

**Charakterisierung synapsenassoziierter Proteine  
des Haushuhns (*Gallus gallus domesticus*)**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereichs Biologie  
der Johannes Gutenberg Universität Mainz

vorgelegt von  
**Susanne Thiessen**

Hamburg, Februar 2001

Zusammenfassung.....	1
Abkürzungen.....	2
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>3</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>9</b>
2.1 Materialien.....	9
2.1.1 Antikörper .....	9
2.1.2 DNA-Banken .....	9
2.1.3 Expressionsvektoren.....	9
2.1.4 Vektoren zur DNA-Klonierung.....	10
2.1.5 Primer für PCR.....	10
2.1.6 Primer für die Sequenzierung genomischer DNA-Klone.....	11
2.1.7 Oligonukleotide für <i>in situ</i> Hybridisierung .....	11
2.1.8 radioaktive Nukleotide .....	12
2.1.9 Enzyme .....	12
2.2 Methoden.....	12
2.2.1 Durchmusterung einer cDNA-Bank.....	12
2.2.1.1 Ausplattieren der $\lambda$ -Phagen und Herstellung von Filterabzügen.....	12
2.2.1.2 Herstellung einer cDNA Sonde .....	13
2.2.1.3 Prähybridisierung und Hybridisierung .....	13
2.2.1.4 Autoradiografie und Isolierung einzelner Phagenkolonien.....	13
2.2.1.5 Präparation der Phagen-DNA .....	13
2.2.1.6 Subklonierung der cDNA-Fragmente in Bluescript.....	14
2.2.1.7 Blau-weiß-Selektion (alpha-Komplementation) .....	14
2.2.1.8 Plasmid Minipräparationen .....	15
2.2.1.9 Auswertung der Sequenzen .....	15
2.2.2 Bestimmung der cDNA-Sequenz durch PCR.....	15
2.2.2.1 Addition von einzelsträngigen Adenin-Enden an <i>blunt-end</i> PCR-Produkte.....	16
2.2.2.2 Subklonierung der PCR-Produkte in p-Gem .....	16
2.2.3 Analyse der Genstruktur von SAP97/SAP90 .....	17
2.2.3.1 Durchmusterung einer genomischen DNA-Bank.....	17
2.2.3.2 Präparation der Phagen-DNA aus der genomischen DNA-Bank.....	17
2.2.3.3 PCR mit genomischer DNA .....	17
2.2.3.4 Subklonierung der PCR-Produkte.....	18
2.2.4 Analyse der Genexpression durch <i>in situ</i> Hybridisierung .....	18
2.2.4.1 Herstellung von Gefrierschnitten .....	18
2.2.4.2 Herstellung der Sonden .....	19
2.2.4.3 Hybridisierung.....	20
2.2.4.4 Autoradiografie.....	20
2.2.5 Abhängigkeit der Expressionsstärke von Prägung .....	20

2.2.5.1	Prägung der Küken .....	20
2.2.5.2	Bestimmung der relativen Genexpression .....	22
<b>2.2.6</b>	<b>Western Blot .....</b>	<b>22</b>
2.2.6.1	Herstellung von Proteinextrakt aus Gehirn .....	22
2.2.6.2	SDS Gelelektrophorese und Blotverfahren .....	22
2.2.6.3	Inkubation der Antikörper .....	23
2.2.6.4	Detektion der Antikörper durch Chemolumineszens .....	23
<b>2.2.7</b>	<b>Zellkultur und Transfektion.....</b>	<b>23</b>
2.2.7.1	Kultivierung von Gliazellen .....	24
2.2.7.2	Kultivierung von Hippocampusneuronen.....	25
2.2.7.3	Transfektion .....	26
2.2.7.4	Präparation von Plasmid-DNA .....	27
2.2.7.5	Fixierung der Neuronen und Immuncytochemie.....	27
2.2.7.6	Mikroskopie.....	27
<b>2.2.8</b>	<b>Firmenverzeichnis .....</b>	<b>28</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>29</b>
<b>3.1</b>	<b>Sequenzanalyse der synapsenassoziierten Proteine des Huhns.....</b>	<b>29</b>
<b>3.1.1</b>	<b>Klonierung der SAP cDNA und Charakterisierung der Sequenzen.....</b>	<b>29</b>
3.1.1.1	SAP90/SAP97 .....	29
3.1.1.2	Chapsyn110.....	35
3.1.1.3	SAP102 .....	35
<b>3.1.2</b>	<b>Vergleich der synapsenassoziierten Proteine des Huhns .....</b>	<b>39</b>
<b>3.2</b>	<b>Partielle Analyse des SAP90/SAP97-Gens .....</b>	<b>42</b>
<b>3.3</b>	<b>Expressionsmuster der synapsenassoziierten Proteine im Gehirn des Huhns.....</b>	<b>47</b>
<b>3.4</b>	<b>Abhängigkeit der SAP-Genexpression von akustischer Prägung.....</b>	<b>53</b>
<b>3.5</b>	<b>Western Blot mit SAP des Huhns.....</b>	<b>56</b>
<b>3.6</b>	<b>Expression rekombinanter SAP in Neuronen der Ratte.....</b>	<b>58</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>61</b>
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>77</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>832</b>

## Zusammenfassung

Die Familie der synapsenassoziierten Proteine (SAP) umfaßt bei Säugern vier Proteine, die sich durch eine bestimmte Abfolge von Proteindomänen auszeichnen. Hierzu gehören die Proteine SAP90 (=PSD-95), SAP97, SAP102 (=PSD-93) und Chapsyn110. Die Proteine enthalten drei PDZ-Domänen, eine SH3-Domäne und eine GK-Domäne. Die verschiedenen Domänen können an andere Proteine binden und vermitteln so verschiedene Proteininteraktionen. Es wird angenommen, daß SAP die Verankerung von Neurotransmitterrezeptoren in der synaptischen Membran und die Verbindung dieser zu Zytoskelettproteinen bewerkstelligen. Außerdem stellen sie Verbindungen zu Signaltransduktionsmolekülen her. In dieser Arbeit wurden die synapsenassoziierten Proteine des Huhns charakterisiert. Die codierende Region der cDNA von SAP90, SAP97 und Chapsyn110 des Huhns wurde vollständig sequenziert. Die cDNA von SAP102 des Huhns wurde teilweise sequenziert. Bei Chapsyn110 wurde eine neue Isoform gefunden, die beim Säuger bisher nicht bekannt war. Die teilweise Analyse von genomischer DNA durch PCR und durch genomische DNA-Klone ergab, daß SAP90 und SAP97 durch alternatives Spleißen einer gemeinsamen Vorläufer RNA von einem Gen gebildet werden. Durch radioaktive *in situ* Hybridisierung wurde die mRNA-Verteilung von SAP90, SAP97 und Chapsyn110 im Gehirn einen Tag alter Hühner untersucht. Dies zeigte, daß die SAP90-mRNA im gesamten Vorderhirn, mit Ausnahme des Ectostriatums und des Paleostriatum primitivum vorhanden ist. Der Gehalt an SAP90-mRNA ist im Hyperstriatum ventrale, im Paleostriatum augmentatum und im Lobus parolfactorius am höchsten. Im Mittelhirn und Cerebellum kommt SAP90 fast gar nicht vor. Die Verteilung der SAP90-mRNA und von NMDA-Rezeptoren im Gehirn des Huhns ist sehr ähnlich. SAP97 kommt im Ectostriatum und Palaostriatum primitivum und im Mittelhirn und Cerebellum vor, also in den Bereichen, in denen SAP90 nicht vorhanden ist. Die mRNA von Chapsyn110 ist in allen Teilen des Vorderhirns sowie im Mittelhirn und Cerebellum vorhanden. Eine starke Expression erfolgt im medialen Teil des Neostriatum und Hyperstriatum ventrale (MNH), im Feld L und in den Purkinjezellen. Vielfältige morphologische und biochemische Veränderungen, die nach der Prägung in Synapsen stattfinden, deuteten darauf hin, daß SAP möglicherweise bei Lernvorgängen eine Rolle spielen können. Um dies zu untersuchen, wurde die Abhängigkeit der SAP-Genexpression vom Lernvorgang der Prägung an Küken untersucht. Der relative mRNA-Gehalt von SAP90, SAP97 und Chapsyn110 wurde 30 Minuten, 5 Stunden und 10 Stunden nach einer akustischen Prägung der Küken gemessen. Fünf Stunden nach akustischer Prägung war der Gehalt der SAP90-mRNA, im anterioren lateralen Hyperstriatum ventrale, um 13% erhöht. Der mRNA-Gehalt in anderen Regionen und der anderen SAP-Gene war unverändert. Dies deutet darauf hin, daß SAP90 bei Lernvorgängen möglicherweise eine Rolle spielt. Um die Verteilung von SAP90 und SAP97 in Neuronen zu untersuchen, wurden die Proteine der Ratte in kultivierten Hippocampusneuronen exprimiert. Eine unterschiedliche Verteilung der beiden Proteine konnte nicht gefunden werden.

## Abkürzungen

APV	<i>DL-2-amino-5-phosphono valeric acid</i>
AS	Aminosäuren
cDNA	copy-DNA, DNA-Kopie einer mRNA
E	Ectostriatum
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
HA	Hyperstriatum accessorium
HD	Hyperstriatum dorsale
HI	Hyperstriatum intercalatum supremum
HV	Hyperstriatum ventrale
IMHV	intermedialer und medialer Teil des Hyperstriatum ventrale
kb	Kilobasen bzw. Kilobasenpaare
kDA	Kilodalton
LPO	Lobus parolfactorius
Mld	Nucleus mesencephalicus lateralis, pars dorsalis
MNH	medialer Teil des Neostriatum und Hyperstriatum ventrale
mRNA	<i>messenger RNA</i>
N	Neostriatum
Ndc	dorsocaudaler Teil des Neostriatum
NMDA	N-methyl-D-aspartat
AMPA	L- $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionat
nt	Nukleotide
PA	Paleostriatum augmentatum
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase-chain-reaktion</i> )
PP	Paleostriatum primitivum
SAP	synapsenassoziierte Proteine
UTR	untranslatierte Region

## 1 Einleitung

Die Signalübertragung zwischen Neuronen erfolgt an Synapsen. Chemische Synapsen sind spezialisierte Kommunikationsstellen, an denen ein elektrisches Signal durch Transmitterfreisetzung in ein chemisches Signal umgewandelt wird. Dieses wird an der postsynaptischen Membran wiederum in ein elektrisches Signal verwandelt. Dieser komplizierte Vorgang erfordert das Zusammenspiel einer großen Zahl von Proteinen und Signalmolekülen, die in der prä- und postsynaptischen Membran verankert sind oder mit ihr in Verbindung stehen. Die synaptischen Membranen sind eng mit Filamenten des Zytoskeletts assoziiert. An die zytoplasmatische Seite der postsynaptischen Membran schließt sich ein dichtes Geflecht aus Proteinfilamenten an, das als postsynaptische Dichte (PSD) bezeichnet wird, da es im Elektronenmikroskop als dichte Struktur sichtbar ist. Die postsynaptische Dichte ist in excitatorischen Synapsen des zentralen Nervensystems (ZNS) besonders dick. Sie ist in inhibitorischen Synapsen deutlich dünner ausgebildet. In synaptischen Proteinfractionen wurden verschiedene Mitglieder einer Proteinfamilie gefunden, die seither als Familie der synapsenassoziierten Proteine (SAP) oder als PSD95/SAP90-Proteinfamilie bezeichnet wird (Garner, 2000), (Kennedy, 1997). In Säugetieren umfaßt diese Familie vier Proteine, die als SAP90/PSD95 (synapsenassoziiertes Protein 90 bzw. *postsynaptic density protein 95*), SAP97 (synapsenassoziiertes Protein 97), SAP102 (synapsenassoziiertes Protein 102) und Chapsyn110/PSD93 (*channel associated protein 110* bzw. *postsynaptic density protein 93*) bezeichnet werden. Zur Vereinfachung wird SAP90/PSD95 in dieser Arbeit als SAP90 und Chapsyn110/PSD93 als Chapsyn110 bezeichnet.

Die vier synapsenassoziierten Proteine haben eine ähnliche molekulare Struktur. Sie bestehen aus drei aminoterminalen PDZ-Domänen, benannt nach drei Proteinen, in denen sie vorkommen: PSD95/DLG/ZO1, einer SH3-Domäne (*src homology 3*) und einer Region, die starke Ähnlichkeit zu niedermolekularen Guanylatkinasen besitzt und als GK-Domäne bezeichnet wird. Die GK-Domäne besitzt keine Enzymaktivität.

Die Funktion der genannten Domänen besteht in der Vermittlung von Proteininteraktionen. Inzwischen konnten Interaktionen zwischen SAP und einer Reihe anderer synaptischer Proteine nachgewiesen werden (Abb. 1) (Fujita und Kurachi, 2000). Die drei PDZ-Domänen sind selektiv für unterschiedliche Bindungspartner, wobei die PDZ-Domänen 1+2 teilweise die selben Proteine binden können. Im Hefe Zwei-Hybrid-System konnte

gezeigt werden, daß SAP mit der 1. und 2. PDZ-Domäne an Glutamatrezeptoren des NMDA-Typs und an bestimmte  $K^+$ -Kanäle binden. Dabei binden sie an den Carboxyterminus der Rezeptoren, die das Motiv T/SXV besitzen (*singel letter code*, X ist eine beliebige Aminosäure). Werden NMDA-Rezeptoren zusammen mit SAP90 oder mit Chapsyn110 in COS7-Zellen exprimiert, so bilden sich Rezeptor-*Cluster* auf der Oberfläche der Zellen. Diese *Cluster* bilden sich nicht, wenn man NMDA-Rezeptoren oder SAP90 bzw. Chapsyn110 alleine exprimiert (Kim et al., 1996). Die dritte PDZ-Domäne von SAP90 bindet an Neuroligine (Irie et al., 1997). Neuroligine sind neuronale Zelladhäsionsproteine, die an Neurexine in der benachbarten Membran binden und so eine Verbindung zwischen post- und präsynaptischer Membran herstellen können (Abb. 1). Diese Befunde deuten darauf hin, daß SAP90 zum Aufbau verschiedener Transmembranprotein-*Cluster* beiträgt und diese in der synaptischen Membran verankert. SAP97 kommt als einziges dieser Proteine auch in epithelialen Zellen vor. Dort ist es in der lateralen Membran an interzellulären Kontaktstellen lokalisiert. Mutationen in dem zu SAP97 homologen Protein von *Drosophila* DLG (*discs large*) führen zu einem Verlust der Zelladhäsion und der Zellpolarität in den Imaginalscheiben und schließlich zu einem übermäßigen Wachstum. Dies zeigt, daß SAP für die Zelladhäsion und Differenzierung eine wichtige Rolle spielen. Ein Protein namens CRIPT bindet an die 3. PDZ-Domäne von SAP90 und an Mikrotubuli. Es stellt so eine Verbindung zwischen SAP90 und dem Zytoskelett her, was vermutlich für die Rekrutierung der SAP an ihren Zielort bedeutend ist (Niethammer et al., 1998). Glutamatrezeptoren vom Typ der Kainatrezeptoren können an die SH3-Domäne von SAP90 binden (Fujita und Kurachi, 2000). SAPAP (SAP90/PSD95 assoziierte Proteine (Takeuchi, 1997)), zu denen vier verwandte Proteine gehören, binden an die GK-Domäne der SAP. Dieselben Proteine wurden von einer anderen Gruppe GKAP (Guanylat-Kinase-assoziierte Proteine) genannt (Naisbitt et al., 1997). Es wurden außerdem verschiedene Signalmoleküle gefunden, die mit SAP assoziiert sind. So konnte gezeigt werden, daß SynGAP, ein synaptisches GTPase aktivierendes Protein, und die neuronale Stickoxid-Synthase (nNOS) mit SAP90 und SAP102 über deren PDZ-Domänen interagieren. Durch Coimmunpräzipitation wurde gezeigt, daß SAP90 und SAP102 auch *in vivo* mit SynGAP und NMDA-Rezeptoruntereinheiten zusammen in Komplexen vorkommen (Müller et al., 1996), (Kennedy, 1998). Neuronale Stickoxid-Synthase kann durch Freisetzung von NO, das als retrograder *Messenger* in die präsynaptische Membran diffundiert, die

Neurotransmitterfreisetzung beeinflussen (Bredt, 1992). Das zeigt, daß SAP eine wichtige Rolle bei der Kopplung von Transmitterrezeptoren an Signaltransduktionsmoleküle spielen. SAP scheinen somit eine zentrale Rolle beim Aufbau funktioneller Synapsen zu spielen, indem sie die zielgerichtete Verteilung von Rezeptoren bewerkstelligen, und an der Organisation von Signaltransduktionskomplexen beteiligt sind.

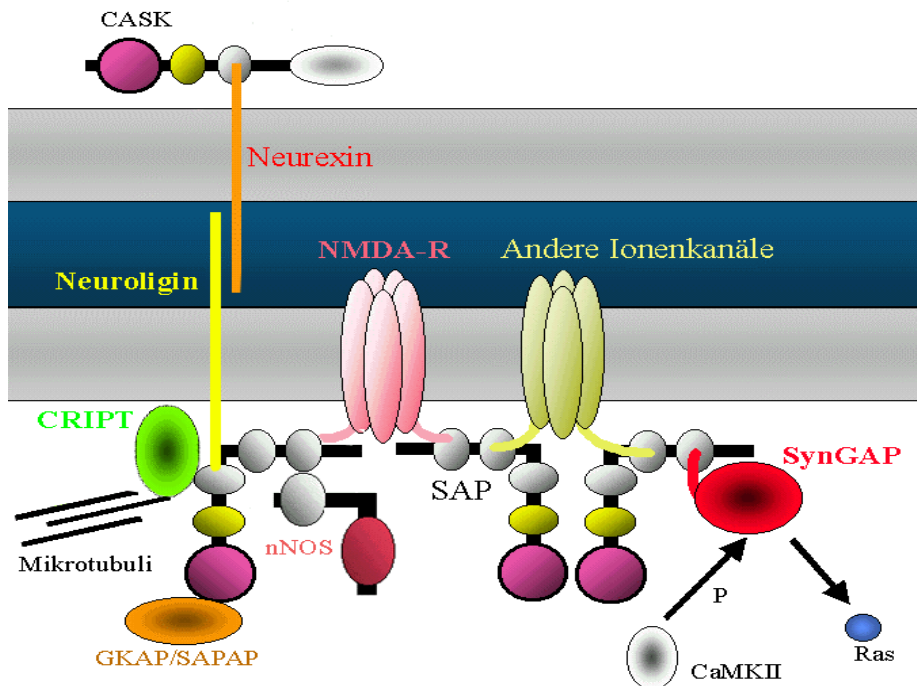


Abb. 1 Schematische Darstellung der Interaktionen zwischen SAP und anderen synaptischen Proteinen. Die PDZ-Domänen sind als graue Kugeln, die SH3-Domänen als gelbe Kugeln und die GK-Domänen als violette Kugeln dargestellt. Die Zellmembranen sind in grau, der extrazelluläre Raum in blau dargestellt.

Indem sie eine Verbindung zwischen Rezeptoren und Signaltransduktionsmolekülen herstellen, können SAP zur Modulation der synaptischen Aktivität beitragen. Veränderungen der Signalübertragungseffizienz sowie morphologische Veränderungen der Synapsen und Veränderung der Synapsendichte scheinen die molekulare Grundlage für Lernvorgänge zu bilden. Auf molekularer Ebene konnte gezeigt werden, daß NMDA-Rezeptoren bei Lernvorgängen eine Rolle spielen. Durch die Verabreichung des NMDA-Rezeptorantagonisten APV kann der Lernerfolg bei Hühnern (Bock, 1996), (Steele, 1995) und Mäusen (Morris, 1986) unterbunden werden. Transgene Mäuse, denen das Gen für die NMDA-Rezeptoruntereinheit GluR $\epsilon$ 1 (NR2A) fehlte, waren in ihrer Lernfähigkeit stark beeinträchtigt (Sakimura, 1995). Dagegen wurde gezeigt, daß Mäuse, denen die AMPA-Rezeptoruntereinheit GluR-A fehlt, kein verändertes räumliches Lernvermögen hatten (Zamanillo, 1999). Im Hühnergehirn konnte außerdem gezeigt werden, daß die Zahl der



NMDA-Rezeptoren nach der Prägung in bestimmten Gehirnbereichen erhöht ist (Steele, 1995), (McCabe, 1988), (Stewart, 1992). Ebenso erfolgt nach Lernvorgängen eine Vergrößerung der postsynaptische Dichte (Horn et al., 1985). Da SAP in synaptischen Strukturen akkumuliert sind und mit NMDA-Rezeptoren und Signaltransduktionsmolekülen interagieren, lassen diese Ergebnisse vermuten, daß sie an Lernvorgängen und plastischen Veränderungen der Synapsen beteiligt sind. Erste Hinweise darauf ergaben sich aus Untersuchungen an Mäusen mit einem mutierten SAP90-Gen. Diese Mäuse waren in ihrer Fähigkeit des räumlichen Lernens stark beeinträchtigt (Migaud, 1999).

Viele der Untersuchungen über Lernvorgänge wurden am Huhn und anderen Vögeln durchgeführt. Als Untersuchungsobjekt für Gedächtnisstudien eignet sich das Huhn besonders gut, da bei der Prägung von Küken ein sehr starker und irreversibler Lerneffekt auftritt, der zudem leicht induzierbar und gut kontrollierbar ist. Die Prägung geschieht in der Natur kurz nach dem Ausschlüpfen der Küken. Während die Küken die Rufe der Mutterhenne hören, lernen sie diese Laute wiederzuerkennen. Gleichzeitig werden sie auf den Anblick der Mutter visuell geprägt. Dadurch bildet sich eine enge soziale Bindung zwischen Henne und Küken aus, die für das Küken überlebenswichtig ist. Dieser Prägungsvorgang kann mit anderen Lauten und Objekten experimentell nachvollzogen werden. In dieser Arbeit sollen durch Prägung hervorgerufene Veränderungen der SAP-Genexpression im Gehirn des Huhns untersucht werden. Obwohl das Vogelgehirn äußerlich betrachtet gewisse Ähnlichkeit zum Säugerhirn hat, ist der innere Aufbau sehr unterschiedlich. Das Vorderhirn ist aus übereinanderliegenden Schichten verschiedener Ausdehnung aufgebaut (Abb. 2), die funktionelle Einheiten bilden. Das Tectum opticum ist eine seitliche Ausbuchtung des Mittelhirns und Teil des visuellen Systems. Es ist aus einer Vielzahl übereinander liegender Schichten aufgebaut. Das Cerebellum hat den auch bei Säugern erkennbaren typischen, hoch geordneten Aufbau aus Schichten von Zellkörpern und Zellfortsätzen. Ganz außen liegt die Molekularschicht, die hauptsächlich aus Zellfortsätzen besteht. Darunter liegt die Körnerschicht, in der die Zellkörper der Körnerzellen liegen und zwischen beiden liegen in einer Reihe die Zellkörper der großen Purkinjezellen (Shepherd, 1994). Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Verteilung der SAP-mRNAs durch *in situ* Hybridisierung untersucht. Um eine Zuordnung der Signale in den Autoradiogrammen zu bestimmten Gehirnarealen vorzunehmen, werden im folgenden kurz der Aufbau des Hühnergehirns und die wichtigsten akustischen und visuellen Verarbeitungswege dargestellt (Abb. 2-4).

