mediated by G proteins. *Cell* 59:45-54.
- van Meeteren LA, Moolenaar WH (2007) Regulation and biological activities of the autotaxin-LPA axis. *Prog Lipid Res* 46:145-160.
- Wang Y, Schnegelsberg PN, Dausman J, Jaenisch R (1996) Functional redundancy of the muscle-specific transcription factors Myf5 and myogenin. *Nature* 379:823-825.
- Watterson DM, Harrelson WG, Keller PM, Sharief F, Vanaman TC (1976) Structural similarities between the Ca²⁺-dependent regulatory proteins of 3':5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase and actomyosin ATPase. *J Biol Chem* 251:4501-4513.
- Wayman GA, Impey S, Marks D, Saneyoshi T, Grant WF, Derkach V, Soderling TR (2006) Activity-dependent dendritic arborization mediated by CaM-kinase I activation and enhanced CREB-dependent transcription of Wnt-2. *Neuron* 50:897-909.
- Weintraub H, Dwarki VJ, Verma I, Davis R, Hollenberg S, Snider L, Lassar A, Tapscott SJ (1991) Muscle-specific transcriptional activation by MyoD. *Genes Dev* 5:1377-1386.
- Whiteheart SW, Matveeva EA (2004) Multiple binding proteins suggest diverse functions for the N-ethylmaleimide sensitive factor. *J Struct Biol* 146:32-43.
- Whiteheart SW, Schraw T, Matveeva EA (2001) N-ethylmaleimide sensitive factor (NSF) structure and function. *Int Rev Cytol* 207:71-112.
- Wierstra I (2008) Sp1: emerging roles--beyond constitutive activation of TATA-less housekeeping genes. *Biochem Biophys Res Commun* 372:1-13.
- Xia Z, Storm DR (2005) The role of calmodulin as a signal integrator for synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 6:267-276.
- Yamada M, Shida Y, Takahashi K, Tanioka T, Nakano Y, Tobe T, Yamada M (2008) Prgl is

- regulated by the basic helix-loop-helix transcription factor Math2. *J Neurochem* 106:2375-2384.
- Yamamoto N, Kurotani T, Toyama K (1989) Neural connections between the lateral geniculate nucleus and visual cortex in vitro. *Science* 245 245:192-194.
- Yamamoto N, Yamada K, Kurotani T, Toyama K (1992) Laminar specificity of extrinsic cortical connections studied in coculture preparations. *Neuron* 9:217-228.
- Ye X, Skinner MK, Kennedy G, Chun J (2008) Age-dependent loss of sperm production in mice via impaired lysophosphatidic acid signaling. *Biol Reprod* 79:328-336.
- Yin JC, Wallach JS, Del Vecchio M, Wilder EL, Zhou H, Quinn WG, Tully T (1994) Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in *Drosophila*. *Cell* 79:49-58.
- Yuan XB, Jin M, Xu X, Song YQ, Wu CP, Poo MM, Duan S (2003) Signalling and crosstalk of Rho GTPases in mediating axon guidance. *Nat Cell Biol* 5:38-45.
- Zhang QX, Pilquil CS, Dewald J, Berthiaume LG, Brindley DN (2000) Identification of structurally important domains of lipid phosphate phosphatase-1: implications for its sites of action. *Biochem J* 345:181-184.
- Zhang X, Odom DT, Koo SH, Conkright MD, Canettieri G, Best J, Chen H, Jenner R, Herbolsheimer E, Jacobsen E, Kadam S, Ecker JR, Emerson B, Hogenesch JB, Unterman T, Young RA, Montminy M (2005) Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:4459-4464.
- zur Lage PI, Jarman AP (2010) The function and regulation of the bHLH gene, *cato*, in *Drosophila* neurogenesis. *BMC Dev Biol*:10:34.

10. Danksagung

Herrn Professor Robert Nitsch danke ich für die Vergabe dieses interessanten Themas. Meinen herzlichsten Dank an Prof. Rupert Mutzel, der sich bereit erklärte als Erstgutachter dieser Arbeit zu wirken.

Bei Prof. Anja Bräuer möchte ich mich für die Unterstützung auf so vielen Ebenen bedanken. Wenn immer Probleme auftraten, ob akademischer, organisatorischer oder logistischer Natur, habe ich bei Prof. Anja immer ein offenes Ohr und Unterstützung gefunden. Dr. Olaf Ninnemann danke ich für die Vermittlung von theoretischem und praktischem Wissen und das Korrekturlesen dieser Arbeit. Denis Lajko und Ines Lesniak gilt mein Dank für ihre tatkräftige, engagierte Mitarbeit im Labor. Brita Vorwerk, Leslie Schlüter, Thorsten Trimbuch, Jan Baumgart, Nora Streu und alle hier unbenannten ehemaligen Mitarbeiter der AG Nitsch waren mir durch lebhaftige Diskussionen und fachkundige Ratschläge eine Stütze bei der Erstellung dieser Arbeit. Bei unserer großartigen Sekretärin Marni Pollrich möchte ich mich für ihre engagierte Unterstützung bedanken. Meiner ehemaligen Nachbarin Dr. Nicola Brandt danke ich für das Korrekturlesen diverser Manuskripte, die tatkräftige Unterstützung im Laboralltag und der Gewährung umfassenden, seelischen Beistandes. Meinen Schreibtischnachbarn und Schutzengeln Arne Battefeld und Konstantin Stadler danke ich für ihre Geduld beim Ertragen meiner hysterischen Ausbrüche, wenn immer ein Rechner mich attackierte. Arne und Konstantin haben sich ihre Flügel durch ständige Schokoladen- und Koffeinzufuhr, sowie durch die Behebung jeglicher Hardwareprobleme in unserem Büro verdient. Bei Dr. Ulf Strauss möchte ich mich für das Asyl in seinem Büro und die damit verbundenen, hilfreichen Diskussionen bedanken. Eine lange Danksagung, an meine alte Arbeitsgruppe aus dem Institut für Genetik der HU, darf hier natürlich nicht fehlen, meine alten Kollegen standen mir immer mit Rat und Tat zur Seite. Insbesondere danke ich meinem ehemaligen Betreuer Dr. Karsten Liere für all seine wertvollen Ratschläge und Hilfestellungen, sowie für seine Fähigkeit sich in ein fleischgewordenes Exemplar des „The Hitchhiker’s Guide to the Galaxy“ zu verwandeln, um mir vor allem eine Botschaft zu vermitteln: keine Panik. Lieber Karsten, danke für deinen Beistand im Verlauf meiner gesamten Dissertation, ohne deine Hilfe hätte es definitiv, viel länger gedauert und ich hätte ein Meer an Tränen vergossen.

All jenen gegenüber die ich namentlich nicht nennen konnte, muß ich mich damit entschuldigen, daß ich es bei einer Seite zum Thema Danksagung belassen wollte.