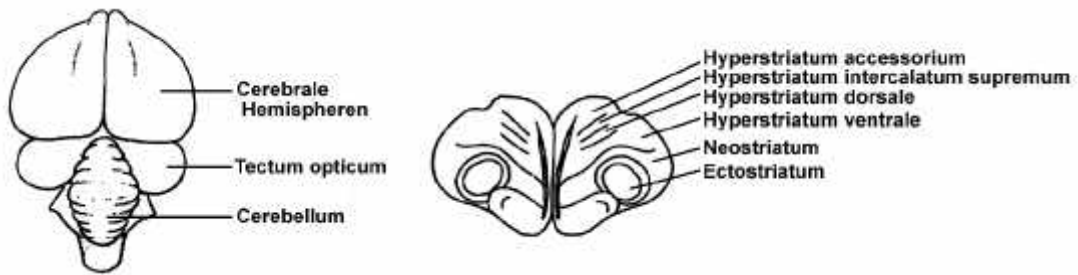


Abb. 2 Schematische Darstellung eines Vogelgehirns und eines Frontalschnitts durch das Vorderhirn. Die drei obersten Schichten (H.accessorium, H.intercalatum, H.dorsale) gehören zum sogenannten visuellen Wulst.

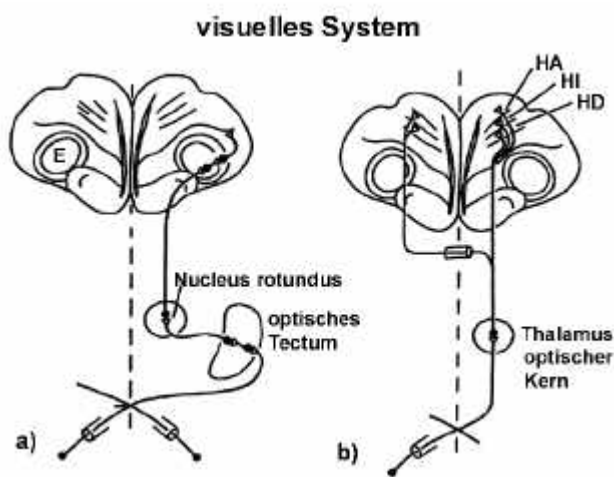


Abb. 3 Schematische Darstellung der Signalverarbeitung im visuellen System. In (a) ist der tectofugale Verarbeitungsweg dargestellt. In (b) ist der thalamofugale Verarbeitungsweg dargestellt.

E = Ectostriatum,  
 HA = Hyperstriatum accessorium,  
 HI = Hyperstriatum intercalatum supremum, HD = Hyperstriatum dorsale

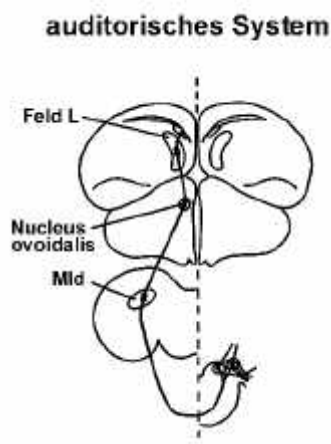


Abb. 4 Schematische Darstellung der wichtigsten Stationen akustischer Signalverarbeitung. Die Signale werden von der Cochlea über Kerne des Mittelhirns ins Vorderhirn geleitet.

Mld= Nucleus mesencephalicus lateralis, pars dorsalis

Die Verarbeitung visueller Information erfolgt auf zwei verschiedenen Wegen. Im tectofugalen Verarbeitungsweg wird die Information vom optischen Nerv über das optische Tectum zum Nucleus rotundus im Mittelhirn geleitet. Von dort wird das Signal ins Ectostriatum und schließlich in den ectostriatalen Gürtel im Vorderhirn geleitet. Im thalamofugalen Weg wird das Signal vom optischen Nerv in einen Kern des Thalamus geleitet. Die Zellen dieses Kerns projizieren zum Vorderhirn in alle drei Schichten des

visuellen Wulstes (HA, HI, HD). Akustische Signale werden von der Cochlea über zwei Kerne der Medulla in den dorsolateralen Kern des Mittelhirns (Mld) geleitet. Von dort führt der Weg in den Nucleus ovoidalis und schließlich ins Feld L im Vorderhirn. (Horn, 1985) Das Feld L besteht aus drei Schichten und ist außerdem in bestimmte frequenzspezifische Tonfelder unterteilt. Von Feld L aus besteht außerdem Verbindung zum auditorischen (caudalen) Teil des Hyperstriatum ventrale (Heil, 1991) + (Gehr D., 1999).

Ziel dieser Arbeit ist eine Charakterisierung der synapsenassoziierten Proteine des Huhns. Dazu wurden im ersten Teil der Arbeit die cDNA-Sequenzen der SAP bestimmt. Es wurde die gesamte codierende Region der SAP90-, SAP97- und Chapsyn110-cDNA und einen Teil der SAP102-cDNA kloniert. In einem Vergleich des molekularen Aufbaus der SAP von Huhn und Ratte werden Spezies-spezifische Unterschiede dargestellt. Die teilweise Charakterisierung der Genstruktur erfolgte anhand genomischer DNA-Klone und durch PCR mit genomischer DNA. Aus den ermittelten cDNA-Sequenzen wurden spezifische Sonden für die *in situ* Hybridisierung hergestellt. Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Expressionsmuster von SAP90, SAP97 und Chapsyn110 im Gehirn des Huhns durch radioaktive *in situ* Hybridisierung analysiert. Im Anschluß daran wurde die Abhängigkeit der Genexpression von Lernvorgängen untersucht. Dazu wurde der relative mRNA-Gehalt im Gehirn von naiven Küken und von Tieren, die eine akustische Prägung erfahren haben miteinander verglichen. In einer zusätzlichen Versuchsreihe wurde die subzelluläre Verteilung der SAP in kultivierten Hippocampusneuronen der Ratte untersucht. In früheren Veröffentlichungen war die subzelluläre Verteilung von SAP90 und SAP97 im Gehirn der Ratte als unterschiedlich beschrieben worden. So gab es Hinweise darauf, daß SAP97 im Hippocampus in präsynaptischen Strukturen vorhanden (Müller, 1995) ist. Im Gegensatz dazu ist SAP90 im Hippocampus postsynaptisch lokalisiert (Cho et al., 1992). Diese unterschiedliche Verteilung ließ vermuten, daß SAP90 und SAP97 spezifische Sortierungssignale tragen. Durch Expression von SAP90 und SAP97 der Ratte in kultivierten Neuronen sollte die subzelluläre Verteilung der SAP untersucht werden, um daran anschließend mögliche Signalsequenzen zu identifizieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Antikörper

- 1) *Anti-Human-PSD-95*, monoklonal aus Maus, Biomol, Hamburg
- 2) *Anti-Rat-Chapsyn110*, polyklonal aus Kaninchen, Alomone Labs, Jerusalem
- 3) *Anti-Mouse-SAP102*, polyklonal aus Kaninchen, Alomone Labs, Jerusalem
- 4) *Anti-Rat-SAP90* polyklonal aus Kaninchen aus dem Labor Craig Garner, ZMNH Hamburg, (Kistner et al., 1993)
- 5) Cy3 + Cy2 gegen Maus, Cy3 + Cy2 gegen Kaninchen, polyklonal, Jackson Immuno Research

#### 2.1.2 DNA-Banken

**cDNA-Bank:** Clontech, Vektor:  $\lambda$ gt11

Die Bank wurde mit *random Primern* von poly-A<sup>+</sup>-RNA aus Gehirn vom adulten Huhn hergestellt. Die cDNA des Huhns wurde über eine Eco RI Schnittstelle in das Phagengenom integriert.

**genomische DNA-Bank:** Clontech CL1012j, aus Leber vom adulten Huhn, Vektor: EMBL3 SP6/T7

#### 2.1.3 Expressionsvektoren

Es wurden die Expressionsvektoren pEGFP-N3 und pEGFP-C1 von Clontech verwendet, die das Reportergen EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) enthalten. In die *multiple cloning site* wurde die codierende Region von SAP90 und SAP97 kloniert. Bei der Translation entstehen Fusionsproteine aus SAP und EGFP. Bei dem Plasmid pEGFP-N3 liegt das SAP vor dem EGFP (am Aminoterminus), bei pEGFP-C1 liegt das SAP hinter dem EGFP (am Carboxyterminus). Die Plasmide enthalten einen CMV-Promotor (aus dem Cytomegalovirus).

### 2.1.4 Vektoren zur DNA-Klonierung

*Blueskript SK* von Stratagene

*p-Gem* von Promega

*Topo zero bunt Vector* von Invitrogen

### 2.1.5 Primer für PCR

In einigen Fällen wurden zwei PCR-Reaktionen hintereinander durchgeführt. Die dahinter angegebene Numerierung gibt an, bei welchem der in Abb. 7 dargestellten cDNA-Klone, die *Primer* eingesetzt wurden. Die *Primer* wurden mit Buchstaben von A bis O benannt, die in der nachfolgenden Tabelle fett gedruckt sind. Die Lage der *Primer* ist in Abb. 7 und Abb. 9 unter den selben Buchstaben gekennzeichnet. Der 3'*Primer* von Klon 8 entspricht einem Sequenzabschnitt aus der Ratte. Der 3'*Primer* von Klon 10 + 11 liegt in der 3'UTR von SAP90/SAP97.

Für die Amplifikation von cDNA wurden die folgenden *Primer* verwendet.:

1. Reaktion	<b>A</b> 5' <i>Primer</i>	ATAATTTCTGTAAATGGAGTTGACC	Klon Nr. 8
	<b>B</b> 3' <i>Primer</i>	CTGGGACCCAGATGTAAGGACC	
2.Reaktion	<b>C</b> 5' <i>Primer</i>	CAACAGCTTTGAAGAATGCAGGCC	
	<b>B</b> 3' <i>Primer</i>	wie 1	
1. Reaktion	<b>D</b> 5' <i>Primer</i>	GAACACTTCACAGCTATTATCC	Klon Nr. 9
	<b>E</b> 3' <i>Primer</i>	GAATTCATTTTTTTTTTTTTTTTTT	
2.Reaktion	<b>F</b> 5' <i>Primer</i>	ATTATCCAAGGAGACACACTGG	
	<b>E</b> 3' <i>Primer</i>	wie 1	
1. Reaktion	<b>A</b> 5' <i>Primer</i>	ATAATTTCTGTAAATGGAGTTGACC	Klon Nr.10 +11
	<b>H</b> 3' <i>Primer</i>	CTAGAGGCAGGCTCCACTGGAAGGGC	
2.Reaktion	<b>C</b> 5' <i>Primer</i>	CAACAGCTTTGAAGAATGCAGGCC	
	<b>H</b> 3' <i>Primer</i>	wie 1	
1. Reaktion	<b>J</b> 5' <i>Primer</i>	ACTTCTCCAGCCTTCCGAGCACAAC	Klon Nr.12
	<b>K</b> 3' <i>Primer</i>	AGATGTAAGGCCAGATTCTTCC	(SAP97)
1. Reaktion	<b>L</b> 5' <i>Primer</i>	ATGCTGAAACAATGGATTGTTTATGC	Klon Nr.13
	<b>K</b> 3' <i>Primer</i>	AGATGTAAGGCCAGATTCTTCC	(SAP90)

1. Reaktion    **N** 5'Primer    CTATATCACCAAGATCATTGAAGG        SAP102  
                   **O** 3'Primer    CATCATCTGCTCTCTCAAGTCGTGG

Für die Amplifikation genomischer DNA wurden die folgenden *Primer* verwendet. Es sind nur die Primer aufgeführt, die zur Synthese des erwarteten PCR-Produktes geführt haben. Die *Primer* sind mit den in fett gedruckten Zahlen benannt worden, ihre relative Lage ist in Abb. 13 dargestellt.:

1. Reaktion    **1.1**    5'Primer        ACTTCTCCAGCCTTCCG  
                   **2.1**    3'Primer        TGGTCGTCACAATGCATAAACAATCC  
 2.Reaktion    **1.2**    5'Primer        CTTCCGAGCACAACAGTGACATCAG  
                   **2.2**    3'Primer        CAGCATAGCAGGTATTTTCCCAA

### 2.1.6 Primer für die Sequenzierung genomischer DNA-Klone

5'Primer        AGAAATACCGCTATCAGG  
 3'Primer        GTTTCCTTTACTGGCG

Die Primer binden in Exon 3. Es sind nur die Primer aufgeführt, mit denen eine Sequenzierung der DNA erfolgreich war.

### 2.1.7 Oligonukleotide für *in situ* Hybridisierung

SAP90 antisense :

TGG TCG TCA CAA TGC ATA AAC AAT CCA TTG TTT CAG CAT AGC AGG

SAP97 antisense :

ACA CTT GGG CTA AGG CTG CTT GGC AGT GTT TCT GAT GTC ACT GTT

SAP90 sense :

CCT GCT ATG CTG AAA CAA TGG ATT GTT TAT GCA TTG TGA CGA CCA

SAP97 sense :

AAC AGT GAC ATC AGA AAC ACT GCC AAG CAG CCT TAG CCC AAG TGT

Chapsyn110 antisense :

TCT TCT AAA TAT TCT CCC GTC GTA ATC AGG GTG CAG TGG CTA AT

### 2.1.8 radioaktive Nukleotide

<sup>32</sup>P dCTP Amersham Pharmacia , 3000Ci/mol

<sup>35</sup>S dATP NEN Life Science Products, 12,5 mCi/ml, 1250 Ci/mmol

### 2.1.9 Enzyme

Die verwendeten Enzyme wurden von den folgenden Firmen bezogen und gemäß den Herstellerangaben eingesetzt.

Restriktionsenzyme: Life Technologies, New England Biolabs, Roche (Boehringer Mannheim), MBI Fermentas

Taq-Polymerase und Pfu-Polymerase: Promega

*Advatage Genomic Polamerase-Mix* von Clontech

Terminale Transferase: Promega

T4-Ligase: Life Technologies

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Durchmusterung einer cDNA-Bank

Zur Identifizierung von SAP cDNA-Klonen des Huhns wurde eine cDNA-Bank durchmustert.

#### 2.2.1.1 Ausplattieren der $\lambda$ -Phagen und Herstellung von Filterabzügen

Zur Anzucht der  $\lambda$ -Phagen wurde die Bakterienstämme C600 und K802 verwendet (<http://www.neb.com>) Die Phagen wurden in einer Dichte von 50000 Pfu/Platte (in Petrischalen  $\varnothing$ 12 cm) auf LB-Agar ausplattiert (Sambrook et al., 1989) und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach Abkühlen der Platten über mindestens 2h bei 4°C wurden Abzüge auf Nitrocellulosefiltern (Amersham Pharmacia bzw. Schleicher & Schüll) hergestellt. Die Position der Filter auf den Agarplatten wurde durch Nadeleinstiche markiert. Die Filter wurden für 5 min in 0,2 M NaOH / 1,5 M NaCl denaturiert, danach 5 min in 0,4 M Tris, pH7,6 / 2x SSC neutralisiert, und 1x kurz in 1x SSC / 0,1% SDS gewaschen (Sambrook et al., 1989). Anschließend wurde die DNA durch backen der Filter bei 80°C für eine Stunde oder durch UV-Crosslinking an die Filter gebunden.

### 2.2.1.2 Herstellung einer cDNA Sonde

Von cDNA-Fragmenten von 150 bis 600 Basenpaaren Länge wurden mittels des *Prime it II-Kits* von Stratagene <sup>32</sup>P-markierte DNA Abschriften hergestellt. P<sup>32</sup> markiertes dCTP wurde von der Firma Amersham Pharmacia bezogen. Nach der Synthese wurden die Sonden über Mikrospin G-25 Säulen (Amersham Pharmacia Biotech) von freien Nukleotiden getrennt.

### 2.2.1.3 Prähybridisierung und Hybridisierung

Zur Absättigung unspezifischer DNA-Bindungsstellen wurden die Filter für 1 h bei 60°C in Hybridisierungspuffer (50 mM Pipes, pH 6,5 / 100 mM NaCl / 50 mM Na-PO<sub>4</sub>, pH 7,0 / 5% SDS) mit durch Aufkochen denaturierter Heringsspermien-DNA (100 µg/ml) prähybridisiert. Die Sonden wurden durch 5 minütiges Kochen denaturiert und zu der Prähybridisierungslösung zugegeben. Die Hybridisierung der Filter erfolgte über Nacht bei 60°C. Die Filter wurden bei 60°C in Waschpuffer (1x SSC / 0,1% SDS) fünf mal für 20 min gewaschen.

### 2.2.1.4 Autoradiografie und Isolierung einzelner Phagenkolonien

Nachdem die Filter in Frischhaltefolie verpackt wurden, wurde ein Röntgenfilm (Kodak, X-Omat AR) aufgelegt und dieser, je nach Strahlungsintensität der Filter, für eine Nacht oder über mehrere Tage in einer Filmkassette mit Verstärkerfolie exponiert. Der Film wurde in einer Protec Entwicklermaschine entwickelt. Die auf dem Film sichtbaren Signale wurden den entsprechenden Stellen auf den Agarplatten zugeordnet und mit einer Pasteurpipette ausgestochen. Die Phagen wurden in 1 ml SM-Puffer (10 mM Tris, pH 7.4 / 10mM CaCl<sub>2</sub> / 10mM MgCl<sub>2</sub> / 100mM NaCl / 0,1% Gelatine) 1 h lang bei Raumtemperatur eluiert. Dann wurden die Phagen in geringerer Dichte (1 µl des 1:1000 verdünnten Eluats) auf kleineren Platten (Ø 6 cm) erneut ausplattiert. Nach Filterhybridisierung wurden wiederum die auf dem Film markierten Stellen aus den Platten ausgestochen. Dies wurde wiederholt bis einzelne Plaques isoliert werden konnten, die nur einen Phagenklon enthielten.

### 2.2.1.5 Präparation der Phagen-DNA

Die isolierten Phagen wurden in einer Dichte von 50000 Pfu/Platte auf je einer großen Platte ausplattiert. Um die Phagen abzuschwemmen wurde 10 ml SM-Puffer auf die



Platten gegeben und diese über 2h bei 4°C geschwenkt. Die Lösung wurde abgesaugt und für 10 min bei 5000 rpm im SS34-Rotor (Beckmann) zentrifugiert. Zum Überstand wurde DNase I und RNase A auf eine Endkonzentration von 1 µg/ml zugegeben. Die Lösung wurde bei 37°C 30 min stehen gelassen. Anschließend wurden die Phagen bei 30000 rpm (SW41 Ti-Rotor, Beckman L7 Ultrazentrifuge) über 30 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 0,5 ml SM-Puffer aufgenommen. Zur Lyse der Phagen wurde 5 µl 0,5 M EDTA (pH 8) + 5 µl 10 % SDS zugegeben und 15 min bei 68°C inkubiert. Danach wurde 1x mit Phenol, 1x mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (im Verhältnis 25:24:1) und 1x mit Chloroform extrahiert. Schließlich wurde die DNA mit 0,7 Vol. Isopropanol gefällt und in 200 µl TE-Puffer oder Wasser aufgenommen.

### **2.2.1.6 Subklonierung der cDNA-Fragmente in Bluescript**

Die cDNA wurde durch Restriktion mit EcoR I aus dem Phagengenom herausgeschnitten und durch Gelelektrophorese in einem 1% Agarose-Gel von der Phagen-DNA getrennt. Die *Insert*-Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des *Quiaex*-Kit von Quiagen aus der Agarose extrahiert. Anschließend wurde das Fragment mit T4 Ligase über die EcoR I Schnittstelle in das Plasmid Bluescript SK ligiert. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 12°C. Mit 1 µl aus dem Ligationsansatz (10 µl) wurden kompetente Bakterien vom Stamm XL1 Blue der Firma Stratagene transformiert und diese auf ampicilinhaltigen Agarplatten ausgestrichen.

### **2.2.1.7 Blau-weiß-Selektion (alpha-Komplementation)**

Bevor die transformierten Bakterien ausgestrichen wurden, wurden die Agarplatten mit je 40 µl, (20 mg/ml) X-Gal (Bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactopyranosid von Gerbu) und je 4 µl, (200 mg/ml) IPTG (Isopropyl β-D thiogalactopyranosid von Biomol) bestrichen. IPTG induziert die Expression des β-Galactosidase-Gens. X-Gal dient als Substrat für die β-Galaktosidase. Die Bakterien enthalten ein mutiertes (komplementierbares) lacZ-Gen, bei dem ein Teil der aminoterminalen Sequenz deletiert wurde. Die gebildeten β-Galaktosidase-Untereinheiten können dadurch nicht zu Tetrameren assoziieren und besitzen daher keine Enzymaktivität. In dem Plasmid ist die Sequenz für dieses aminoterminalen Fragment der β-Galaktosidase, das „alpha Polypeptid“ enthalten. Durch die Bildung dieses Peptids wird die Enzymaktivität wieder hergestellt. Bakterien, die ein Plasmid aufgenommen haben, können daher X-Gal enzymatisch spalten wobei ein blauer Farbstoff entsteht. Bei Insertion eines DNA-Stückes in die *cloning site* des Plasmids, wird

in den meisten Fällen der Leserahmen verschoben, so daß das alpha-Peptid nicht mehr translatiert werden kann. In diesem Fall kann im Bakterium keine aktive  $\beta$ -Galactosidase gebildet werden und die Bakterienkolonie bleibt ungefärbt. Mit je einer der weißen Kolonien wurden 2 ml ampicilinhaltige Flüssigkulturen angeimpft (100  $\mu$ g/ml Ampicilin in LB-Medium, (Sambrook et al., 1989) ).

#### **2.2.1.8 Plasmid Minipräparationen**

Die Isolierung der DNA aus den Flüssigkulturen erfolgte mit Hilfe des *QIAprep Spin* Minipräp-Kits von Quiagen. Die DNA wurde für eine Stunde mit EcoR I (Sambrook et al., 1989) verdaut und im 1%igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Minipräps, die ein *Insert* der richtigen Größe enthielten wurden im Sequenzierlabor des Instituts für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie mittels eines Sequenzierungsautomaten ABI Prism 377 (Perkin Elmer) sequenziert. Dazu wurden *Primer* verwendet, die an die M13, T3- und T7-Promotoren des Plasmids hybridisieren.

#### **2.2.1.9 Auswertung der Sequenzen**

Die Sequenzen wurden über *Blast Search* mit Sequenzen der NCBI-Datenbank (*National Center for Biotechnology Information*) verglichen und aufgrund ihrer Übereinstimmung mit bekannten Genen klassifiziert. Auf die Datenbank wurde über die Internet-Adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> zugegriffen.

#### **2.2.2 Bestimmung der cDNA-Sequenz durch PCR**

Einige Sequenzabschnitte der cDNA wurden durch Amplifikation dieser Teilstücke mittels PCR bestimmt. Als *Template* wurde cDNA eingesetzt, die durch reverse Transkription aus RNA hergestellt wurde. Dazu wurde RNA aus dem Gehirn des Huhns verwendet. Die reverse Transkription wurde nach Angaben des Herstellers mit *Superscript<sup>TM</sup> II* von Life Technologies durchgeführt. Die Oligonukleotide die als *Primer* verwendet wurden, wurden über *MicroSpin<sup>TM</sup> G-25 Columns* von Amersham Pharmacia Biotech aufgereinigt. Es wurden jeweils zwei PCR-Reaktionen nacheinander mit zwei hintereinander liegenden *Primern* durchgeführt, wobei der zweite *Primer* 20 – 60 Basen weiter in 3' Richtung des amplifizierten DNA-Stranges lag. In den Fällen, in denen schon nach der ersten PCR-Reaktion eine deutliche und scharfe Bande zu sehen war, habe ich auf den zweiten Durchgang verzichtet.

Reaktionsbedingungen der PCR:

94° C	1,5 min	Denaturierung	
94° C	30 sec.	Denaturierung	} 40 Zyklen
55° - 64° C	30 sec.	Primeranlagerung	
72° C	2 min	Polymerisation	
72° C	7 min	Verlängerung unvollständiger PCR-Produkte	

Es wurde sowohl nur Taq-Polymerase verwendet, wie auch ein Gemisch aus Taq und Pfu-Polymerase (Promega). Es wurde jeweils der vom Hersteller mitgelieferte Puffer verwendet. Außerdem wurde 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 µM dNTP und je 20 pmol *Primer* eingesetzt. Der PCR-Ansatz wurde im Agarose-Gel (0,8-1%) aufgetrennt, die gewünschte Bande ausgeschnitten und die DNA mit *Quiaex* von Quiagen extrahiert.

#### 2.2.2.1 Addition von einzelsträngigen Adenin-Enden an *blunt-end* PCR-Produkte

Um *blunt-end* PCR-Produkte in den Vektor p-Gem zu klonieren, wurde ein ungepaartes Adenin an das doppelsträngige 3'Ende angehängt. Zu dem aufgereinigten PCR-Produkt wurde Taq Polymerase-Puffer, 0,5 Units Taq-Polymerase und 100 µM dATP, zugegeben und 10 min bei 72°C inkubiert. Anschließend wurde einmal mit Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert, die DNA mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat und 2 fachem Vol. Ethanol gefällt und in TE-Puffer oder direkt im Ligationsansatz aufgenommen.

#### 2.2.2.2 Subklonierung der PCR-Produkte in p-Gem

Die PCR-Produkte wurden in den p-Gem-T Vektor von Promega inseriert. Mit dem Ligationsansatz wurden JM109 kompetente Bakterien von Promega oder XL1-Blue kompetente Bakterien von Stratagene transformiert. Die Bakterien sind unter blau-weiß-Selektion auf ampicilinhaltigen Agarplatten (100 µg/ml Endkonzentration) gewachsen. Von den weißen Kolonien wurden Plasmid Minipräparationen gemacht. Die DNA wurde mit Nco I und Nsi I oder mit Apa I und Spe I verdaut und die gewünschten Klone sequenziert. Zur Sequenzierung wurden *Primer* verwendet, die an die M13 *forward* und *reverse* Promotorregion des Vektors binden.

## **2.2.3 Analyse der Genstruktur von SAP97/SAP90**

### **2.2.3.1 Durchmusterung einer genomischen DNA-Bank**

Um die Exon-Intron-Grenzen zu analysieren, wurde eine genomische DNA-Bank durchmustert. Die Isolierung der genomischen SAP-Klone und die Markierung der Sonden erfolgte wie für die cDNA-Klone unter Punkt 2.1.1.2 - 2.1.1.4 beschrieben.

### **2.2.3.2 Präparation der Phagen-DNA aus der genomischen DNA-Bank**

Die genomische DNA wurde aus den Phagen über Säulenpräparation isoliert. Zur Herstellung der Säulen wurden 10ml Plastikspritzen mit Glaswolle abgedichtet und mit 4 ml DE52 Säulenmaterial (Wahlmann), das in 10 mM Tris-HCl (pH 8) gelöst ist, gefüllt. Das Säulenmaterial wurde dann mit 10 ml SM-Puffer gespült. Die Phagensuspension wurde auf die Säule gegeben und das Eluat aufgefangen. Pro 5 ml Eluat wurden 0,6 ml 5 M NaCl und 3,5 ml Isopropanol (0,7 Vol.) zugegeben. Dieses wurde gemischt und 1 h im Eisbad inkubiert. Anschließend wurden die Phagen durch Zentrifugieren bei 10000 rpm (HB4-Rotor) für 10 min pelletiert. Das Pellet wurde in 0,5 ml SM-Puffer gelöst. Dazu wurde 10 µl frisch angesetzte Proteinase K (10 mg/ml) und 20 µl 10% SDS gegeben und 20 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 1/10 Vol. 5 M K-Acetatlösung, 20 minütiger Inkubation bei 88°C und anschließend 5 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Proteine gefällt. Diese wurden bei 4000 rpm über 15 min pelletiert (Eppendorf Kühl-Tischzentrifuge 5402 ). Aus dem Überstand wurde durch Zugabe von 0,6 ml Isopropanol und vorsichtiges Mischen die DNA gefällt, die dabei als graue Wolke sichtbar wurde. Sie wurde mit einem aus einer Glaspipette gefertigten Glashäkchen aufgewickelt, durch Eintauchen in 70% Ethanol zweimal gewaschen, kurz getrocknet und schließlich in 150 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Die so gewonnene DNA wurde direkt zur Sequenzierung verwendet. Dabei wurden aus der SAP-cDNA abgeleitete Primer eingesetzt (2.1.6).

### **2.2.3.3 PCR mit genomischer DNA**

Zur Analyse der Genstruktur wurde PCR mit genomischer DNA durchgeführt. Dazu wurde der *Advantage Genomic Polymerase-Mix* von Clontech verwendet. Die genomische DNA wurde ebenfalls von Clontech bezogen. Die PCR-Bedingungen wurden nach Angaben des Herstellers gewählt und empirisch optimiert. Es wurden 0,5 µg/µl DNA eingesetzt und die folgenden Reaktionsbedingungen gewählt.

94° C	1,5 min	Denaturierung	} 35 Zyklen
94° C	15 sec	Denaturierung	
64° C	5 min	Primeranlagerung	
68° C	25 min	Polymerisation	
68° C	25 min	Vervollständigung unfertiger PCR-Produkte	

Nach dem ersten Durchgang wurden 2 µl vom PCR-Ansatz (100 µl) als *Template* für die zweite PCR eingesetzt. Dabei wurden zwei *Primer* verwendet, die auf den amplifizierten DNA-Strängen weiter stromabwärts binden, um so die Spezifität der Produkte zu erhöhen. Die Reaktionsbedingungen der zweiten Reaktion waren identisch.

#### 2.2.3.4 Subklonierung der PCR-Produkte

Die sehr langen PCR-Produkte wurden unter Verwendung des *Topo zero blunt* Kit von Invitrogen in den *Topo cloning Vector* kloniert. Mit dem Plasmid wurden die mitgelieferten *Top 10* chemisch kompetenten Bakterien transformiert. Diese wurden auf kanamycinhaltigen und mit X-Gal und IPTG bestrichenen (wie unter 2.2.1.7) LB-Agarplatten ausplattiert. Von den weißen Kolonien wurden kanamycinhaltige (10 µg/ml) 2 ml Flüssigkulturen und Plasmid-Minipräparationen gemacht. Die DNA wurde mit den PCR-Primern sequenziert.

#### 2.2.4 Analyse der Genexpression durch *in situ* Hybridisierung

Die Verteilung der SAP-mRNA im Huhn wurde durch radioaktive *in situ* Hybridisierung an Gehirnen von P1-Küken (postnataler Tag 1) untersucht. Die Küken wurden vom Leibniz-Institut für Neurobiologie in Magdeburg bezogen. Die Aufzucht und Präparation wurde von Jörg Bock in der Arbeitsgruppe von Dr. Katharina Braun durchgeführt. Nach der Präparation wurden die Gehirne sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei minus 80°C aufbewahrt.

##### 2.2.4.1 Herstellung von Gefrierschnitten

Die Gehirne wurden mit einem *JUNG CM 3000* Kryostaten (von Leica) bei -18°C in 12 µm dicke Scheiben geschnitten und auf *Super Frost plus* Objektträger der Firma Menzel übertragen. Die hintereinander liegenden Schnitte wurden auf acht Objektträger verteilt, wobei auf jeden Objektträger 6-7 Schnitte plaziert wurden. Anschließend wurden sie sofort fixiert oder bei -80°C tiefgefroren und nach maximal 2 Tagen fixiert.

Fixierung der Schnitte:

- 5 min in 4% Paraformaldehyd auf Eis
- 5 min in 3x PBS bei Raumtemperatur
- 5 min in 1x PBS bei Raumtemperatur
- 5 min in 1x PBS bei Raumtemperatur
- 5 min in 70% Ethanol bei Raumtemperatur
- 5 min in 90% Ethanol bei Raumtemperatur
- 5 min in absolutem Ethanol bei Raumtemperatur
- 30 min Lufttrocknen bei Raumtemperatur

Anschließend können die Schnitte für mehrere Wochen bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

#### 2.2.4.2 Herstellung der Sonden

Die Oligonukleotide wurden durch Anhängen eines radioaktiven poly-A-Schwanzes (*tailing*) mittels  $^{35}\text{S}$  dATP radioaktiv markiert.  $^{35}\text{S}$  dATP stammte von NEN Life Science Products. Für die Polyaddenylierung wurde Terminale Transferase von Promega mit dem dazugehörenden Puffer verwendet. Die Herstellung der Sonden, Puffer, Fixierungs- und Waschbäder erfolgte mit RNase freiem Wasser. Dieses wurde durch Behandlung mit DEPC (Diethyl-Pyrocbonat, Sigma) hergestellt.

Es wurden folgende Komponenten zusammengemischt (20  $\mu\text{l}$ ):

- 11,4  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$
- 4  $\mu\text{l}$  5x Puffer
- 2  $\mu\text{l}$  Oligonukleotid 15 ng/ $\mu\text{l}$  (3 pmol)
- 1,6  $\mu\text{l}$   $^{35}\text{S}$  dATP
- 1  $\mu\text{l}$  Terminale Transferase (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )

Die Reaktion wurde 1 h bei  $32^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden folgende Lösungen zugegeben.

- 30  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$
- 1  $\mu\text{l}$  tRNA (500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
- 1  $\mu\text{l}$  Glykogenlösung (Roche)
- 5  $\mu\text{l}$  3 M Na-Acetat pH 5.6
- 137  $\mu\text{l}$  100% Ethanol eiskalt

Die Oligonukleotide wurden für eine Stunde bei  $-70^{\circ}\text{C}$  oder über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gefällt. Dann wurden sie 30 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 14000 rpm in der Eppendorf-Zentrifuge (5402) pelletiert. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und kurz in der *Speed Vac* getrocknet. Die Sonden wurden in 30  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen. Je 1  $\mu\text{l}$  der Sonde wurde in 3

ml *Hionic* Scintillations-Cocktail im *Liquid Scintillation Counter* (Wallac 1409) gemessen. Die fertigen Sonden können bei -80°C aufbewahrt werden.

#### **2.2.4.3 Hybridisierung**

Direkt vor der Hybridisierung wurde die Sonde im Hybridisierungspuffer gelöst und gründlich vermischt [10 mM Hepes pH 7,5 / 600 mM NaCl / 100 mM DTT / 1 mM EDTA pH 7,5 / 10 % Dextransulfat / 1x Denhardts / 100 µg/ml Heringsspermien-DNA (vorher 5´ kochen) / 0,1 µg/µl Poly A Lösung / 50 % Formamid (zuletzt zugeben)]. Die Konzentration wurde auf 250000 Cpm pro 200 µl Puffer eingestellt. Auf jedem Objektträger wurden 200 µl Hybridisierungspuffer verteilt und mit Parafilm abgedeckt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 37°C in einer mit 50 % Formamid befeuchteten Kammer. Die Objektträger wurden in 1x SSC / 0,004 M DTT gewaschen. Dazu wurden sie erst bei Raumtemperatur kurz gespült, dann zweimal 30 min bei 55°C gewaschen und anschließend noch einmal kurz bei Raumtemperatur gespült. Danach wurden sie 1 min in 75 % Ethanol und 1 min in absolutem Ethanol gewaschen und getrocknet.

#### **2.2.4.4 Autoradiografie**

Die Objektträger wurden in eine Röntgenfilmkassette gelegt und mit Tesafilm festgeklebt. Es wurde ein hochauflösender Röntgenfilm (Biomax MR von Kodak) aufgelegt und über 12 Tage exponiert. Die Autoradiogramme wurden mit einer Schwarzweiß-Videokamera aufgenommen und mit dem Programm NIH IMAGE 1.6 digital gespeichert. Zur Charakterisierung der Gehirnbereiche wurde der Bildatlas von (Kuenzel, 1988) hinzugezogen.

### **2.2.5 Abhängigkeit der Expressionsstärke von Prägung**

#### **2.2.5.1 Prägung der Küken**

Die akustische Prägung der Küken wurde von Jörg Bock im Leibniz-Institut für Neurobiologie in Magdeburg durchgeführt.

## Versuchsaufbau

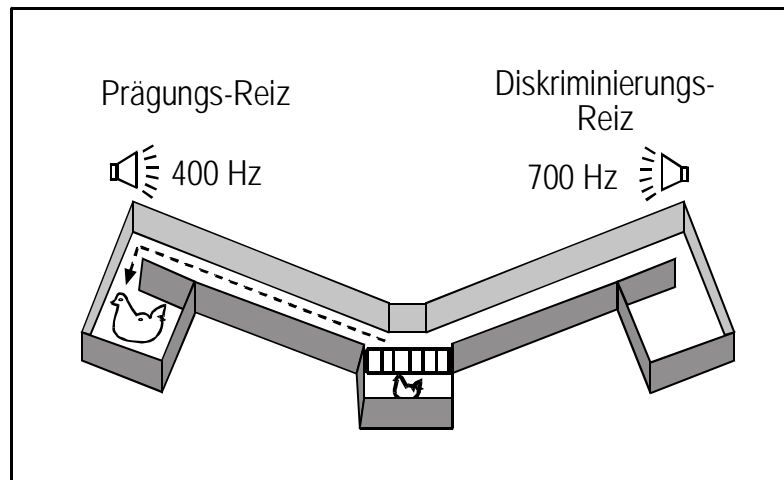


Abb. 5 Darstellung der Versuchsanlage zur akustischen Prägung

Die Prozedur ist bei (Bock, 1997) beschrieben. Das Küken wird in der Mitte der Versuchsanlage hinter einem kleinen Gitter gehalten. Nach beiden Seiten führen im rechten Winkel zueinander zwei Gänge zu einem Kästchen. Im linken sitzt eine ausgestopfte Henne auf einem Heizkissen. Diese ist von dem Küken nicht zu sehen. Von der linken Seite aus wird periodisch der Ruf einer Henne abgespielt, ein Ton von etwa 400 Hz. Dann wird das Gitter geöffnet. Das Küken läuft nach links, sieht die Henne und kann sich an ihr wärmen. Dies wird über 30 min einige Male wiederholt. Danach wurden die Tiere direkt getötet. Die Kontrolltiere wurden in einem abgedunkelten Raum mit leisen diffusen Hintergrundgeräuschen gehalten und ungefähr zum selben Zeitpunkt getötet.

Die Versuche wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten nach dem Schlüpfen durchgeführt. Es wurden jeweils drei Tiere nach 30 min, 5 Stunden und 10 Stunden geprägt. Mit den Kontrolltieren zusammen wurden insgesamt 18 Gehirne untersucht. Der Prägungserfolg dieser Methode wurde in vorherigen Versuchen durch Tests nachgewiesen. Die Tests wurden einen Tag nach der Prägung durchgeführt. Dabei wurden die Küken wiederum in die Apparatur gesetzt und abwechselnd von einer Seite mit dem Prägungston und von der anderen Seite mit einem anderen Ton beschallt (700 Hz). Nachdem sie befreit wurden, liefen sie jeweils in Richtung des Prägungsreizes. Die Seite von der der Prägungston kommt, wurde mehrfach gewechselt.



### 2.2.5.2 Bestimmung der relativen Genexpression

Die Autoradiogramme wurden mit NIH IMAGE aufgenommen und gespeichert. Die zu untersuchende Gehirnregion wurde auf dem Bildschirm umrandet und gemessen. Das Programm gibt den mittleren Grauwert des markierten Bereichs an, was den Schwärzungsgrad des Films wiedergibt. Aus 4 – 9 hintereinander folgenden Schnitten wurde der Mittelwert bestimmt. Die Meßwerte wurden durch den mittleren Hintergrundwert geteilt, um relative Werte zu bilden. Es wurde jeweils die linke und die rechte Seite einer Gehirnregion separat analysiert. Bei einer eindeutigen Tendenz, also wenn alle Werte der geprägten Tieren höher (oder niedriger) als bei den ungeprägten Tieren waren, wurde zur Überprüfung Signifikanz ein Men Whitney U-Test durchgeführt.

## 2.2.6 Western Blot

### 2.2.6.1 Herstellung von Proteinextrakt aus Gehirn

Für den Western Blot wurden Proteinextrakte aus Kükengehirn und aus Rattengehirn hergestellt. Zu je einem Gramm Gehirn wurden 2 ml Homogenisierungspuffer gegeben (25 mM Tris pH 8,4 / 1 mM MgCl<sub>2</sub> / 1 mM ZnCl<sub>2</sub> / 0,3 M Sucrose / 1 Tablette Proteaseinhibitorcocktail, Roche). Das Gewebe wurde in einem Hand-Homogenisator zerkleinert. Durch 10 minütiges Zentrifugieren bei 14000 rpm und 4°C in einer Eppendorf Kühlzentrifuge wurden große Zellbestandteile pelletiert. Der Überstand wurde als grobe Proteinfraction verwendet. Der Proteingehalt wurde mit dem Bradford-Proteinbestimmungs-Kit von Bio-Rad bestimmt.

### 2.2.6.2 SDS Gelelektrophorese und Blotverfahren

Die Proteine wurden in einem 10 % igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Es wurde jeweils ein Längenstandard, 15 µg Hühnerprotein und 15 µg Rattenprotein nebeneinander aufgetragen. Als Längenstandard diente der *Rainbow-Marker* von Amersham Pharmacia. In jede Tasche wurde ein Probenvolumen von 15 µl aufgetragen in dem die Proteinlösung und 3 µl 5x Lemmli-Puffer enthalten waren. Die Elektrophorese erfolgte mit 200 V in einer Bio-Rad Elektrophoresekammer (Sambrook et al., 1989). Anschließend wurde das Gel herausgenommen, eine mit Blotpuffer befeuchtete PVDF-Membran (Immobilion<sup>TM</sup> P, Millipore) aufgelegt und beides in eine Blotapparatur (Bio-Rad) eingespannt. Darin wurden die Proteine über 1 h 15 min bei 100 V auf die Membran transferiert.

Elektrophoresepuffer:	5 x Lemmli-Puffer:	Blotpuffer:
25 mM Tris	250 mM Tris pH6,8	47 mM Tris
250 mM Glycin pH8,3	0,5 M DTT	38 mM Glycin
0,1 % SDS	0,1 % SDS	0,03 % SDS
	0,5 % Bromphenolblau	20 % Methanol
	1 % Glycerol	

### 2.2.6.3 Inkubation der Antikörper

Direkt nach dem *Blotten* wurde die Membran 1 h in Block-Puffer (5 % Magermilchpulver in TBST) (TBST: 20 mM Tris pH 7,6 / 137 mM NaCl / 0,1 % Tween 20) geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Der erste Antikörper wurde 1:2000 in 50 % TBS / 50% Block-Puffer verdünnt (TBS: 20 mM Tris pH 7,6 / 137 mM NaCl). In dieser Lösung wurde die Membran über Nacht bei 4°C geschwenkt. Danach wurde sie 5 x für 12 min (mindestens 1 h) in TBST gewaschen. Der 2. Antikörper wurde ebenfalls 1:2000 verdünnt. Er ist im *Western-blot*-Detektionskit enthalten. Die Inkubation erfolgte 2 h bei Raumtemperatur. Danach wurde wiederum 5 x 12 min mit TBST gewaschen.

### 2.2.6.4 Detektion der Antikörper durch Chemolumineszenz

Die Detektion der Antikörper erfolgte mit Hilfe des ECL-Kits (*Western-blot*-Detektionskit) von Amersham Pharmacia. An den 2. Antikörper ist Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Im Dunkeln wird das Detektionsreagenz, in dem Luminol und ein *enhancer* enthalten sind, auf die Membran gegeben. Das Luminol wird von der Peroxidase am Antikörper oxidiert und es erfolgt eine Lichtemission. Dann wird in einer Röntgenkassette schnell ein Röntgenfilm auf die Membran gelegt und die Kassette verschlossen. Nach 1-5 min wird der Film entwickelt. Die Proteine, an die Antikörper gebunden sind, sind als schwarze Banden auf dem Film sichtbar.

### 2.2.7 Zellkultur und Transfektion

In kultivierten Neuronen von Ratten wurde die subzelluläre Verteilung synapsenassoziierter Proteine untersucht. Neurone wachsen und differenzieren in Kultur nur in Anwesenheit von Gliazellen, da diese das Medium für die Neuronen konditionieren. Daher mußte 14 Tage vor der Neuronenkultur eine Gliakultur angelegt werden. Die Zellen wurden von Embryonen am Tag 20 nach der Befruchtung (1 Tag vor der Geburt) entnommen. Die Methode ist bei (Goslin und Banker, 1991) beschrieben. Alle Werkzeuge

und Lösungen wurden vorher sterilisiert. Die Ratten stammen aus der Tierzucht des Universitäts-Krankenhauses Hamburg-Eppendorf (Stamm Wistar).

### 2.2.7.1 Kultivierung von Gliazellen

Von zwei bis vier Embryonen wurden die Cortex-Hemisphären frei präpariert und in HBSS gesammelt (*Hanks buffered salt solution* ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ , Life Technologies Nr.14180 und 10 mM Hepes pH 7-7,2). Dann wurden die Hirnhäute gründlich entfernt und das Gewebe in kleine Stückchen zerteilt. Danach wurde das Gewebe in ein 50 ml Greiner Röhrchen überführt und mit HBSS auf 12 ml aufgefüllt. Es wurde 1,5 ml 2,5 % Trypsin (Life Technologies) und 1,5 ml 1 % DNase I (Roche) zugegeben. Dann wurde alles bei 37 °C 15 – 20 min langsam geschüttelt, wobei sich die Zellen voneinander lösten. Das Röhrchen wurde 5 min aufrecht gestellt um Zellklumpen sedimentieren zu lassen. Der Überstand mit der darin enthaltenen Gliazellen wurde abgesaugt. Die Zellklumpen wurden erneut mit HBSS, Trypsin und DNase I geschüttelt und sedimentiert um noch mehr Gliazellen aus dem Gewebe zu lösen. Anschließend wurden die Überstände, im Verhältnis 1:1 mit Gliamedium gemischt. Bei 1000 rpm (170 x g) wurden die Gliazellen 5 min lang zentrifugiert. Das Pellet wurde nun in ca. ½ Vol. Gliamedium resuspendiert. Die Zellen wurden gezählt und auf eine Dichte von 72000 Zellen pro ml verdünnt. Davon wurde je 1 ml pro Loch in eine 12 Loch-Kulturschale (Costar) ausplattiert (= 200 Z./mm<sup>2</sup>). Die Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert. Um die Zellen mit Nährstoffen zu versorgen, wurde das Medium alle 3 – 4 Tage erneuert. Nach ca. 14 Tagen war der Boden der Schalen konfluent bewachsen und die Zellen wurden für die Neuronenkultur verwendet.

Gliamedium:

MEM (*Minimal Essential Medium*, Life Technologies)  
0,6 % Glucose  
10 % Pferdeserum (Biother)  
100 U/ml Penicillin  
100 µg/ml Streptomycin

Alle Medien und Lösungen wurden vor der Verwendung steril filtriert.

### 2.2.7.2 Kultivierung von Hippocampusneuronen

Die Neuronen wurden auf der Unterseite von Deckgläschen kultiviert, die durch Wachsfüßchen gehalten, in einem Abstand von ca. 3 mm über der Gliazellschicht liegen.

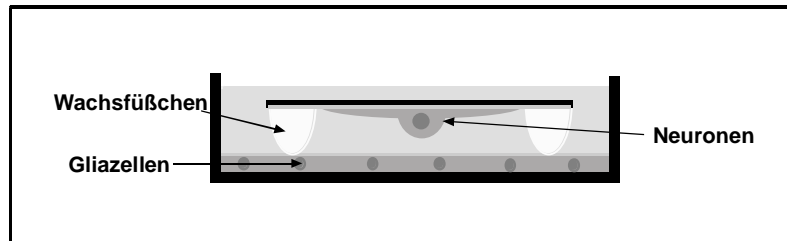


Abb. 6 Versuchsanordnung zu Kultivierung von Neuronen

Die Deckgläser (rund, Ø 18mm, Frank) wurden vor der Verwendung für 18 – 36 Stunden in rauchender Salpetersäure geschüttelt, dann 6 mal über 3 h mit Wasser gewaschen, getrocknet und bei 200°C (8 h) sterilisiert. Spätestens zwei Tage vor der Präparation wurden auf den Rand jedes Deckgläschens drei Wachsfüßchen aus Paraffin gesetzt und diese über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Einen Tag vor der Präparation wurden die Deckgläser mit den Wachsfüßchen nach oben in die 12 Loch-Kulturschalen gelegt und mit Poly-L-Lysin (Sigma, MW30000 – 70000, 1 mg/ml in 0,1 M Boratpuffer pH 8,5) beschichtet. Dieses wurde vor der Präparation abgesaugt und 3 x für 10 min mit Wasser abgewaschen. Einen Tag bevor die Neuronen zu den Gliazellen kommen wurde das Gliamedium durch Neuronenwachstumsmedium (siehe unten) ersetzt.

Von den Cortex-Hemisphären von ca. 8 Embryonen wurden die Gehirnhäute sorgfältig entfernt und die Hippocampi herauspräpariert. Diese wurden in HBSS gesammelt, mit einem Skalpell zerkleinert und in ein 14 ml Greiner Röhrchen überführt. Zu 4,5 ml Flüssigkeit wurden 0,5 ml 2,5 % Trypsin gegeben (= 0,25 %). Die Lösung wurde 20 min bei 37°C im Wasserbad erwärmt und ab und zu vorsichtig durchmischt. Nach dem Absinken des Gewebes wurde der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt und zum Waschen neues HBSS zu den Zellen gegeben. Dies wurde nach 5 min noch zweimal wiederholt um das Trypsin herauszuwaschen. Schließlich wurde vorgewärmtes Plattiermedium (MEM mit Earle's Salzen / 0,6 % Glucose / 10 % Pferdeserum) zu den Zellen gegeben. Diese wurden durch auf- und abpipettieren mit einer rund geschmolzenen Pasteurpipette vereinzelt (trituriert). Danach wurde auf 5 ml aufgefüllt und die Zellen gezählt. In einer Verdünnung von 150000 Zellen pro ml wurde je 1 ml in ein Loch mit Deckgläschen ausplattiert (= ca. 400 Z./mm<sup>2</sup>) und in den Brutschrank gestellt. Nach drei

Stunden waren die Zellen auf den Deckgläschen festgewachsen und diese wurden umgekehrt (Neurone nach unten) auf die Gliakulturen gelegt. Am nächsten Tag wurde das Medium erneuert und danach alle 2 – 3 Tage. Dabei wurde jeweils nur die Hälfte des Mediums abgesaugt und neu zugegeben.

Neuronen-Medium:

MEM (mit Earle´s Salzen)

0,6 % Glucose

100 µg/ml Transferrin

5 µg/µl Insulin

20 nM Progesteron

100 µM Putrescin

30 nM Selendioxid

1 mM NA-Pyruvat

0,1 % Ovalbumin

(alles von Sigma)

### 2.2.7.3 Transfektion

Die Transfektion erfolgte durch die Bildung von Calciumphosphat, das mit der DNA zusammen präzipitiert (Blichenberg et al., 1999). Die Mischkristalle werden von den Zellen aufgenommen und die DNA kann exprimiert werden.

Die Deckgläschen mit den Neuronen wurden zur Transfektion mit den Zellen nach oben in 900 µl N2-Medium (Neuronen-Medium + 1 % FCS, *fetal calv serum* Biother) überführt. Danach wurde das Präzipitat gebildet.

Präzipitatbildung (für 4 Deckgläser 400 µl):

In einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden folgende Komponenten zusammengemischt:

10 µg Plasmid-DNA

30 mg Carrier-DNA (pUC19-Plasmid-DNA)

H<sub>2</sub>O auf 180 µl Gesamtvolumen

zum Schluß 20 µl 2,5 M CaCl<sub>2</sub> – Lösung

Mit einem Pasteurpipette und elektrischer Pipettierhilfe wurde nun Luft in die Lösung geblasen, so daß Blasen entstehen. Während dessen wurde langsam 200 ml 2 x BBS (*BES buffered saline*), dazu getropft (Sambrook et al., 1989), 16.39. Zur Kristallbildung wurde die Mischung 20 min stehen gelassen. Jeweils 100 µl des Präzipitats wurden dann in das Medium auf die Neuronen gegeben und 6 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das

Medium abgesaugt, und 2 x mit HBSS gewaschen. Schließlich wurden die Deckgläschen wieder mit den Neuronen nach unten auf die Gliazellen gelegt.

#### **2.2.7.4 Präparation von Plasmid-DNA**

Die DNA für die Transfektion wurde mit dem *Endo-free-Plasmid-Präp*-Kit von Quiagen gewonnen. Alternativ kann auch über einen CsCl-Gradienten aufgereinigte DNA verwendet werden (Sambrook et al., 1989), Abschnitt 2.73. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte über eine photometrische Messung bei 260 nm.

#### **2.2.7.5 Fixierung der Neuronen und Immuncytochemie**

Um die rekombinanten Proteine zu detektieren, wurden die Neuronen mit einem anti-EGFP Antikörper von Clontech (polyklonal aus Kaninchen) gefärbt. Als zweiter Antikörper wurde ein Cy3-gekoppelter (rot) oder Cy2-gekoppelter (grün) Antikörper gegen Kaninchen verwendet. Zur Fixierung wurden die Deckgläschen mit den Neuronen nach oben in ein neues 12-Loch-Schälchen gelegt und 1 x in warmen PBS (Sigma, Nr. D-5652) gewaschen. Anschließend wurde 15 min in 4 % Paraformaldehyd in PBS, pH 7,3 fixiert. Danach wurde 2 x mit PBS gewaschen. Die Zellmembranen wurden durch 0,5 minütiges Spülen mit 0,1% Triton permeabilisiert und anschließend wiederum 3 x gewaschen. Die Inkubation des 1. Antikörpers erfolgte über Nacht im Kühlschrank in einer feuchten Kammer. Der EGFP Antikörper wurde 1:1000 in PBS *high salt* + 2 % FCS verdünnt. Dann wurde 2 x mit PBS gewaschen und der 2. Antikörper in einer 1: 300 Verdünnung 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Neuronen in *Vectashield Mounting Medium* (Vector) auf Objektträger eingebettet.

#### **2.2.7.6 Mikroskopie**

Für die mikroskopischen Untersuchungen wurde ein Fluoreszenzmikroskop (Aristoplan) von Leitz verwendet.

### 2.2.8 Firmenverzeichnis

Alomone Labs, Jerusalem

Amersham Pharmacia Europe GmbH, Freiburg

Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg

Bio-Rad Laboratories, Kalifornien, USA

Biother GmbH, Kelkheim

Clontech Laboratories GmbH, Heidelberg

Invitrogen, Groningen, Holland

Leitz, Ernst Leitz Wetzlar GmbH, Wetzlar

Leika, Heidelberg

Life Technologies GmbH (Gibco-BRL), Karlsruhe

MBI Fermentas, St.Leon Rot

NEN Life Science Products, Boston MA 02118, USA

Promega GmbH, Mannheim

Quiagen GmbH, Hilden

Roche Molecular Biochemicals (Boehringer Mannheim), Mannheim

Sigma, Steinheim

Stratagene GmbH, Heidelberg

Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Sequenzanalyse der synapsenassoziierten Proteine des Huhns

##### 3.1.1 Klonierung der SAP cDNA und Charakterisierung der Sequenzen

Aus einer  $\lambda$ -Phagen cDNA-Bank konnten 16 verschiedene Klone isoliert werden, die SAP-spezifische DNA enthielten. Durch PCR habe ich sieben weitere cDNA-Klone erhalten. Die Klone wurden sequenziert, die Sequenzen in die NCBI Datenbank eingegeben und mit bekannten Sequenzen verglichen. Die Zuordnung zu einem bestimmten SAP erfolgte über die Homologie der Sequenz zu einem der vier bekannten SAP der Ratte. Im GCG-Programm wurden überlappende Sequenzen in ein gemeinsames *Contig* eingeordnet und so zu einer cDNA-Sequenz zusammengefaßt.

###### 3.1.1.1 SAP90/SAP97

###### Klonierungsstrategie

Für die Isolierung von cDNA-Fragmenten synapsenassoziiierter Proteine, wurde eine cDNA-Bank verwendet, die aus dem Gehirn eines adulten Huhns unter Verwendung von *random Primern* hergestellt worden war. Als Sonden wurden cDNA-Fragmente synapsenassoziiierter Proteine verwendet, die zwischen 400 und 670 Basen lang waren. Für die erste Durchmusterung wurden als Sonden cDNA-Fragmente der Ratte eingesetzt (SAP97: Acc. U14950, Nukleotide 658-1352, 1556-1965; SAP90: Acc. X66474, Nukleotide 596-1137), für alle späteren Durchgänge die neu erhaltenen DNA-Stücke des Huhns. Die SAP90/SAP97-cDNA-Klone sind in Abb. 7 schematisch dargestellt. Von den isolierten Klonen, besitzen fünf die höchste Identität zu SAP97-cDNA-Sequenzen der Ratte (Abb. 7, Klone Nr.1,2,3,6,7). Drei dieser Klone (1,2,3) beginnen in der 5'untranslatierten Region (UTR), 46 Nukleotide vor dem Startcodon, und enthalten den Anfang der codierenden Region. Zwei weitere Klone enthalten in ihren vorderen Abschnitten 30 Nukleotide, deren Sequenz 80 % Identität zur cDNA-Sequenz von SAP90 der Ratte hat. Dies sind die ersten 30 Nukleotide der codierenden Region (Abb. 7, Klon Nr. 4+5 roter Teil). Vor dem Startcodon dieses Transkriptes liegen 34 Nukleotide der 5'UTR. Der sich 3' an die ersten 64 Basen anschließende Abschnitt (schwarz) ist mit der Sequenz der drei anderen Klone (1,2,3) zu 100% identisch und hat mit 82,9% deutlich höhere



Identität zu SAP97 als zu SAP90 der Ratte. Das bedeutet, daß die SAP97-Klone 1,2,3 und die SAP90-Klone 4,5 sich im 5' Bereich unterscheiden, aber in der nachfolgenden Sequenz, bis zum Ende jedes Klons identisch sind. Die beiden längsten Klone 1 + 4 sind über eine Länge von 658 Basen vollständig identisch. Klon 6 (957 Basen) und Klon 7 (1127 Basen) enthalten den Abschnitt, der für die drei PDZ-Domänen von SAP97 codiert.

Weiter 3' liegende Sequenzabschnitte von SAP97 bzw. SAP90 konnten nicht aus der cDNA Bank isoliert werden. Daher wurde dieser Teil durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Als *Template* für die PCR diente cDNA, die aus RNA des Gehirns von einem einen Tag alten Huhn selbst hergestellt wurde. Die Lage der verwendeten *Primer* ist in Abb. 7 durch Pfeile dargestellt. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide ist in 2.1.5 unter den Buchstaben angegeben, die über den Pfeilen abgebildet sind. Im ersten Schritt wurden zwei nach 3'gerichtete *Primer (forward)* hergestellt, deren Sequenz aus dem hintersten Abschnitt der Sequenz abgeleitet wurden, die aus den isolierten Klonen ermittelt worden war (*Primer A,C*). Die Sequenz des nach 5'gerichteten (*reverse*) *Primers* war aus der codierenden Region kurz vor dem Stopcodon der SAP97-cDNA der Ratte abgeleitet worden (*B*). Mit diesen *Primern* wurden zwei PCR-Reaktionen nacheinander durchgeführt. In der ersten wurden *Primer A+B* und in der zweiten *Primer C+B* verwendet. In der zweiten Reaktion wurde als *Template* 2 µl des Reaktionsansatzes der ersten PCR eingesetzt. Auf diese Weise konnte ein cDNA-Abschnitt amplifiziert werden, der vor der Sequenz beginnt, die die SH3-Domäne codiert und 61 Nukleotide vor dem Stopcodon endet (Klon 8). Für die nächste PCR wurden zwei *Primer* hergestellt, deren Sequenz aus der codierenden Region kurz vor dem Stopcodon der SAP97/SAP90-cDNA des Huhns abgeleitet worden waren, und nach 3'gerichtet waren (*D,F*). Als *reverse Primer* wurde ein oligo-dT-*Primer* verwendet, der an den Poly-A-Schwanz in der untranslatierten Region binden sollte und nach 5'amplifiziert (*E*). In diesem Schritt gelang es das Ende der codierenden Region und die gesamte 3' untranslatierte Region bis zum Poly-A-Schwanz zu amplifizieren (Klon 9). Der hintere Abschnitt der codierenden Region ab dem Bereich, der die SH3-Domäne codiert wurde zwei weitere Male amplifiziert (Klon 10+11). Um zu untersuchen, ob die Sequenz der beiden im vorderen Abschnitt unterschiedlichen RNAs von SAP90 und SAP97 in dem gesamten weiter 3'gelegenen Bereich identisch sind, oder ob hier weitere Unterschiede auftreten, wurde fast der gesamte codierende Bereich beider cDNAs amplifiziert. Dazu wurden *forward-Primer* verwendet, die an den bei der SAP90- und SAP97-cDNA unterschiedlichen vordersten

Sequenzabschnitt binden (J,L). Der *reverse-Primer* (K) war aus der kurz vor dem Stopcodon liegenden Sequenz des Huhns abgeleitet worden. Die in diesen beiden Reaktionen erhaltenen cDNA-Klone (SAP97 = Klon 12, SAP90 = Klon 13) enthielten fast die vollständige codierende Region der SAP90- und der SAP97-mRNA. Klon 12 ist 2353 Nukleotide lang. Er enthält am 3'Ende 69 Basen des in der SAP97-cDNA einmaligen Bereichs und endet 22 Nukleotide vor dem Stopcodon. Klon 13 ist 2317 Nukleotide lang und enthält am 3'Ende 39 Basen des in der SAP90-cDNA einmaligen Bereichs. Er endet ebenfalls 22 Nukleotide vor dem Stopcodon. Die Sequenzen der beiden PCR-Produkte weichen abgesehen von ihren 5' Enden, nur in einem kurzen Abschnitt voneinander ab, der zwischen den Bereichen liegt, die die SH3- und die GK-Domäne codieren. Er ist bei SAP90 39 Basen lang (Nukleotide 1696-1731 im Anhang) und bei SAP97 45 Basen lang (Nukleotide 1996-2037 im Anhang). Über die gesamte übrige Länge von 2239 Basen sind die Sequenzen der beiden PCR-Produkte identisch.

#### Nukleotid- und Aminosäuresequenz von SAP90 und SAP97 des Huhns

Aus den erhaltenen cDNA-Klonen geht die Sequenz von zwei RNA-Molekülen hervor, die für zwei unterschiedliche Proteine codieren. Die Sequenz des einen Transkriptes umfaßt ein 2625 Nukleotide langes offenes Leseraster, die des zweiten Transkriptes umfaßt ein 2328 Nukleotide langes offenes Leseraster. Die daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen zeigen, daß der aminoterminal Abschnitt des längeren Proteins homolog zum Aminoterminus von SAP97 der Ratte ist. Innerhalb dieser ersten 106 Aminosäuren gibt es zwischen den Proteinen von Huhn und Ratte 22 Abweichungen, also 80 % Übereinstimmung. Das kürzere der identifizierten Proteine besitzt einen 10 Aminosäuren langen Aminoterminus, der identisch mit dem Aminoterminus von SAP90 der Ratte ist. In den an diese aminoterminalen Abschnitte anschließenden Bereichen sind die Sequenzen beider Proteine über 753 vollständig identisch. Über diesen in beiden Proteinen vorkommenden Bereich beträgt die Identität zu SAP97 der Ratte 86 %, zu SAP90 der Ratte dagegen nur 73 %.

Da beide Proteine im hinteren Teil fast vollständig die gleiche Sequenz besitzen aber in ihren vordersten Abschnitten ähnlich zu SAP97 der Ratte bzw. identisch zu SAP90 der Ratte sind, werden sie als SAP97- und SAP90-Homologe des Huhns bezeichnet. Auch in der Ratte unterscheiden sich diese beiden Proteine hauptsächlich in ihren aminoterminalen Sequenzabschnitten. Die beiden aus den cDNA-Klonen erhaltenen Transkripte stellen demnach die mRNA von SAP90 und SAP97 dar. Der cDNA-Bereich, der für die

spezifischen Aminotermini codiert, ist bei SAP97 318 Basen lang und bei SAP90 30 Basen lang. Von der 5' UTR der SAP97-mRNA waren 46 Basen und von der 5' UTR der SAP90-mRNA waren 34 Basen in den cDNA-Klonen enthalten. Die amplifizierte 3' UTR ist 663 Basen lang (bis zum Beginn des Poly-A-Schwanz). Achtzehn Nukleotide vor dem Poly-A liegt ein Polyadenylierungssignal. Die 100 % ige Identität der beiden RNA-Sequenzen über 2259 Nukleotide deutet darauf hin, daß beide mRNAs durch ein gemeinsames Gen codiert werden und die verschiedenen Transkripte durch alternatives Spleißen eines gemeinsamen Vorläufertranskriptes entstehen.

Ein weiterer Abschnitt ist bei der mRNA von SAP90 und SAP97 vermutlich unterschiedlich. Er codiert einen Abschnitt, der zwischen der SH3- und der GK-Domäne liegt. Dieser Abschnitt umfaßt bei SAP97 15 Aminosäuren und wird in dieser Arbeit als Insert I bezeichnet. Bei SAP90 ist der Abschnitt 13 Aminosäuren lang und wird als Insert II bezeichnet. Es ist nicht klar, ob Insert I auch in SAP90 vorkommen kann, bzw. ob Insert II auch in SAP97 vorkommen kann. In SAP90 der Ratte ist keines der beiden Inserts zu finden. An der Stelle, wo die Abschnitte im Huhn liegen, ist die Sequenz von SAP90 der Ratte um 26 Aminosäuren kürzer. Die Sequenz von Insert I (SAP97) ist in SAP97 der Ratte enthalten.

SAP97 Huhn (Insert I)	<u>KHVTSNASDSESSYR</u> -----
SAP97 Ratte	<u>KHVTSNASDSESSYHEYGCSKG</u>

Der zwischen Ratte und Huhn identische Teil ist unterstrichen. Die Sequenz von Insert II (SAP90) ist in SAP97 der Ratte zum Teil enthalten.

SAP90 Huhn (Insert II)	----- <u>IILITDEYGCSKG</u>
SAP97 Ratte	<u>KHVTSNASDSESSYHEYGCSKG</u>

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von SAP97 und SAP90 des Huhns mit den Proteinen der Ratte ist in Abb. 8 dargestellt. Die Homologie von SAP97 des Huhns zu SAP97 der Ratte beträgt 89,7 %. Dabei treten die Unterschiede überwiegend in bestimmten Sequenzabschnitten auf. Zwischen den Aminosäure 161 und 162 (in der Hühnersequenz, vor der 1. PDZ-Domäne) sind bei der Ratte 33 zusätzliche Aminosäuren vorhanden. In dem acht Aminosäuren langen Abschnitt zwischen der 1. und 2. PDZ-Domäne sind die Sequenzen vollkommen unterschiedlich und zwischen der 2. und 3. PDZ-Domäne sind sie stark unterschiedlich. Zwischen der SH3- und der GK-Domäne kommen in der Ratte sieben zusätzliche Aminosäuren vor. Innerhalb der PDZ-, SH3- und GK-Domänen treten nur sehr wenige Unterschiede auf.

## mRNA und cDNA-Klone von SAP97/SAP90

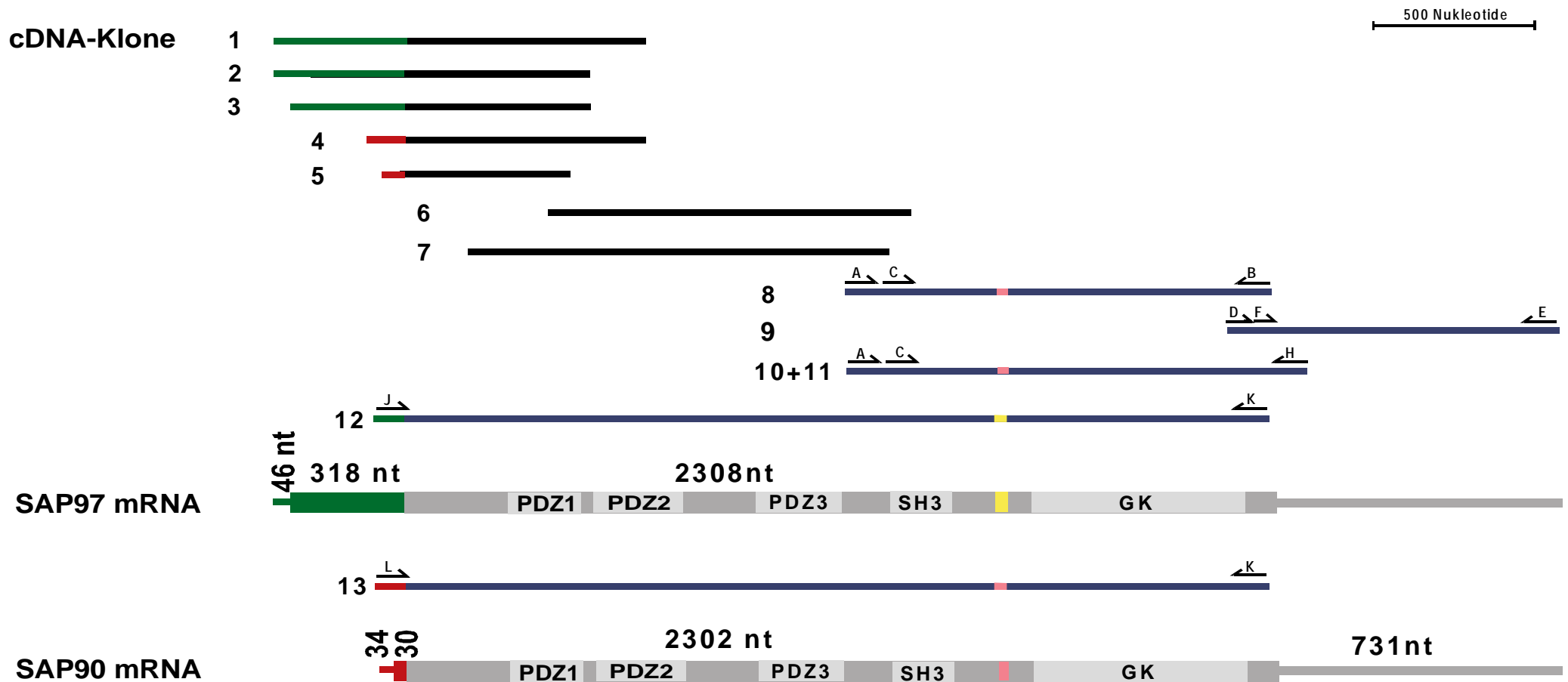


Abb. 7 Im oberen Teil des Bildes ist die Länge und die relative Lage der cDNA-Klone im Vergleich zur mRNA von SAP97 und SAP90 dargestellt, die darunter als dicke Balken dargestellt ist. Die aus einer cDNA-Bank isolierten Klone sind in schwarz und die durch PCR erhaltenen Klone in blau dargestellt. Über den PCR-Produkten sind die für die Amplifikation eingesetzten Primer dargestellt. Ihre Sequenzen sind bei 1.1.1 unter den entsprechenden Bezeichnungen angegeben. In den grün und rot dargestellten Abschnitten unterscheiden sich die Sequenzen der cDNA-Klone, dagegen sind die Sequenzen dieser Klone im dahinter liegenden schwarz dargestellten Bereich identisch. Die langen PCR-Produkte 12 + 13 haben gezeigt, daß die mRNAs von SAP97 und SAP90 nur in den vordersten grün und rot dargestellten Bereichen eine unterschiedliche Sequenz besitzen und fast über den gesamten Bereich identisch sind (in grau dargestellt). Die beiden PCR-Produkten unterscheiden sich außerdem in einem kurzen Abschnitt, der in gelb und in rosa dargestellt ist. Die schmalen Balken im Schema der mRNAs sind untranslatierte Bereiche.

1	MPVRRKQDTQRALRLLQEYRSKLSQAEDRQLRNSIERVIGIFQSNLFLQALIDIQEFYEVTLSAP97 Huhn
1	MPVRRKQDTQRALHLLLEEYRSKLSQTEDRQLRSSIERVISIFQSNLFLQALIDIQEFYEVTLSAP97 Ratte
61	LDNPKCIDHSPSEPIQPVNTWDFSSLPSTTVTSETLPSSLSPSVEKYRYQDEEDTTPQEH SAP97 Huhn
61	LDNPKCVDHSPKQCEPVQPGNPWESGSLSSAAVTSESLPGGLSPPEVEKYRYQDEEVLPSER SAP97 Ratte
121	SSPHIANEVTGPELVHVSEKNLSQIENVHGFVSHSHISPVK----- SAP97 Huhn
121	ISPVQVNEVLGPELVHVSEKSLSEIENVHGFVSHSHISPIKPTAEAVPPSSPIVPVTPALP SAP97 Ratte
162	-----ANPPVVLVNTDSDLDTPTVYNGTDADYEYEEITLERGNSGLGFSLIAG SAP97 Huhn
181	VPAESPVVLPSTPQANPPVVLVNTDSDLDTPTVYNGTDADYEYEEITLERGNSGLGFSLIAG SAP97 Ratte
208	GTDNPHIGDDSSIFITKIIAGGAAAQDGRLLRVNDICILRVNEVDVDRDVTSHSKAVEALKEAG SAP97 Huhn
241	GTDNPHIGDDSSIFITKIIITGGAAAQDGRLLRVNDICILRVNEADVDRDVTSHSKAVEALKEAG SAP97 Ratte
268	SIVRLYVKRRKPVTEKIVEIKLVKGPKGLGFSLIAGGVGNQHIPGDNSIYVTKIIIEGGAH SAP97 Huhn
301	SIVRLYVKRRKAFR-KNHEIKLTKGPKGLGFSLIAGGVGNQHIPGDNSIYVTKIIIEGGAH SAP97 Ratte
328	KDGKLLQIGDKLLAVNSVCLLEEVTHEEAVTALKNTSDFVYLKVAKPTSMFMNDSYALLTSQ SAP97 Huhn
360	KDGKLLQIGDKLLAVNSVCLLEEVTHEEAVTALKNTSDFVYLKAAKPTSMYINDGYAPPDIT SAP97 Ratte
388	TLLIQPVDPNPHYHSICYLGLQSLPPASPGRYSPIPKGMLGDDEITREPRKVVLRGSGTGLGF SAP97 Huhn
420	NSSSQSVDNHVSPPSSYLGLQ--TPASPARYSPIISKAVLGDDEITREPRKVVLRGSGTGLGF SAP97 Ratte
448	NI VGGEDGEGIFISFILAGGPADLSGELRKGDRIIISVNGVDLKAATHEQAATALKNAGQA SAP97 Huhn
478	NI VGGEDGEGIFISFILAGGPADLSGELRKGDRIIISVNSVDLRAASHEQAATAALKNAGQA SAP97 Ratte
508	VTIVAQYRPEEYSRFEAKIHDRLREQMMNSSISSGSGSLRTSQKRSLYVRLAFDYDKTKDS SAP97 Huhn
538	VTIVAQYRPEEYSRFEAKIHDRLRETMNNSVSSGSGSLRTSQKRSLYVRLAFDYDKTKDS SAP97 Ratte
568	GLPSQGLNFKFGDILHVINASDDEWQARQVTPDGESDEIGVIPSRRRVEKKERARLKTV SAP97 Huhn
598	GLPSQGLNFKFGDILHVINASDDEWQARQVTPDGESDEIGVIPSRRRVEKKERARLKTV SAP97 Ratte
628	KFNSKTRGEGKEVPDDMGSKGLKHVTSNASDSESSYR-----GQEEYVLSYEQVNQQE SAP97 Huhn
658	KFNSKTRGDKGELTPDDMGSKGLKHVTSNASDSESSYHEYGCSSKGGQEEYVLSYEPVNQQE SAP97 Ratte
681	VNYTRPVIIVLGP MKDRINDDLISEFPDKFGSCVPHTTRPKRDYEVDRDYHFVTSREQME SAP97 Huhn
718	VNYTRPVIILGPMKDRVNDLISEFPDKFGSCVPHTTRPKRDYEVDRDYHFVTSREQME SAP97 Ratte
741	KDIQEHKFFIEAGQYNNHLYGTSVQSVREVAEKGKHCILDVSGNAIKRLQIAQLYPIISIFI SAP97 Huhn
778	KDIQEHKFFIEAGQYNNHLYGTSVQSVRAVAEKGKHCILDVSGNAIKRLQIAQLYPIISIFI SAP97 Ratte
801	KPKTVENIMEMNKR LTEEQARKTFERAMKLEQEFTEHFTAI IQGDTLEEIYNQVKQIEE SAP97 Huhn
838	KPKSMENIMEMNKR LTEEQARKTFERAVRLEQEFTEHFTAI IQGDTLEEDIYNQVKQIEE SAP97 Ratte
861	QSGPYIWWVPAKEKL SAP97 Huhn
898	QSGPYIWWVPAKEKL SAP97 Ratte
1	MDCLCIVTTKKYRYQDEEDTTPQEHSSPHIANEVTGPELVHVSEKNLSQIENVHGFVSHSH SAP90 Huhn
1	MDCLCIVTTKKYRYQDEEDTTPLEHSPAHLPNQ----- SAP90 Ratte
61	ISPVKANPPVVLVNTDSDLDTPTY--VNGTDADYEYEEITLERGNSGLGFSLIAGGTDNPH SAP90 Huhn
33	-----ANSPPVIVNTDITLEAPGYELQVNGTEGELE YEEITLERGNSGLGFTIAGGTDNPH SAP90 Ratte
118	IGDDSSIFITKIIAGGAAAQDGRLLRVNDICILRVNEVDVDRDVTSHSKAVEALKEAGSIVRLY SAP90 Huhn
88	IGDDPSIFITKIIIPGGAAAQDGRLLRVNDIILFVNEVDVREVTSHSAAVEALKEAGSIVRLY SAP90 Ratte
178	VKRRKPVTEKIVEIKLVKGPKGLGFSLIAGGVGNQHIPGDNSIYVTKIIIEGGAHKGDKGLQ SAP90 Huhn
148	VMRRKPPAEKVMKIKLTKGPKGLGFSLIAGALGTSIIPGDNSIYVTKIIIEGGAHKGDKGLQ SAP90 Ratte
238	IGDKLLAVNSVCLLEEVTHEEAVTALKNTSDFVYLKVAKPTSMFMNDSYALLTSQTLILQP SAP90 Huhn
208	IGDKLILAVNSVGLLEDVMHEDAVAAALKNTYDVVYLKVAKPSNAYLSDTYAPPDITTSYSQH SAP90 Ratte
298	VDPNPHYHSICYLGLQ---SLPPASPGRYSPIPKGMLGDDEITREPRKVVLRGSGTGLGFNI SAP90 Huhn
268	LDNEISHSSYLGTDYPTAMTPTSPRRRYSPPVAKDILLGEEDIPREPRRIIVITHRGSGTGLGFNI SAP90 Ratte
354	VGGEDGEGIFISFILAGGPADLSGELRKGDRIIISVNGVDLKAATHEQAATALKNAGQAVT SAP90 Huhn
328	VGGEDGEGIFISFILAGGPADLSGELRKGDRIIISVNGVDLRNASHEQAATAALKNAGQAVT SAP90 Ratte
414	IVAQYRPEEYSRFEAKIHDRLREQMMNSSISSGSGSLRTSQKRSLYVRLAFDYDKTKDSGL SAP90 Huhn
388	IIAQYKPEEYSRFEAKIHDRLREQLMNSSLGSGTASLRSNPKRGFYIRALFDYDKTKDCGF SAP90 Ratte
474	PSQGLNFKFGDILHVINASDDEWQARQVTPDGESDEIGVIPSRRRVEKKERARLKTVKF SAP90 Huhn
448	LSQALSFRFGDVLHVIDAGDEEWWQARRVHSDSETDDIGFIPSRRRVERREWSRLKAKDW SAP90 Ratte
534	NSKTRGEGKEVPDDMGSKGLIILITIDEYGCSSKGGQEEYVLSYEQVNQQEVN YTRPVIIV-L SAP90 Huhn
508	GSSS-----GSGRDES SVLSYETVTQM EVHYARPIIISL SAP90 Ratte
593	GPMKDRINDDLISEFPDKFGSCVPHTTRPKRDYEVDRDYHFVTSREQMEKDIQEHKFFIE SAP90 Huhn
542	DPPKTVPTMIFSPSSPDKFGSCVPHTTRPKREYETIDGRDYHFVSSREKMEKDIQAHKFFIE SAP90 Ratte
653	AGQYNNHLYGTSVQSVREVAEKGKHCILDVSGNAIKRLQIAQLYPIISIFIKPKTVENIME SAP90 Huhn
602	AGQYNSHLYGTSVQSVREVAEQGKHCILDVSPANAVRRLQAAHLHPAIAIFIRPRLLENVLE SAP90 Ratte
713	MNKR LTEEQARKTFERAMKLEQEFTEHFTAI IQGDTLEEIYNQVKQIEEQSGPYIWWVPA SAP90 Huhn
662	INKRITTEEQARKAFDRATKLEQEFTECFSAIVEGDSFEEIYHKVVKRVIDLSGPYIWWVPA SAP90 Ratte
773	KEKL SAP90 Huhn
722	RERL SAP90 Ratte

Abb. 8 Vergleich der Aminosäuresequenzen von SAP97 (oben) und SAP90 (unten) zwischen Huhn und Ratte. Alle unterschiedlichen Aminosäuren sind blau unterlegt. Die PDZ-Domänen sind rot, die SH3-Domäne blau und die GK-Domäne ist grün unterstrichen.

Die Homologie zwischen SAP90 des Huhns und SAP90 der Ratte ist mit 72,6 % sehr viel geringer. Die ersten 10 Aminosäuren sind mit denen des Proteins der Ratte identisch. Dahinter sind zahlreiche Aminosäureabweichungen über die gesamte Sequenz verteilt und es gibt einige Abschnitte, die extrem unterschiedlich sind. Vor der ersten PDZ-Domäne fehlen bei der Ratte 33 Aminosäuren im Vergleich zur Sequenz des Huhns. Zwischen der 1. und 2. PDZ-Domäne und zwischen der 2. und 3. PDZ-Domäne sind die Sequenzen extrem unterschiedlich. Zwischen der SH3 und der GK-Domäne fehlen bei der Ratte 26 Aminosäuren und die Sequenzen sind sehr abweichend. Auch innerhalb der SH3- und der GK-Domänen sind die Sequenzunterschiede relativ groß.

### **3.1.1.2 Chapsyn110**

Aus der cDNA-Bank konnten acht überlappende cDNA-Klone isoliert werden, die als cDNA-Fragmente des zu Chapsyn110 homologen Proteins des Huhns identifiziert wurden (Abb. 9). Für die erste Durchmusterung wurden cDNA-Fragmente von Chapsyn110 der Ratte verwendet (Acc. U49049, Nukleotide 690-1389) und in weiteren Durchgängen Chapsyn110-cDNA-Fragmente des Huhns. Der gesamte ermittelte Sequenzbereich umfaßt 3519 Nukleotide. Darin ist ein 2559 Nukleotide langes offenes Leseraster enthalten, was der gesamten codierenden Region der Chapsyn110-mRNA entspricht. Von der 5' UTR konnten 207 Basen sequenziert werden und von der 3' UTR 753 Basen. Es wurden zwei verschiedene Gruppen von cDNA-Klonen gefunden, die in einem bestimmten Abschnitt unterschiedlich sind. Dies zeigt, daß die mRNA in zwei verschiedenen Spleißvarianten vorkommen kann. Eine der beiden Formen enthält einen Abschnitt von 156 Nukleotiden, der in der anderen Form nicht vorhanden ist. Daraus läßt sich ein Sequenzabschnitt von 52 Aminosäuren ableiten, um die sich beide Isoformen von Chapsyn110 in der Länge unterscheiden. Der Bereich liegt zwischen der 2. und 3. PDZ-Domäne. Die zu der langen Form homologe Sequenz von Chapsyn110 der Ratte ist bei (Niethammer et al., 1996) aufgeführt. Eine Isoform, die der kürzeren Variante entspricht, ist bei der Ratte nicht bekannt. Die Aminosäuresequenzen von Chapsyn110 von Huhn und Ratte sind zu 95,2 % identisch. Es treten nur wenige Aminosäuresubstitutionen auf, die vorwiegend zwischen der 2. und 3. PDZ-Domäne liegen (Abb. 10).

### **3.1.1.3 SAP102**

Es konnte ein Klon, aus der cDNA-Bank isoliert werden, der als cDNA-Fragment des zu SAP102 homologen Proteins des Huhns identifiziert wurde (Abb. 9). Für die

Durchmusterung wurde ein cDNA-Fragment von SAP102 der Ratte eingesetzt (Acc. U50147, Nukleotide 1920-2341). Bei weiteren Durchmusterungen wurde das erhaltene cDNA-Fragment des Huhns eingesetzt, wobei aber keine weiteren Klone von SAP102 gefunden wurden. Ein weiterer Abschnitt der SAP102-cDNA wurde durch PCR amplifiziert. Aus den cDNA-Klonen konnte ein Sequenzabschnitt von 1632 Nukleotiden Länge bestimmt werden. Der Abschnitt liegt in der codierenden Region der SAP102-mRNA, besitzt also ein durchgehendes offenes Leseraster. Aus dieser Nukleotidsequenz läßt sich ein Teil der Aminosäuresequenz von SAP102 ableiten. Der Abschnitt beginnt in der Mitte der zweiten PDZ-Domäne und endet 13 Aminosäuren vor dem Ende der GK-Domäne. Über diesen Bereich sind die Sequenzen von SAP102 des Huhns und der Ratte sehr stark konserviert, die Übereinstimmung beträgt 95,8 % (Abb. 10).

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, daß die PDZ-, SH3- und GK-Domänen zwischen den Spezies-Homologen stark konserviert sind, während die zwischen diesen Domänen liegenden Bereiche deutlicher voneinander abweichen.

## mRNA und cDNA-Klone von Chapsyn110 und SAP102

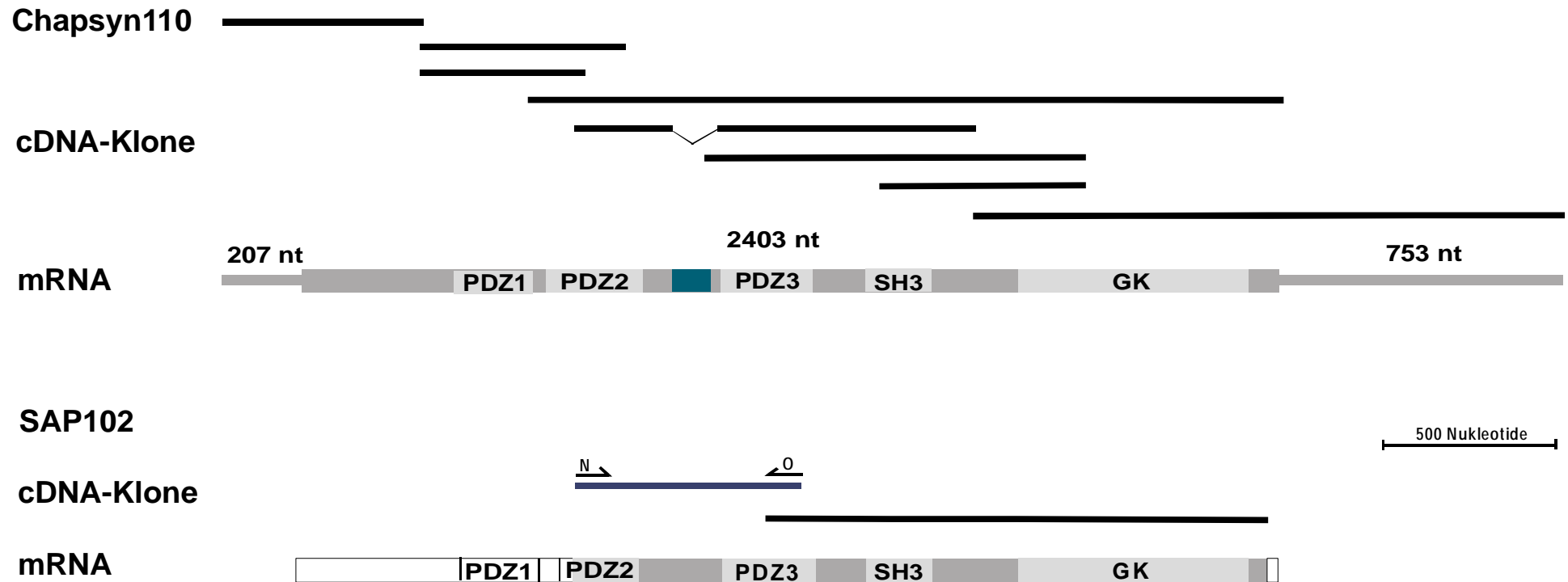


Abb. 9 In der Abbildung ist die relative Lage der cDNA-Klone, aus denen die Sequenz der mRNA von Chapsyn110 und SAP102 ermittelt wurde, im Vergleich zur mRNA dargestellt. Die aus einer cDNA-Bank isolierten Klone sind in schwarz und der durch PCR erhaltene Klon in blau dargestellt. Über dem PCR-Produkt sind die eingesetzten Primer dargestellt, ihre Sequenz ist bei 1.1.1 unter den entsprechenden Bezeichnungen angegeben. Die schmalen Balken im Schema der mRNAs sind untranslatierte Bereiche. In weiß dargestellte Sequenzbereiche konnten nicht aus der cDNA-Bank isoliert oder amplifiziert werden. Es wurden cDNA-Klone von Chapsyn110 gefunden, die zwei unterschiedliche Isoformen codieren. Bei einer davon fehlt ein 156 Nukleotide langer Sequenzabschnitt, der in der mRNA hellblau dargestellt ist.



1	MFFACYCALRRTNVKKYRYQDEEDAPHDHTLPRLTHEVVRGPELVHVSEKNLSQIENVHGYVL	Chapsyn110 Huhn
1	MFFACYCALRRTNVKKYRYQDEED <u>G</u> PHDH <u>S</u> LPRLTHEVVRGPELVHVSEKNLSQIENVHGYVL	Chapsyn110 Ratte
61	QSHISPLKASPAPIIVNTD <del>T</del> LDTIPYVNGTEIEIEYEFEEITLERGNSGLGFSIAGGTDNPH	Chapsyn110 Huhn
61	QSHISPLKASPAPIIVNTD <del>T</del> LDTIPYVNGTEIEIEYEFEEITLERGNSGLGFSIAGGTDNPH	Chapsyn110 Ratte
121	IGDDPGIFITKIIIPGGAAAEDGRLRVND <del>C</del> ILRVNEVDVSEVSHSKAVEALKEAGSIVRLY	Chapsyn110 Huhn
121	IGDDPGIFITKIIIPGGAAA <u>E</u> DGRLRVND <del>C</del> ILRVNEVDVSEVSHSKAVEALKEAGSIVRLY	Chapsyn110 Ratte
181	VRRRRRPILETVVEIKLKF <del>K</del> GPKGLGFSIAGGVGNQHHPGDNSIYVTKIIIEGGAAQKDGRLQ	Chapsyn110 Huhn
181	VRRRRRPILETVVEIKLKF <del>K</del> GPKGLGFSIAGGVGNQHHPGDNSIYVTKII <u>D</u> GGAAQKDGRLQ	Chapsyn110 Ratte
241	VGDRLLMVNNYSLEEVTHEEAVAILKNTSDVVYLKVGKPTTIYMTDPYGGPPDITHSYSP	Chapsyn110 Huhn
241	VGDRLLMVNNYSLEEVTHEEAVAILKNTSDVVYLKVGKPTTIYMTDPYGGPPDITHSYSP	Chapsyn110 Ratte
301	MENHILSSGNGTLEYKASLAPISPGRYSPIPKHMLVEDDYTRPPEPVYSTQFVHSAVNR	Chapsyn110 Huhn
301	MENH <u>L</u> LS- <u>G</u> NNGTLEYK <u>T</u> SL <u>P</u> ISPGRYSPIPKHMLVEDDYTRPPEPVYST <u>V</u> NKLCDKPA	Chapsyn110 Ratte
361	FRRHYS <del>P</del> VECDKNFLLTAPYPHYHIGLLPDSEITSHSQHSTATRPP <del>T</del> VSLQRTISVEGEP	Chapsyn110 Huhn
360	<u>S</u> PRRHYS <del>P</del> VECDK <u>S</u> FL <u>S</u> TYPHYHL <u>L</u> GLLPDS <u>D</u> MTSHSQHSTATR <u>Q</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>T</u> L <u>Q</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>P</u>	Chapsyn110 Ratte
421	RKII <del>L</del> LHKGSTGLGFNI <del>V</del> GGEDGEGIFVSVFILAGGPADLSGELQ <del>R</del> GDQILSVNGIDL <del>R</del> GAT	Chapsyn110 Huhn
420	RK <u>V</u> <u>V</u> LHKGSTGLGFNI <del>V</del> GGEDGEGIFVSVFILAGGPADLSGELQ <del>R</del> GDQILSVNGIDL <del>R</del> GAT <u>S</u>	Chapsyn110 Ratte
481	HEQAAAAALKGAGQTVTIIAQYQPEEYARFEAKIHDLREQMMNHSMS <del>S</del> SGSGLRTNQK <del>R</del> SL	Chapsyn110 Huhn
480	HEQAAAAALKGAGQTVTIIAQYQ <u>P</u> EYARFEAKIHDLREQMMNHSMS <del>S</del> SGSGLRTNQK <del>R</del> SL	Chapsyn110 Ratte
541	YVRAMFDYDKSKDSGLPSQGLSFKYGDILHVINASDDEW <del>W</del> QARRVTL <del>E</del> GDSEEMGVIPSK	Chapsyn110 Huhn
540	YVRAMFDYDKSKDSGLPS <u>Q</u> GLSFKYGDILHVINASDDEW <del>W</del> QARRV <u>T</u> <u>L</u> <u>D</u> GDSEEMGVIPSK	Chapsyn110 Ratte
601	RRVERKERARLKT <del>V</del> KFNAPGVIDAKGDI <del>P</del> GLGDDGGYGT <del>K</del> TLRGQEDCILSYEPVTRQEI	Chapsyn110 Huhn
600	RRVERKERARLKT <del>V</del> KFNAPGVID <u>S</u> KGDI <del>P</del> GLGDDGGYGT <del>K</del> TLRGQED <u>L</u> ILSYEPVTRQEI	Chapsyn110 Ratte
661	NYTRPVIILGPMKDRINDDLISEFPDKFGSCVPHTTRPKRDYEVDGRDYHFV <del>I</del> SREQMEK	Chapsyn110 Huhn
660	NYTRPVIILGPMKDRINDDLISEFPDKFGSCVPHTTRPKRDYEVDGRDYHFV <del>I</del> SREQMEK	Chapsyn110 Ratte
721	DIQE <del>H</del> K <del>L</del> IEAGQYNDNL <del>Y</del> GTSVQSVRFVAER <del>G</del> KHCILDVS <del>G</del> NAIKRLQVAQLYPIAIFIK	Chapsyn110 Huhn
720	DIQE <del>H</del> K <u>L</u> IEAGQYNDNL <del>Y</del> GTSVQSVRFVA <u>V</u> R <del>G</del> KHCILDVS <del>G</del> NAIKRLQVAQLYPIAIFIK	Chapsyn110 Ratte
781	PKSWEPLMEMNKR <del>L</del> TEEQAKKTYDRAIKLEQEFGEYFTAIVQGD <del>S</del> LEDIYNQCKLVIEEQ	Chapsyn110 Huhn
780	PK <u>S</u> <u>L</u> EPLMEMNKR <del>L</del> TEEQAKKTYDRAIKLEQEFGEYFTAIVQGD <u>T</u> LEDIYNQCKLVIEEQ	Chapsyn110 Ratte
841	SGPFIWIP <del>S</del> KEKL	Chapsyn110 Huhn
840	<u>S</u> GPFIWIP <del>S</del> KEKL	Chapsyn110 Ratte
1	GGAAQKDGRLQIGDRLLAVNNTNLQDVRHEEAVAALKNTSDVVYLKVAKPGSLHLNDMY	SAP102 Huhn
280	<u>G</u> GAAQKDGRLQIGDR <u>L</u> LAVNNTNLQDVRHEEAVA <u>S</u> LKNTSD <u>M</u> VYLKVAKPGSLHLNDMY	SAP102 Ratte
60	APPDYASTF <del>S</del> ALADNHISHNSSSLG <del>Y</del> LG <del>V</del> ESKPAYVPPQVTPSRYSPIPRHMI <del>G</del> DEDF	SAP102 Huhn
340	APPDYASTF <u>T</u> ALADNHISHNSSSLG <del>Y</del> LG <u>A</u> VESK <u>V</u> TYPAPPQV <u>P</u> <u>P</u> TRYSPIPRHMLAEDF	SAP102 Ratte
120	REPRKII <del>L</del> LHKGSTGLGFNI <del>V</del> GGEDGECIFVSVFILAGGPADLSGELRRGDRI <del>L</del> SVNGVNL <del>R</del>	SAP102 Huhn
400	REPR <u>K</u> II <del>L</del> LHKGSTGLGFNI <del>V</del> GGEDGEC <u>I</u> FVSVFILAGGPADLSGELRRGDRI <del>L</del> SVNGVNL <del>R</del>	SAP102 Ratte
180	NATHEQAAAAALKRAGQTVTIIAQYRPEEYSRFESKIHDLREQMMNSSMS <del>S</del> SGSGLRTSEK	SAP102 Huhn
460	NATHEQAAAAALKRAGQ <u>S</u> VTI <u>V</u> AQYRPEEYSRFESKIHDLREQMMNSSMS <del>S</del> SGSGLRTSEK	SAP102 Ratte
240	RSLYVRALFDYDRTRDSC <del>L</del> PSQGLSFSYGDILHVINASDDEW <del>W</del> QARLVTPHGESEQIGVI	SAP102 Huhn
520	RSLYVRALFDYDRTRDSC <del>L</del> PSQGLSFSYGDILHVINASDDEW <del>W</del> QARLVTPHGESEQIGVI	SAP102 Ratte
300	PSKRRVEKKERARLKT <del>V</del> KFHARTGMIESNRDFPGLSDDYYGAKNLKGVTSNTSDSESSK	SAP102 Huhn
580	PSK <u>R</u> VEKKERARLKT <del>V</del> KFHARTGMIESNRDFPGLSDDYYGAKNLKGVTSNTSDSESSK	SAP102 Ratte
360	GQEDTILSYEPVTRQEIH <del>Y</del> ARPV <del>I</del> IVGPTKDRINDDLISEFP <del>H</del> KFGSCVPHTTRPRRDNE	SAP102 Huhn
640	GQED <u>A</u> ILSYEPVTRQEIH <u>Y</u> ARPV <del>I</del> IVGPTKDRINDDLISEFP <del>H</del> KFGSCVPHTTRPRRDNE	SAP102 Ratte
420	VDGQDYHFVVSREQMEKDIQDNK <del>F</del> IEAGQFN <del>D</del> NLYGTSIQSVRAVAER <del>G</del> KHCILDVS <del>G</del> NA	SAP102 Huhn
700	VDGQDYHFVVSREQMEKDIQDNK <del>F</del> IEAGQFN <del>D</del> NLYGTSIQSVRAVAER <del>G</del> KHCILDVS <del>G</del> NA	SAP102 Ratte
480	IKRLQQAQLYPIAIFIKPKSIEALMEMNRRQTYEQANKVFDKAMKLEQEFGEYFTAIVQG	SAP102 Huhn
760	IKRLQQAQLYPIAIFIKPKSIEALMEMNRRQTYEQANK <u>I</u> FDKAMKLEQEFGEYFTAIVQG	SAP102 Ratte
540	DSLPE <u>F</u>	SAP102 Huhn
820	<u>D</u> SL <u>E</u> E <u>I</u> YNKIKQIIE <u>D</u> QSGHYI <del>W</del> VPSPEKL	SAP102 Ratte

Abb. 10 Vergleich der Aminosäuresequenzen von Chapsyn110 (oben) und SAP102 (unten) zwischen Huhn und Ratte. Alle unterschiedlichen Aminosäuren sind blau unterlegt. Die PDZ-Domänen sind rot, die SH3-Domäne blau und die GK-Domäne ist grün unterstrichen.

### 3.1.2 Vergleich der synapsenassoziierten Proteine des Huhns

Die vier SAP des Huhns sind über den größten Teil ihrer Aminosäuresequenzen stark konserviert (Abb. 11). Dieser konservierte Bereich beginnt 85 Aminosäuren vor dem Beginn der ersten PDZ-Domäne. Vor diesem Punkt liegt der aminoterminaler Abschnitt der SAP, der für jedes Protein spezifisch ist. Diese aminoterminalen Abschnitte sind in allen vier SAP unterschiedlich lang und besitzen keine Ähnlichkeit zueinander. Der spezifische Aminoterminus von SAP97 ist 106 Aminosäuren lang und damit sehr viel länger als bei den anderen SAP, der von SAP90 ist zehn Aminosäuren lang und der von Chapsyn110 ist 14 Aminosäuren lang. Weitere Unterschiede treten vorwiegend in den Abschnitten zwischen der 2. und 3. PDZ-Domäne und zwischen der SH3- und der GK-Domäne auf. Chapsyn-110 hat zwischen der 2. und 3. PDZ-Domäne einen Abschnitt, der in den anderen SAP nicht vorhanden ist. In diesem Teil erfolgt alternatives Spleißen, wobei es eine kürzere und eine um 52 Aminosäuren längere Form gibt. Die Sequenzen innerhalb der PDZ-, SH3- und GK-Domänen sind stark konserviert. Zum Beispiel ist die PDZ-Domäne 1 zwischen SAP90 und Chapsyn110 zu 90,3% identisch, PDZ-Domäne 2 zu 85,1% und PDZ-Domäne 3 zu 80,2%. Dagegen haben die drei PDZ-Domänen innerhalb eines Moleküls sehr viel weniger Übereinstimmung. Bei SAP90 sind die PDZ-Domäne 1 und 2 zu 53,4% identisch, PDZ-Domäne 2 und 3 zu 40,2% und PDZ-Domäne 1 und 3 zu 47,6%.

1	M P V R K Q D T Q R A L R L L Q E Y R S K L S Q A E D R Q L R N S I E R V I G I	SAP97
1	- - - - -	SAP90
1	- - - - -	Chapsyn110
	- - - - -	SAP102
41	F Q S N L F Q A L I D I Q E F Y E V T L L D N P K C I D H S Q P S E P I Q P V N	SAP97
1	- - - - -	SAP90
1	- - - - -	Chapsyn110
	- - - - -	SAP102
81	T W D F S S L P S T T V T S E T L P S S L S P S V E K Y R Y Q D E D T P P Q E H	SAP97
1	- - - - - M D C L C I V T T K K Y R Y Q D E D T P P Q E H	SAP90
1	- - - - - M F F A C Y C A L R T N V K K Y R Y Q D E D A P H D H T	Chapsyn110
	- - - - -	SAP102
121	S S P H I A N E V T G P E L V H V S E K N L S Q I E N V H G F V S H S H I S P V	SAP97
25	S S P H I A N E V T G P E L V H V S E K N L S Q I E N V H G F V S H S H I S P V	SAP90
29	L P R L T H - E V R G P E L V H V S E K N L S Q I E N V H G Y V L Q S H I S P L	Chapsyn110
	- - - - -	SAP102
161	K A N P P P V L V N T D S L D T P T Y V N G T D A D Y E Y E E I T L E R G N S G	SAP97
65	K A N P P P V L V N T D S L D T P T Y V N G T D A D Y E Y E E I T L E R G N S G	SAP90
68	K A S P A P I I V N T D T L D T I P Y V N G T E I E Y E F E E I T L E R G N S G	Chapsyn110
269	- - - - -	SAP102
201	L G F S I A G G T D N P H I G D D S S I F I T K I I A G G A A A Q D G R L R V N	SAP97
105	L G F S I A G G T D N P H I G D D S S I F I T K I I A G G A A A Q D G R L R V N	SAP90
108	L G F S I A G G T D N P H I G D D P G I F I T K I I P G G A A A E D G R L R V N	Chapsyn110
	- - - - -	SAP102
241	D C I L R V N E V D V R D V T H S K A V E A L K E A G S I V R L Y V K R R K P V	SAP97
145	D C I L R V N E V D V R D V T H S K A V E A L K E A G S I V R L Y V K R R K P V	SAP90
148	D C I L R V N E V D V S E V S H S K A V E A L K E A G S I V R L Y V R R R R P I	Chapsyn110
	- - - - -	SAP102
281	T E K I V E I K L V K G P K G L G F S I A G G V G N Q H I P G D N S I Y V T K I	SAP97
185	T E K I V E I K L V K G P K G L G F S I A G G V G N Q H I P G D N S I Y V T K I	SAP90
188	L E T V V E I K L F K G P K G L G F S I A G G V G N Q H I P G D N S I Y V T K I	Chapsyn110
	- - - - -	SAP102
321	I E G G A A H K D G K L Q I G D K L L A V N S V C L E E V T H E E A V T A L K N	SAP97
225	I E G G A A H K D G K L Q I G D K L L A V N S V C L E E V T H E E A V T A L K N	SAP90
228	I E G G A A Q K D G R L Q V G D R L L M V N N Y S L E E V T H E E A V A I L K N	Chapsyn110
1	- - - N T N L Q D V R H E E A V A A L K N	SAP102
361	T S D F V Y L K V A K P - - - - - T S M F M N D S Y A L L T S Q T L	SAP97
265	T S D F V Y L K V A K P - - - - - T S M F M N D S Y A L L T S Q T L	SAP90
268	T S D V V Y L K V G K P - - - - - T T I Y M T D P Y G P P D I T H S Y S P P M	Chapsyn110
38	T S D V V Y L K V A K P G S L H L N D M Y A P P D Y A S T F S A L A D N H I S H	SAP102
390	I L Q P V D N P Y H S I C Y L G Q S L P P A S P G R Y S P I P K G M L G D D E I	SAP97
294	I L Q P V D N P Y H S I C Y L G Q S L P P A S P G R Y S P I P K G M L G D D E I	SAP90
302	E N H I L S S G N N G T L E Y K A S L A P I S P G R Y S P I P K H M L V E D D Y	Chapsyn110
78	N S S L G Y L G G V E S K P A Y P V P P Q V T P S R Y S P I P R H M I G D E D F	SAP102
430	T R - - - - -	SAP97
334	T R - - - - -	SAP90
342	T R P P E P V Y X T Q F V H S A V N R F R R H Y S P V E C D K N F L L T A P Y P	Chapsyn110
118	T R - - - - -	SAP102
432	- - - - - E P R	SAP97
336	- - - - - E P R	SAP90
382	H Y H I G L L P D S E I T S H S Q H S T A T R P P T V S L Q R T I S V E G E P R	Chapsyn110
120	- - - - - E P R	SAP102

435	K V V L H R G S T G L G F N I V G G E D G E G I F I S F I L A G G P A D L S G E	SAP97
339	K V V L H R G S T G L G F N I V G G E D G E G I F I S F I L A G G P A D L S G E	SAP90
422	K I I L H K G S T G L G F N I V G G E D G E G I F V S F I L A G G P A D L S G E	Chapsyn110
123	K I I L H K G S T G L G F N I V G G E D G E C I F V S F I L A G G P A D L S G E	SAP102
475	L R K G D R I I S V N G V D L K A A T H E Q A A T A L K N A G Q A V T I V A Q Y	SAP97
379	L R K G D R I I S V N G V D L K A A T H E Q A A T A L K N A G Q A V T I V A Q Y	SAP90
462	L Q R G D Q I L S V N G I D L R G A T H E Q A A A A L K G A G Q T V T I I A Q Y	Chapsyn110
163	L R R G D R I L S V N G V N L R N A T H E Q A A A A L K R A G Q T V T I I A Q Y	SAP102
515	R P E E Y S R F E A K I H D L R E Q M M N S S I S S G S G S L R T S Q K R S L Y	SAP97
419	R P E E Y S R F E A K I H D L R E Q M M N S S I S S G S G S L R T S Q K R S L Y	SAP90
502	Q P E E Y A R F E A K I H D L R E Q M M N H S M S S G S G S L R T N Q K R S L Y	Chapsyn110
203	R P E E Y S R F E S K I H D L R E Q M M N S S M S S G S G S L R T S E K R S L Y	SAP102
555	V R A L F D Y D K T K D S G L P S Q G L N F K F G D I L H V I N A S D D E W W Q	SAP97
459	V R A L F D Y D K T K D S G L P S Q G L N F K F G D I L H V I N A S D D E W W Q	SAP90
542	V R A M F D Y D K S K D S G L P S Q G L S F K Y G D I L H V I N A S D D E W W Q	Chapsyn110
243	V R A L F D Y D R T R D S C L P S Q G L S F S Y G D I L H V I N A S D D E W W Q	SAP102
595	A R Q V T P D G E S D E I G V I P S K R R V E K K E R A R L K T V K F N S K T R	SAP97
499	A R Q V T P D G E S D E I G V I P S K R R V E K K E R A R L K T V K F N S K T R	SAP90
582	A R R V T L E G D S E E M G V I P S K R R V E R K E R A R L K T V K F N A K P G	Chapsyn110
283	A R L V T P H G E S E Q I G V I P S K K R V E K K E R A R L K T V K F H A R T G	SAP102
635	G E K G E V P D D M G S K G L - - - - - K H V T S N A S D S E S S Y R G Q E E	SAP97
539	G E K G E V P D D M G S K G L - - - - - - - I I L I T D E Y G C S K G G Q E E	SAP90
622	V I D A K G D I P G L G D D G Y G T K T L R - - - - - - - - - - - G Q E D	Chapsyn110
323	M I E S N R D F P G L S D D Y Y G A K N L K G V T S N T S D S E S S S K G Q E D	SAP102
669	Y V L S Y E Q V N Q Q E V N Y T R P V I V L G P M K D R I N D D L I S E F P D K	SAP97
571	Y V L S Y E Q V N Q Q E V N Y T R P V I V L G P M K D R I N D D L I S E F P D K	SAP90
648	C I L S Y E P V T R Q E I N Y T R P V I I L G P M K D R I N D D L I S E F P D K	Chapsyn110
363	T I L S Y E P V T R Q E I H Y A R P V I I V G P T K D R I N D D L I S E F P H K	SAP102
709	F G S C V P H T T R P K R D Y E V D G R D Y H F V T S R E Q M E K D I Q E H K F	SAP97
611	F G S C V P H T T R P K R D Y E V D G R D Y H F V T S R E Q M E K D I Q E H K F	SAP90
688	F G S C V P H T T R P K R D Y E V D G R D Y H F V I S R E Q M E K D I Q E H K F	Chapsyn110
403	F G S C V P H T T R P R R D N E V D G Q D Y H F V V S R E Q M E K D I Q D N K F	SAP102
749	I E A G Q Y N N H L Y G T S V Q S V R E V A E K G K H C I L D V S G N A I K R L	SAP97
651	I E A G Q Y N N H L Y G T S V Q S V R E V A E K G K H C I L D V S G N A I K R L	SAP90
728	I E A G Q Y N D N L Y G T S V Q S V R F V A E R G K H C I L D V S G N A I K R L	Chapsyn110
443	I E A G Q F N D N L Y G T S I Q S V R A V A E R G K H C I L D V S G N A I K R L	SAP102
789	Q I A Q L Y P I S I F I K P K T V E N I M E M N K R L T E E Q A R K T F E R A M	SAP97
691	Q I A Q L Y P I S I F I K P K T V E N I M E M N K R L T E E Q A R K T F E R A M	SAP90
768	Q V A Q L Y P I A I F I K P K S W E P L M E M N K R L T E E Q A K K T Y D R A I	Chapsyn110
483	Q Q A Q L Y P I A I F I K P K S I E A L M E M N R R Q T Y E Q A N K V F D K A M	SAP102
829	K L E Q E F T E H F T A I I Q G D T L E E I Y N Q V K Q I I E E Q S G P Y I W V	SAP97
731	K L E Q E F T E H F T A I I Q G D T L E E I Y N Q V K Q I I E E Q S G P Y I W V	SAP90
808	K L E Q E F G E Y F T A I V Q G D S L E D I Y N Q C K L V I E E Q S G P F I W I	Chapsyn110
523	K L E Q E F G E Y F T A I V Q G D S L P E F	SAP102
869	P A K E K L	SAP97
771	P A K E K L	SAP90
848	P S K E K L	Chapsyn110
548		SAP102

Abb. 11 Aminosäuresequenzen der synapsenassoziierten Proteine des Huhns. Die PDZ-Domänen sind in rot eingerahmt, die SH3-Domäne in blau und die GK-Domäne in grün. Der schwarz unterstrichene Abschnitt bei Chapsyn110 wird alternativ gespleißt.

### 3.2 Partielle Analyse des SAP90/SAP97-Gens

Da aus den cDNA-Sequenzen von SAP97 und SAP90 hervorgeht, daß beide Proteine höchstwahrscheinlich von einem Gen codiert werden, wurde die genomische DNA dieses Gens untersucht. Es wurden genomische DNA-Klone gesucht, die einerseits die Sequenz enthalten, die den SAP97-spezifischen Aminoterminus codiert und gleichzeitig die Sequenz enthalten, die den SAP90-spezifischen Aminoterminus codiert. Zu diesem Zweck wurde eine genomischen DNA-Bank des Huhns nach SAP-Sequenzen durchmustert. Als Sonden wurden 3 verschiedene cDNA-Fragmente mit einer Länge von 245-490 Basenpaaren verwendet, die im 5' Bereich der SAP97- und SAP90-cDNA lagen. Die Sonden enthielten die folgenden Abschnitte der cDNA, deren Sequenzen im Anhang aufgeführt sind. 1) Nukleotide 1-245 der SAP97-cDNA-Sequenz 2) Nukleotide 246-735 der SAP97-cDNA-Sequenz 3) Nukleotide 1-437 der SAP90-cDNA-Sequenz. Es konnten zwei positive Klone isoliert werden, die ein *Insert* von ca. 20000 Basenpaaren Länge enthielten. Die Klone konnten mit einem *Primer* sequenziert werden, der auf der cDNA von SAP97 an Base 363-380 bindet und in 3'-Richtung amplifiziert und mit einem *Primer*, der auf der cDNA von SAP97 an Base 519-535 bindet und in 5'-Richtung amplifiziert (2.1.6). Auf diese Weise konnte ein Exon der genomischen DNA vollständig sequenziert werden, wobei 5' und 3' des Exons außerdem ca. 300 Nukleotide der Intronsequenz erhalten wurde. Das Exon ist 165 Basen lang und wird in dieser Arbeit als Exon 3 bezeichnet (Abb. 12). Die Sequenz ist in der cDNA von SAP90 und von SAP97 enthalten, und entspricht dem Abschnitt, der an die spezifischen 5' Bereiche anschließen (sie beginnt 316 Nukleotide hinter dem Startcodon von SAP97 bzw. 31 Nukleotide hinter dem Startcodon von SAP90). Intronsequenzen enden vor einem Exon in der Regel mit AG und beginnen hinter einem Exon mit GT. Dies ist auch an den Exon-Intron-Übergängen von Exon 3 der Fall und bestätigt den aus der cDNA vorhergesagten Spleißpunkt. Exon 3 beginnt mit der Sequenz, die den Anfang des identischen Sequenzabschnittes in der SAP90- und SAP97-mRNA darstellt. Dies zeigt, daß die davor liegenden unterschiedlichen mRNA-Abschnitte nicht in dem selben Exon liegen wie der gemeinsame cDNA-Abschnitt. Das bestärkt die Vermutung, daß die vorderen Abschnitte der SAP90- und SAP97-mRNA alternativ gespleißte Abschnitte aus einer gemeinsamen Vorläufer-RNA sind. Dagegen ist Exon 3 ein Sequenzabschnitt, der in beiden RNAs vorkommt. Weitere Exons waren in beiden DNA-Klonen nicht enthalten.



```

1   A A T G T T T G G G A A A T A C C T G C T A T G C T G A A A C A A T G G A T T G T T T A T G C A T T G T G A C G A C SAP90 cDNA
301 C A G C C T T C C G A G C A C A A C A G T G A C A T C A G A A A C A C T G C C A A G C A G C C T T A G C C C A A G T G T SAP97 cDNA
237 T A A T C C T T T C A T G T T T T G A T A G T G G C T G A T G T T T T T T T T T T T T T A A A T G T T T T C T A T T T Exon 3

61   C A G A A A T A C C G C T A T C A G G A T G A A G A T A C A C C T C C G C A G G A G C A C A G C T C G C C G C A C A T SAP90 cDNA
361 A G A G A A T A C C G C T A T C A G G A T G A A G A T A C A C C T C C G C A G G A G C A C A G C T C G C C G C A C A T SAP97 cDNA
297 C T A G A A A T A C C G C T A T C A G G A T G A A G A T A C A C C T C C G C A G G A G C A C A G C T C G C C G C A C A T Exon 3

121 T G C C A A C G A G G T G A C G G G T C C G G A G C T G G T T C A C G T A T C G G A G A A G A A T C T G T C C C A G A T SAP90 cDNA
421 T G C C A A C G A G G T G A C G G G T C C G G A G C T G G T T C A C G T A T C G G A G A A G A A T C T G T C C C A G A T SAP97 cDNA
357 T G C C A A C G A G G T G A C G G G T C C G G A G C T G G T T C A C G T A T C G G A G A A G A A T C T G T C C C A G A T Exon 3

181 T G A G A A T G T A C A T G G A T T T G T T T C T C A T T C T C A T A T T T C G C C A G T A A A G G C A A A C C C A C C SAP90 cDNA
481 T G A G A A T G T A C A T G G A T T T G T T T C T C A T T C T C A T A T T T C G C C A G T A A A G G C A A A C C C A C C SAP97 cDNA
417 T G A G A A T G T A C A T G G A T T T G T T T C T C A T T C T C A T A T T T C G C C A G T A A A G G T A G G C A C A C T T C Exon 3

241 T C C A G T T C T G G T G A A T SAP90 cDNA
541 T C C A G T T C T G G T G A A T SAP97 cDNA
477 T T T A C A T T A T G A G T T T Exon 3

```

Abb. 12 Es ist ein Teil der Nukleotidsequenzen der SAP90- und SAP97-cDNA und ein Abschnitt aus der genomischen DNA von SAP90/97 dargestellt. Übereinstimmende Basen sind orange unterlegt. Exon 3 ist schwarz unterstrichen, davor und dahinter liegt auf der genomischen DNA Intronsequenz. Die cDNA-Sequenz von SAP97 und SAP90 sind ab Beginn dieser Exonsequenz nach 3' identisch.

Um zu untersuchen, ob die Sequenzen, die die aminoterminalen Bereiche von SAP90 und SAP97 codieren, tatsächlich im selben Gen liegen, wurde eine *long distance PCR* mit genomischer DNA durchgeführt. Dabei sollte ein DNA-Stück amplifiziert werden, das am einen Ende den Abschnitt enthält, der den spezifischen Aminoterminus von SAP97 codiert und am anderen Ende den Abschnitt der den spezifischen Aminoterminus von SAP90 codiert. Dazwischen wurde ein Intron von unbekannter Länge erwartet. Da es für die Anordnung der Exons innerhalb des Gens zwei Möglichkeiten gab (Abb. 13), wurden PCR mit vier unterschiedlichen *Primer*-Kombinationen durchgeführt. Es bestand die Möglichkeit, daß das SAP97 spezifische Exon 5' vom SAP90-Exon liegt, oder die, daß das SAP90 Exon 5' liegt und das SAP97-Exon 3' davon. Weiter 3' sollte in jedem Fall das Exon 3 liegen. Es wurden fünf verschiedene *Primer* hergestellt, die in Abb. 13 dargestellt sind. Von Exon 3 aus wurde ein nach 5' gerichteter *Primer* eingesetzt (4). Es wurden außerdem zwei *Primer* eingesetzt, die im spezifischen Bereich der SAP97-cDNA binden (Position 294-310 + 305-329) und nach 3' amplifizieren (1.1 + 1.2), sowie einer, der nach 5' amplifiziert (5). Ebenso wurden zwei *Primer* eingesetzt, die im spezifischen Bereich der SAP90-cDNA binden und nach 5' amplifizieren (2.1 + 2.2; Position 62-37 + 29-5), sowie zwei, die nach 3' amplifizieren (3.1 + 3.2). Die hintereinander liegenden *Primer* wurden in jeweils zwei nacheinander folgenden Reaktionen eingesetzt, wobei der zweite *Primer* etwas 3' des ersten *Primers* auf dem amplifizierten DNA-Strang bindet.

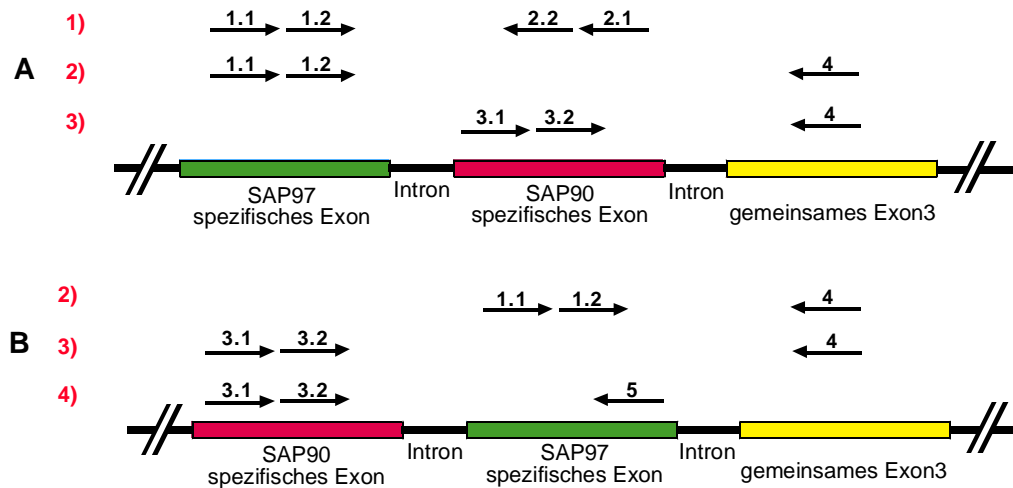


Abb. 13 In A + B sind die beiden Möglichkeiten für die relative Anordnung der Exons im SAP90/SAP97-Gen dargestellt. In grün ist ein Exon dargestellt, das einen Abschnitt des spezifischen aminoterminalen Bereichs von SAP97 codiert (Exon 1). In rot ist ein Exon dargestellt, das den spezifischen aminoterminalen Bereich von SAP90 codiert (Exon 2). In gelb ist Exon 3 dargestellt, das die Sequenz enthält, die in beiden cDNAs enthalten ist und direkt an die jeweils spezifischen Abschnitte anschließt. Die schwarzen Verbindungslinien symbolisieren die dazwischen liegenden Introns. Die roten Zahlen geben die Numerierung der vier PCR Ansätze an, in denen verschiedene *Primer*kombinationen eingesetzt wurden. Die relative Lage der *Primer* auf der DNA ist als schwarze Pfeile angegeben.

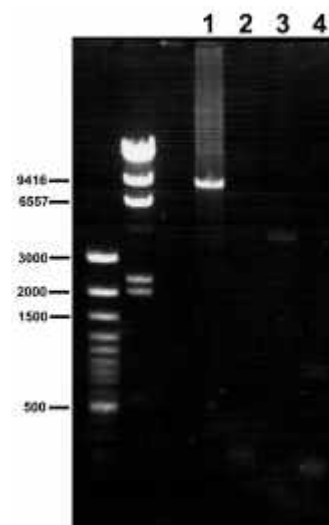


Abb. 14 Das Bild zeigt ein 1 % Agarosegel in dem vier verschiedenen PCR-Ansätze aufgetrennt wurden. In den Spuren 1-4 sind verschiedene *Primer*kombinationen eingesetzt worden, die in Abb. 13 mit den Zahlen 1-4 bezeichnet sind. In Spur 1 befindet sich das PCR-Produkt SAP97/SAP90 mit einer Größe von ca. 9000 Basen.

Die vier Reaktionsansätze wurden in einem Agarosegel aufgetrennt. Die PCR mit der unter (1) angegebenen *Primer*kombination führte zu einem Produkt, das als deutliche Bande bei einer Größe von ca. 9000 Basen sichtbar ist. Der in dieser Spur aufgetragene Reaktionsansatz enthielt *Primer* 1.2 und *Primer* 2.2. Dieses PCR-Produkt wurde nach

Extraktion aus dem Gel in den *Topo*-Vektor (Invitrogen) kloniert und von beiden Seiten sequenziert. Es zeigte sich, daß es sich dabei tatsächlich um das erwartete SAP-spezifische PCR-Produkt handelte. Das 5' Ende enthält 60 Basen des für SAP97 spezifischen Sequenzabschnitts (Nukleotide 305-364 auf der cDNA). Dieser Teil wird als Exon 1 bezeichnet wobei nicht klar ist, wo die 5' Grenze dieses Exons liegt. Daran anschließend folgt über ca. 9000 Basen Intronsequenz. Das Intron beginnt mit GT. Vom Intron wurden von jeder Seite aus ca. 300 Basenpaare sequenziert. Das 3' Ende des PCR-Produktes enthält den SAP90 spezifischen Sequenzabschnitt (Exon 2, Nukleotide 1-64 auf der cDNA). Der 5' gelegene Exon-Intron-Übergang von Exon 2 konnte nicht genau definiert werden, da der cDNA-Klon der diesen Abschnitt enthält nicht über das 5' Ende des Exons hinausgeht. Die Reaktionen 2-4 enthielten keine SAP-DNA. Das Ergebnis der PCR zeigt, daß die spezifischen Sequenzen der SAP90- und SAP97-mRNA beim Huhn auf einem DNA Strang liegen und von einem Gen transkribiert werden. Beide Genprodukte werden durch alternatives Spleißen gebildet. Dabei liegt die SAP97 spezifische Sequenz im Gen stromaufwärts der SAP90 spezifischen Sequenz. Es ergibt sich die in Abb. 15 dargestellte Genstruktur von SAP97/SAP90.

### Struktur des SAP97/SAP90-Gens

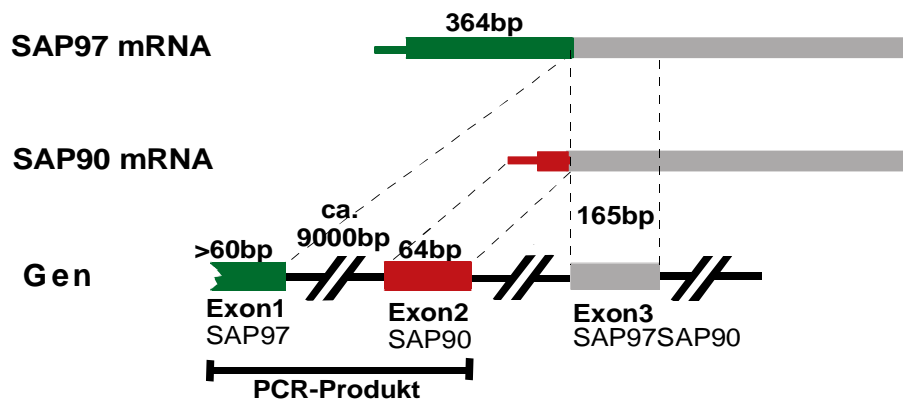


Abb. 15 Partielle Darstellung der Exonabfolge auf dem SAP90/SAP97-Gen. Im oberen Teil ist der vorderste Abschnitt der SAP97- und der SAP90-cDNA dargestellt. Die voneinander abweichenden Sequenzbereiche sind farblich dargestellt. Der grün dargestellte Bereich ist für SAP97 spezifisch. 60 Basenpaare dieser Sequenz sind in dem PCR-Produkt, das aus genomischer DNA hergestellt wurde enthalten. Dieser Teil wird als Exon 1 bezeichnet. Die Gesamtlänge von Exon 1 ist nicht bekannt. Der für die SAP90-cDNA charakteristische Bereich ist in rot dargestellt. Er ist 64 Basenpaare lang. Dieser Abschnitt der genomischen DNA wird als Exon 2 bezeichnet. In Exon 2 liegt das Startcodon der SAP90-mRNA. Im grau dargestellten Abschnitt ist die Sequenz beider cDNAs identisch. Von diesem Teil konnte das erste Exon bestimmt werden, das als Exon 3 bezeichnet wird. Es ist 165 Basenpaare lang.



**Genomische Sequenzen für SAP97/SAP90**

Die Sequenzen sind von 5' nach 3' angegeben.

**CTTCCGAGCACAAACAGTGACATCAGAAACTGCCAAGCAGCCTTAGC  
CCAAGTGTAGAG** GTATGTCATCTCTGCTTTATTTTTTAACCATTGGA  
ATGTTAGGTAACAGATGTGTTTACTTTACTGAATGTGTTTATGATTTT  
TTCATTAATGTGCCATGAAGCAGCTGTTAAGCGATGAGAAAATGGAG  
CAGGGAAGTAAATGCATGAGAGGGTGTATTTTCAATAAGCCAGGATCT  
CCATCCCTCAGTTTAAAGTAGTAATGTCACCTTGCATTTTTTTTTTGTGT  
AAGTTTCATTTGTATGTCCCAAAGAGATGAACTGTATTTTCAGGTGTG  
CCTTAAATACAGACAGTATTGCAA

.....ca. 9000 Nukleotide.....

ATAAATCCGAGTTTTTTCAGATGTAGATATTCAAATAGGTTAAAAATC  
TTTTGTGAAACTTCCAGCATTGTATTTTAGCCTGCTCTTTTTTCTT  
CACGTTATTTCTACCTCTGAACGAATCAAAGGGGAACCTGGCTCACG  
TTCTACTGTTTTGACTATTCAATAAGAGTGCTTCTCATTGAGATGAT  
CTTTAGCTGGGACTGAAAATAAG **CCTCTT AAATGTTGGGAAAATA  
CCTGCTATGCTGAAACAATGGATTGTTTATGCATTGTGACCACCAAG**

.. Intron ..

... ACAGTTAAGAGGAGCCCTTGAAAGAGTTTGGAAAGCATTGTTAC  
TGTATGCAAACAGGCAAAAAAATCTCTGAAACAACCTAGGCAGCTTCA  
TAGCATTTTTTGATGAACTAAAGTGGCAGGAACCTTTTCAGATGGATT  
TAGATGAAAATAATAACTTAAACTCATTAGATTTTATTACCTTGAGAT  
AAGCAGAGTTAGAAAACCTACCACGCATGTTTGTCTGAGTTTTGTGGA  
TAATCCTTTCATGTTTTGATAGTGGGCTGATGTTTTTTTTTTTTTAAA  
TGTTTTCTATTTCTAG **AAATACCGCTATCAGGATGAAGATACACT  
CCGAGGAGCACAGCTCGCCGACATTGCCAAGGAGGTGACGGGTCCG  
GAGCTGGTTCACGTATCGGAGAAGAATCTGTCCAGATTGAGAATGTA  
CATGGATTTGTTTCTATTCTCATATTTGCCAGTAAAG** GTAGGCA  
CTTCTTTACATTATGAGTTTGAAGTGTCCGATATTCTCTCTAGGGTT  
AAATTTTTGTGATTATCAGATACACCTGCTTATGTATATATTTCTTT  
TGATGGAACCTGCTCACTTGTAATAATTCACCTCATAGACATTAAGGAAT  
TGATTTAGTTCCACACATCGATTGAAGATGCATGGTTGTAATAATCCC  
AGATGACTTAAGGTCTCAGAGGTCTTTTCCAACCTTTATGAGTCTATA  
ATTCATAATTTACGGACCCTGGGAGTATTTATGGAATCTTTTAGACT  
AAGATG

SAP97 (Exon 1)

Der in dem PCR-Produkt enthaltene Teil des Exons ist in rot dargestellt und entspricht den Nukleotiden 305 bis 364 auf der SAP97-cDNA. Vom 3' gelegenen Intron sind 300 Nukleotide angegeben.

SAP90 (Exon 2)

Die in rot gedruckte Exonsequenz entspricht Nukleotidfolge 1 bis 64 auf der SAP90-cDNA. Das ATG ist unterstrichen. Da Introns in der Regel mit AG enden, gehören sehr wahrscheinlich auch die 6 Basen 5' des Exons (in rosa) zur Exonsequenz. Davor liegt das nächste AG. Es ist möglich, daß noch weitere Teile der Sequenz zum Exon gehören.

Exon 3

Das für SAP97 und SAP90 codierende Exon 3 ist rot dargestellt. Es entspricht den Basen 365 bis 529 auf der SAP97 cDNA-Sequenz. Von den 5' und 3' gelegenen Introns sind je 300 Basenpaare angegeben.

### 3.3 Expressionsmuster der synapsenassoziierten Proteine im Gehirn des Huhns

Durch die Untersuchung der Genexpression sollte zunächst festgestellt werden, in welchen Gehirnbereichen die verschiedenen synapsenassoziierten Proteine vorkommen. Dies sollte zeigen, ob die Funktion der SAP mit bestimmten Gehirnbereichen im Zusammenhang steht. In vorangegangenen Studien waren bereits einige Gehirnbereiche charakterisiert worden, die bei der Prägung von Hühnern relevant sind. Das Expressionsmuster sollte nun zeigen, ob SAP in diesen Bereichen vorkommen, und so möglicherweise bei Lernvorgängen eine Rolle spielen. Durch radioaktive *in situ* Hybridisierung wurde die Verteilung der SAP97-, der SAP90- und der Chapsyn110 mRNAs im Gehirn eines Tag alter Küken untersucht. Als Sonden wurden Oligonukleotide von 45 Nukleotiden Länge verwendet. Die Sequenz der SAP90- und SAP97-Sonden war aus den 5'gelegenen Abschnitten abgeleitet worden, deren Sequenz bei beiden mRNAs unterschiedlich ist (SAP90: Nukleotide 18-62, SAP97: Nukleotide 316-360 auf der cDNA-Sequenz) Für Chapsyn110 wurde ein Bereich aus der 3'UTR gewählt (Nukleotide 2770-2814). Es zeigte sich, daß die drei mRNAs sehr unterschiedliche räumliche Verteilungsmuster haben. Die Verteilung der mRNAs im Gehirn eines Tag alter Hühner ist in Abb. 16, Abb. 17 und

Abb. 18 dargestellt. Im vorderen Teil des Vorderhirns (Abb. 16) ist die mRNA von SAP90 in hohem Maße im Hyperstriatum ventrale vorhanden, und hier besonders im lateralen Bereich. Auch im Lobus parolfactorius (LPO) und im Paleostriatum augmentatum ist der SAP90-mRNA-Gehalt hoch. Eine schwächere Expression ist im Hyperstriatum accessorium, Hyperstriatum dorsale und Neostriatum festzustellen. Im Ectostriatum, Nucleus basalis und im Paleostriatum primitivum ist keine SAP90-mRNA vorhanden.

Die SAP97-mRNA ist nur in wenigen Bereichen des Vorderhirns vorhanden. Sie kommt im anterioren Teil des Vorderhirns nur im Ectostriatum vor. Gerade hier ist die mRNA von SAP90 nicht vorhanden. Das Ectostriatum ist Eingangsbereich für visuelle Signale ins Vorderhirn.

Die mRNA von Chapsyn110 ist im gesamten Vorderhirn vorhanden, wobei sie in einigen Bereichen stark und in anderen schwach exprimiert wird. Im anterioren Teil des Vorderhirns erfolgt eine starke Expression im Hyperstriatum intercalatum supremum (HIS), im medialen Teil des Neostriatum und Hyperstriatum ventrale (MNH) und sehr auffallend auch im Nucleus basalis. Das MNH und das IMHV sind Bereiche, die für

Gedächtnisbildung eine Rolle spielen. Der Nucleus basalis ist Teil des somatosensorischen Systems. Im unteren Teil des Vorderhirns (unterhalb der Lamina medullaris dorsalis) ist deutlich weniger Chapsyn110-mRNA vorhanden als im oberen Teil.

Im posterioren Teil des Vorderhirns (Abb. 17) ist der höchste Gehalt an SAP90-mRNA im Feld L und im Hyperstriatum ventrale zu finden. Dieses wird im caudalen Teil als IMHV (intermedialer und medialer Teil des Hyperstriatum ventrale) bezeichnet. Das Feld L ist das Hauptverarbeitungszentrum für akustische Signale, analog dem auditorischen Cortex bei Säugern (Heil, 1991). Es besteht aus drei Schichten (L1-L3), wobei die SAP90-mRNA nur in L1 und L3 vorkommt, nicht aber in der dazwischenliegenden Schicht L2. L2 ist die Schicht, in der der auditorische *Input* ankommt, bevor das Signal von dort in L1 und L3 weitergeleitet wird. Ein kleines rundes Areal etwas anterior zum Feld L gelegen (Abb. 17, A, SAP90) gehört wahrscheinlich auch zum auditorischen Teil des Hyperstriatum ventrale. Im caudalen Teil des Neostriatum ist außerdem der dorsal lateral gelegene Bereich (Ndc) deutlich markiert (Abb. 17, B, SAP90). Dieser spielt bei der Weiterleitung sensorischer Signale zu Prägungsrelevanten Regionen eine Rolle (Metzger, 1998).

Die mRNA von SAP97 kommt im hinteren Teil des Vorderhirns nur in Schicht 2 von Feld L und im Paleostriatum primitivum vor. Dies sind die Gehirnbereiche, in denen die SAP90-mRNA nicht vorhanden ist. Es ist außerdem der Ventrikel deutlich markiert, der nicht mit neuronalem sondern mit epitheliale Gewebe ausgekleidet ist. Darüber hinaus sind Bereiche mit Faserbündeln stark markiert, was darauf hin deutet, daß die SAP97-mRNA auch in Gliazellen vorkommt. Bei zwei auffallenden dunklen Punkten handelt es sich wahrscheinlich um die lateralen Faserbündel (Fasciculus prosencephali lateralis).

Im hinteren Teil des Vorderhirns findet besonders im IMHV und im Feld L eine starke Expression der Chapsyn110-mRNA statt. Der höchste Gehalt ist in Schicht L2 zu finden, in L1 ist die Expression von Chapsyn110 schwächer. Auffallend ist ein runder Bereich, der sich vom dorsalen Teil des Feld L2 über die Lamina hyperstriatica ins Hyperstriatum ventrale ausdehnt. Dies ist der auditorische Teil des HV. Die Expression der Chapsyn110-mRNA im Feld L entspricht genau den Gehirnbereichen, die nach Stimulation durch einen 1 kHz Ton aktiviert werden (Scheich, 1979). Zu diesem Komplex gehört wahrscheinlich auch die punktförmige Region, die in einer Schnittebene davor (Abb. 17, A, Chapsyn110) im HV zu sehen ist.

Im Mittelhirn und im Cerebellum ist fast keine SAP90-mRNA vorhanden (Abb.18). Einzig in Schicht 3 des Tectums ist ein sehr schwaches Signal zu erkennen. Die SAP97-mRNA ist im Mittelhirn in der Wand des Ventrikels zu finden, in den Schichten 2 und 7 des Tectums und im Tractus isthmo-opticus. Im Cerebellum kommt die SAP97-mRNA in der Körnerschicht vor und in hohem Maße in der tiefer liegenden Schicht, der zu- und wegführenden Fasertrakte. Die Molekularschicht ist dagegen nicht markiert.

Die mRNA von Chapsyn110 ist in mindestens 4 Schichten des Tectums (Abb.18, Schicht 3,5,7,8) und im Nucleus mesencephalicus lateralis, pars dorsalis (Mld) vorhanden. Dieser ist Durchgangsbereich für akustische Signale. Im Cerebellum wird es in der Körnerschicht exprimiert und besonders stark in den Purkinjezellen.

Die verschiedenen SAP-mRNAs sind auf ganz bestimmte Gehirnbereiche beschränkt, in denen sie unterschiedlich stark exprimiert werden. Viele der Bereiche, in denen SAP vorkommen, haben eine Bedeutung für die Verarbeitung visueller und akustischer Signale. Die SAP90- und Chapsyn110-mRNAs kommen außerdem in prägungsrelevanten Gehirnregionen vor. Die Expressionsmuster von SAP90 und SAP97 sind gegensätzlich zueinander. Das bedeutet, daß die SAP97-mRNA nur in den Gehirnbereichen vorkommt, in denen die SAP90-mRNA nicht vorkommt und umgekehrt. Es findet also regional unterschiedliches Spleißen der SAP90/SAP97 Vorläufer-RNA statt. Dabei ist die SAP90-mRNA im Vorderhirn die deutlich vorherrschende Form, im Mittelhirn und Cerebellum dagegen ist die SAP97-mRNA die überwiegend vorliegende Form.

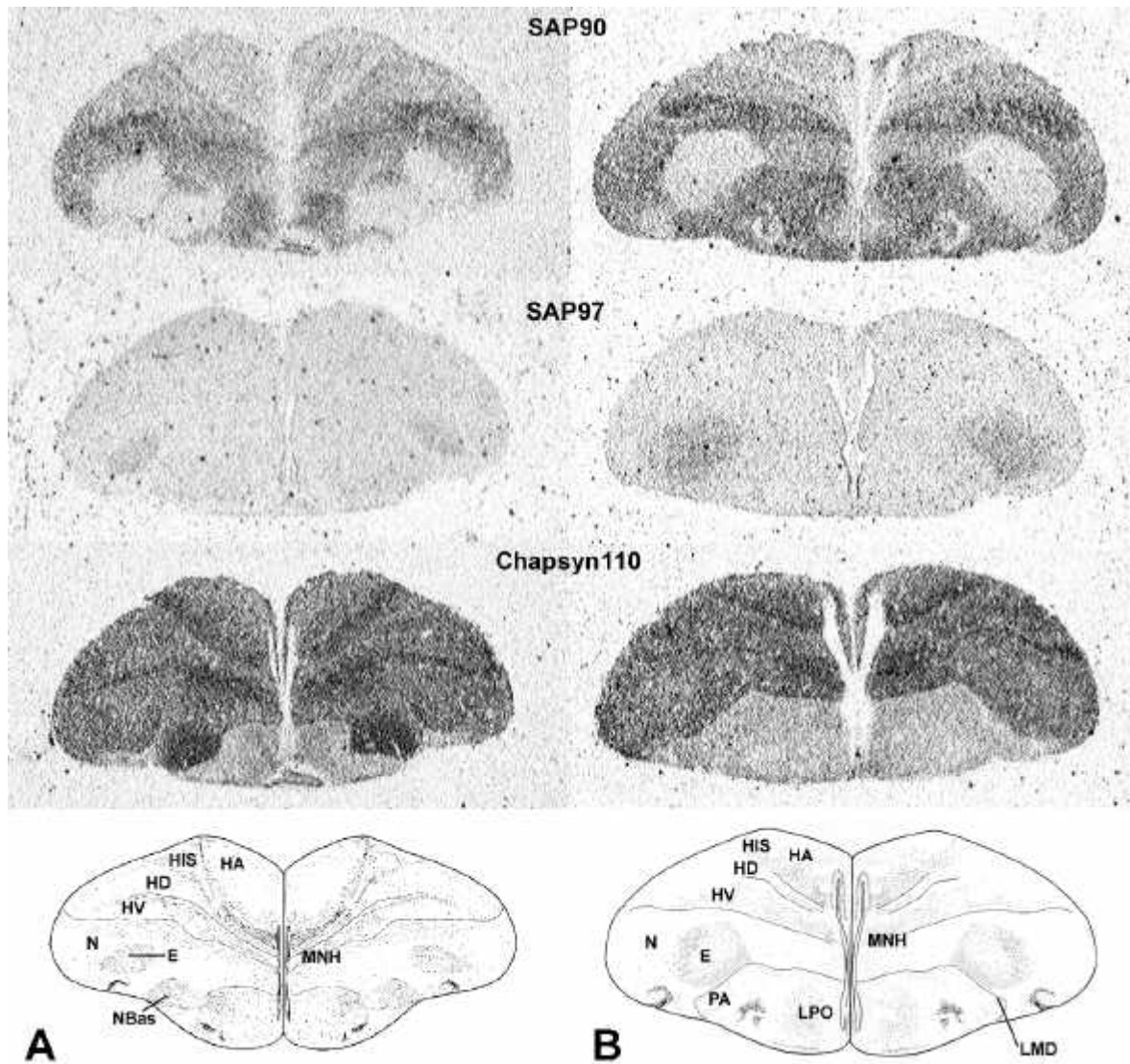


Abb. 16 Die Verteilung der SAP-mRNAs wurde durch radioaktive *in situ* Hybridisierung ermittelt. Es sind Frontalschnitte durch den anterioren Teil des Vordehorns und schematische Darstellungen der Schnittebenen gezeigt. Schnittebene A liegt vor B. Bei SAP90 ist das laterale Hyperstriatum ventrale und das LPO besonders deutlich markiert. SAP97 kommt nur im Ectostriatum vor. Chapsyn110 wird im medialen Teil des Hyperstriatum ventrale und Neostriatum und im Nucleus basalis besonders stark exprimiert. E = Ectostriatum, HA = Hyperstriatum accessorium, HIS = Hyperstriatum intercalatum supremum, HD = Hyperstriatum dorsale, HV = Hyperstriatum ventrale, LMD = Lamina medullaris dorsalis, LPO = Lobus parolfactorius, MNH = medialer Teil des Neostriatum und Hyperstriatum ventrale N = Neostriatum, Nbas = Nucleus basalis, PA = Paleostriatum augmentatum

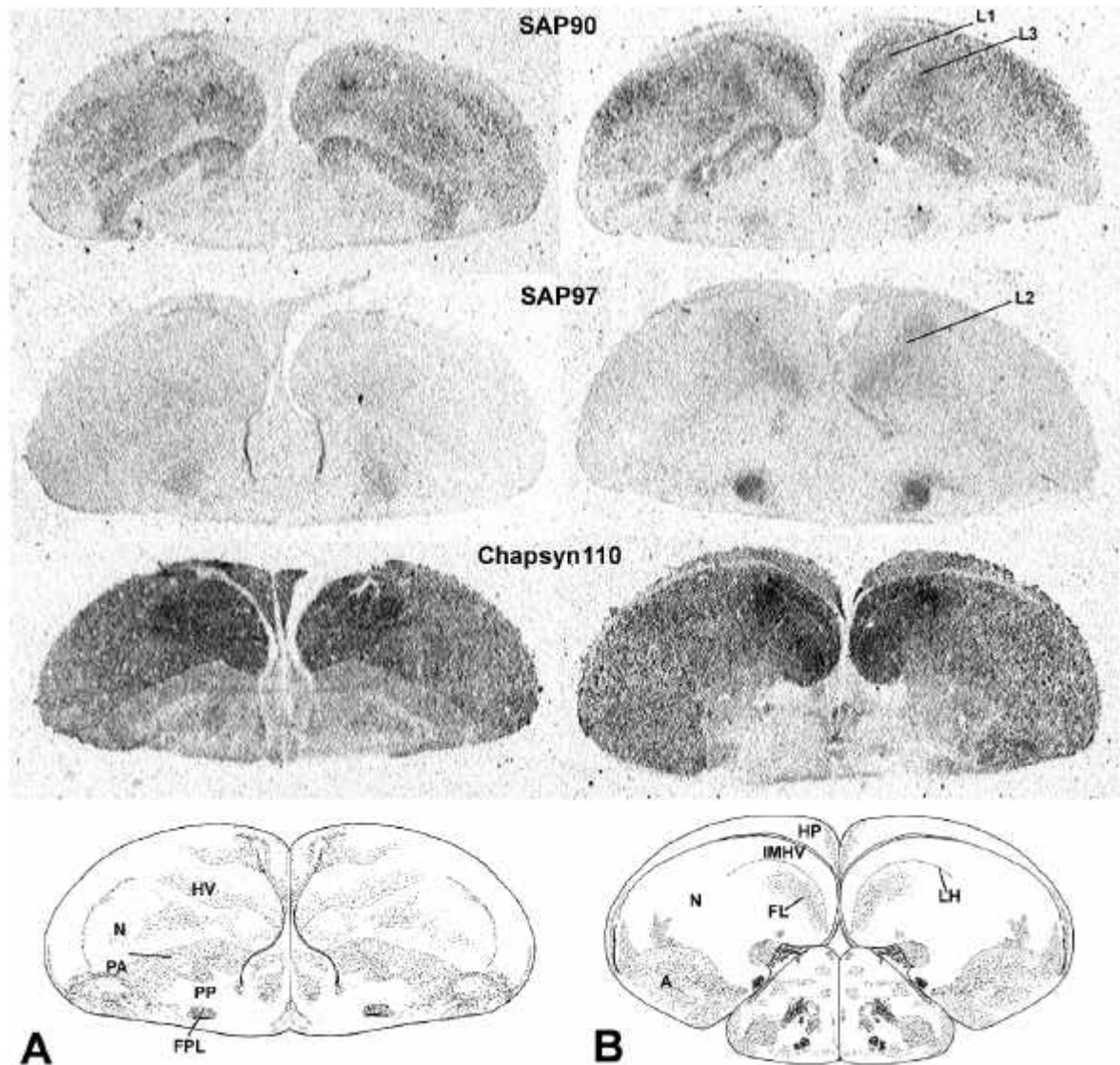
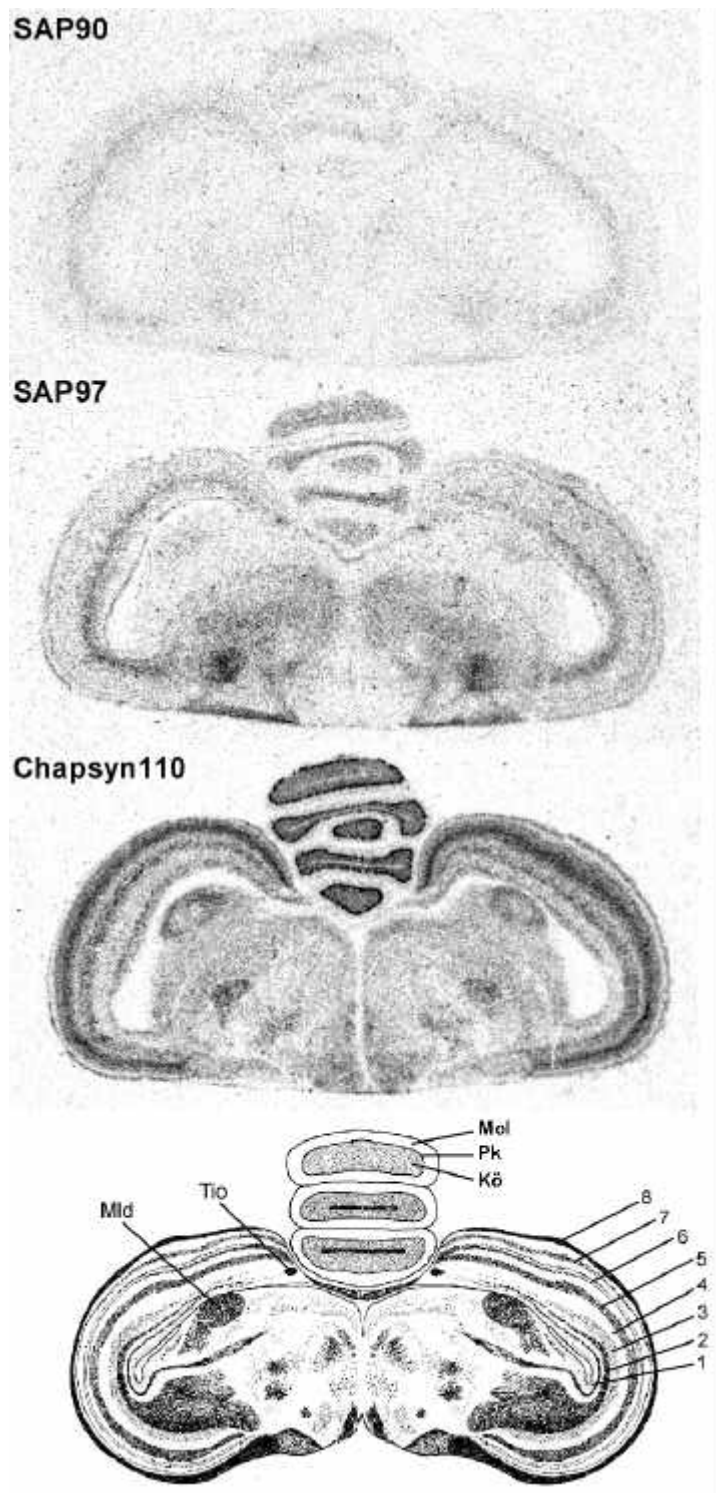


Abb. 17 Die Verteilung der SAP-mRNAs wurde durch radioaktive *in situ* Hybridisierung ermittelt. Es sind Frontalschnitte durch den posterioren Teil des Vorderhirns und schematische Darstellungen der Schnittebenen gezeigt. Schnittebene A liegt vor B. Die Expression von SAP90 ist Hyperstriatum ventrale, in Feld L1 + L3 und im dorsalen Teil des Neostriatums deutlich. SAP97 kommt dagegen in Feld L2 vor. Die Expression von Chapsyn110 ist im Hyperstriatum ventrale und in Feld L2 am stärksten. Die punktförmige Region (B, Chapsyn110) ist Teil des auditorischen HV/Feld L-Komplex von Vögeln. A = Archistriatum, FL = Feld L, FPL = Fasciculus prosencephali lateralis (laterales Faserbündel), HP = Hippocampus (nicht homolog zum Hippocampus bei Säugern), HV = Hyperstriatum ventrale, IMHV = intermedialer und medialer Teil des Hyperstriatum ventrale, LH = Lamina hyperstriatica LMD = Lamina medullaris dorsalis, N = Neostriatum, PA = Paleostriatum augmentatum

Abb. 18 Die Verteilung der SAP-mRNAs wurde durch radioaktive *in situ* Hybridisierung ermittelt. Es sind Frontalschnitte durch das Mittelhirn und Cerebellum gezeigt. Darunter ist eine schematische Darstellung der Schnittebene gezeigt. SAP90 wird fast gar nicht exprimiert. Dagegen ist die Expression von SAP97 deutlich. Die mRNA kommt in Schicht 2 + 7 des Tectums und in der Körnerschicht des Cerebellums vor. Chapsyn110 wird im Mld und in mindestens 4 Schichten des Tectum opticums exprimiert. Im Cerebellum sind die Purkinjezellen sehr stark markiert, in der darunter liegenden Schicht der Körnerzellen ist die Chapsyn110-mRNA ebenfalls vorhanden.

Mld = Nucleus mesencephalicus lateralis, pars dorsalis  
 Mol = Molekularschicht  
 Pk = Purkinjezellen  
 Kö = Körnerschicht  
 Tio = Tractus isthmo-opticus



	SAP90	SAP97	Chapsyn110
Hyperstriatum accessorium	+	-	++
Hyperstriatum intercalatum supremum	+	-	+++
Hyperstriatum dorsale	+	-	++
Hyperstriatum ventrale (anterior)	+++	-	+++
Hyperstriatum ventrale (posterior) IMHV	++	-	+++
Ectostriatum	-	+	++
Neostriatum (lateral)	++	-	++
Feld L L1	++	-	++
Feld L L2	-	+	+++
Feld L L3	++	-	++
Nucleus basalis	-	-	+++
Lobus parolfactorius (LPO)	+++	-	+
Paleostriatum augmentatum	+++	-	+
Paleostriatum primitivum	-	+	+
Nucleus mesencephalicus lateralis, pars dorsalis	-	+	++
Tectum opticum	-/+	+	++
Cerebellum (Körnerschicht)	-/+	+	++
Cerebellum (Purkinjezellen)	-	-	+++
Cerebellum (Molekularschicht)	-	-	-
Cerebellum (innere Faserschicht)	-	++	-

Tab. 1 Relative Expressionsstärke der SAP-mRNAs in unterschiedlichen Gehirnregionen einen Tag alter Küken. - keine Expression, + schwache Expression, ++ deutliche Expression, +++ starke Expression

### 3.4 Abhängigkeit der SAP-Genexpression von akustischer Prägung

Bei Lernvorgängen finden vielfältige biochemische und morphologische Veränderungen an Synapsen statt. Es ändert sich zum Beispiel die Zahl der Synapsen und die Form der postsynaptischen Dichte. Aus diesem Grunde wurde untersucht, ob die Regulation der SAP-Gene im Zusammenhang mit Lernvorgängen verändert wird. Die Expressionsstärke der SAP-Gene bei Tieren, die eine akustische Prägung erfahren haben und bei naiven Tieren, wurde verglichen. Es wurden die Gehirne von jeweils drei Tieren untersucht, die geprägt wurden und nach 30 min, 5 Stunden und 10 Stunden getötet wurden. Diese wurden mit Gehirnen von naiven Tieren verglichen, die nur diffusem Licht und leisen diffusen Hintergrundgeräuschen ausgesetzt waren. Die naiven Tiere wurden zur selben Zeit getötet. So wurden insgesamt 18 Gehirne analysiert. Die Signalintensität wurde in denjenigen Regionen untersucht, bei denen eine Relevanz für Prägungsvorgänge bereits nachgewiesen



worden war (HV, MNH, IMHV) (Bock, 1996),(Horn, 1986) und in denen die Expression einzelner SAP-Gene besonders stark ist. Die relative Expression von SAP90 wurde im lateralen und medialen Teil des Hyperstriatum ventrale, im LPO, im IMHV und in Feld L1 gemessen. Die relative Expression von SAP97 wurde im Ectostriatum und in Feld L2 gemessen. Die Signalstärke bei Chapsyn110 wurde im MNH (medialer Teil des Neostriatum und Hyperstriatum ventrale) und in Feld L2 ermittelt. Bei den Tieren, die 10 Stunden nach der Prägung getötet wurden, wurden auch alle anderen Regionen des Vorderhirns in denen Expression erfolgt (Tab1) gemessen. Für die Messung wurden die entsprechenden Bereiche auf dem Bildschirm markiert und mit Hilfe des NIH Image-Programms der Grauwert innerhalb des markierten Bereichs berechnet. Die Messung wurde in 4–9 hintereinander liegenden Schnitten durchgeführt und die Werte wurden gemittelt (2.2.5.2).

Es zeigte sich, daß der Gehalt der SAP90-mRNA bei geprägten Tieren, 5 Stunden nach der Prägung im lateralen Hyperstriatum ventrale (HV) und im IMHV erhöht ist. Der Anstieg beträgt im lateralen HV durchschnittlich 13% und ist signifikant. Im IMHV beträgt die Steigerung durchschnittlich 8%, ist aber innerhalb der drei Versuchspaare nicht signifikant. Im IMHV kann daher nur ein Trend festgestellt werden, der durch die Untersuchung weiterer Versuchspaare abgesichert werden müßte. Die Erhöhung der SAP90-Expression ist 5 Stunden nach der Prägung feststellbar. Nach 30 Minuten und nach 10 Stunden ist in den selben und in anderen Gehirnregionen keine Veränderungen der Expressionsstärke meßbar. Bei SAP97 und bei Chapsyn110 konnte in den untersuchten Gehirnbereichen keine Änderung des-mRNA-Gehaltes festgestellt werden. Die Meßwerte sind im Anhang aufgeführt.

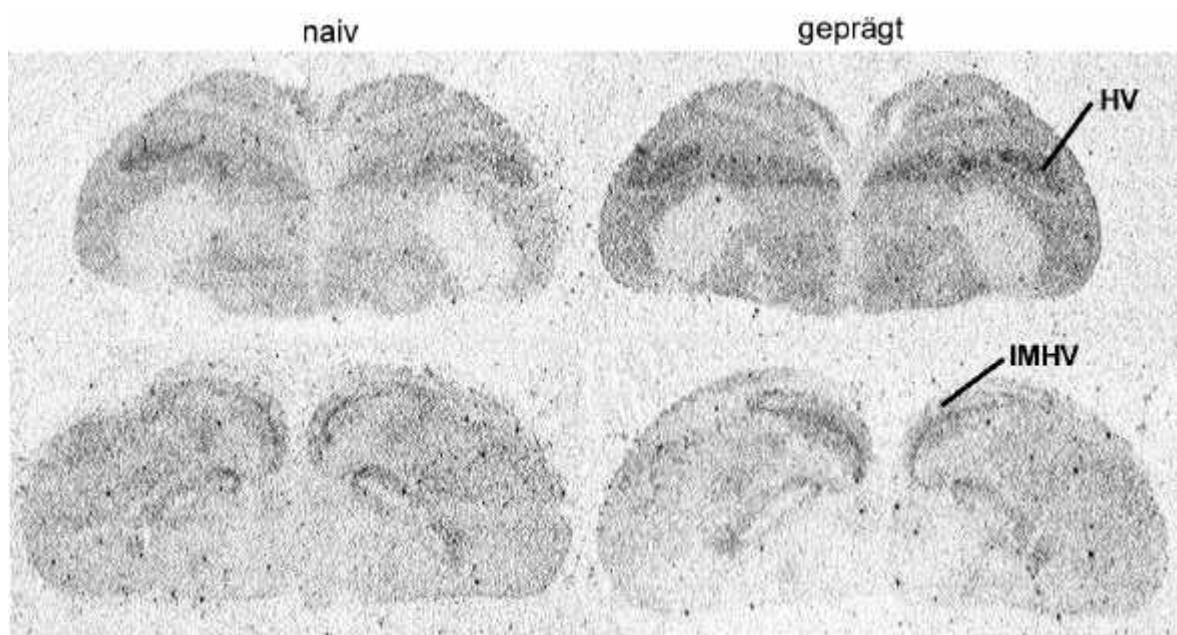


Abb. 19 *In situ* Hybridisierung an Frontalschnitten durch den anterioren (oben) und posterioren (unten) Teil des Vorderhirns vom Huhn, mit einer SAP90-Sonde. Die Expression der SAP90-mRNA ist 5 Stunden nach der Prägung im lateralen HV und im IMHV erhöht. HV = Hyperstriatum ventrale, IMHV = intermedialer und medialer Teil des Hyperstriatum ventrale

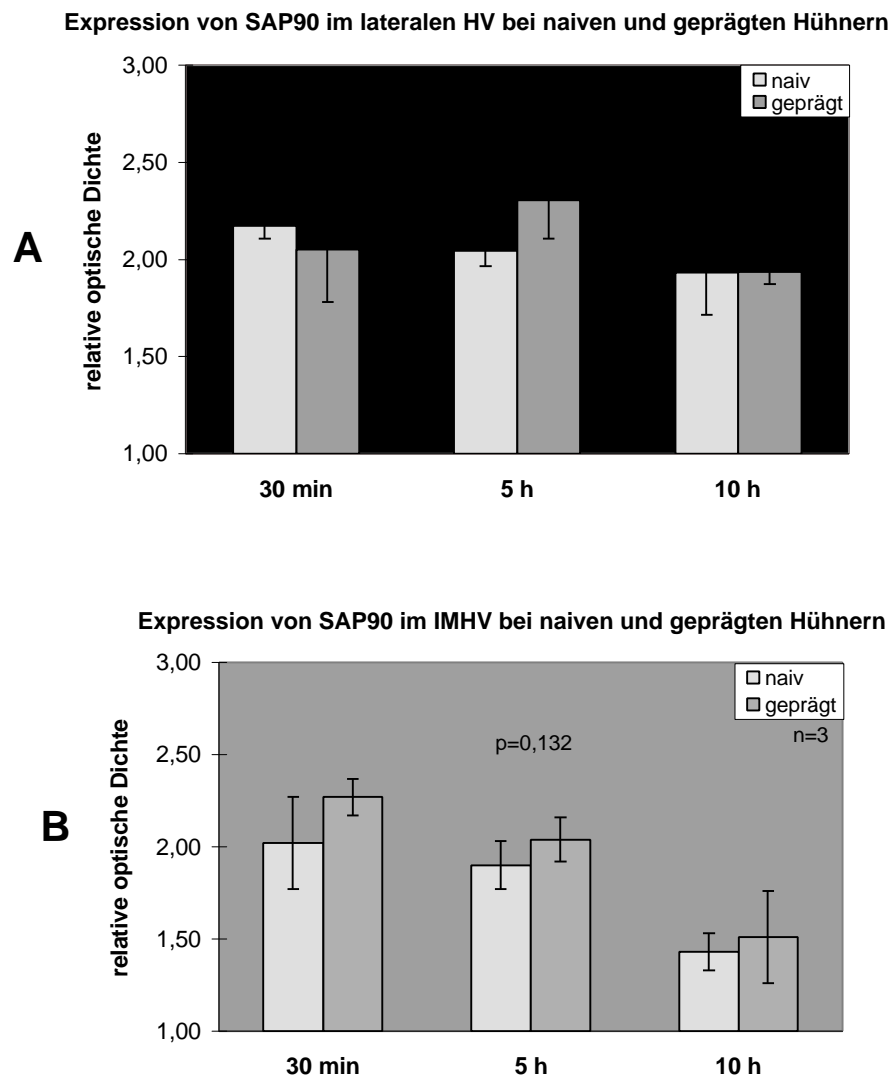


Abb. 20 Änderung der Expressionsstärke von SAP90 im lateralen Hyperstriatum ventrale (A) und im IMHV (B) zu drei verschiedenen Zeitpunkten nach Prägung. Es sind relative Werte für die optische Dichte angegeben. Bei einem Wert von 1 ist die Signalstärke im gemessenen Areal gleich dem Hintergrundwert. Fünf Stunden nach der Prägung ist bei allen drei Versuchspaaren ein Anstieg der Expression feststellbar. Der Anstieg im lateralen HV um durchschnittlich 13% ist signifikant. Der Anstieg um durchschnittlich 8% im IMHV ist nicht signifikant. ( $p > 0,05$ , Men Whitney-U-Test)

### 3.5 Western Blot mit SAP des Huhns

Um die Verteilung der SAP im Gehirn immunocytochemisch zu untersuchen, wurden in einem Western Blot verschiedene Antikörper auf ihre Fähigkeit an Proteine der Ratte und des Huhns zu binden getestet. Dazu wurden Proteinextrakte aus dem Gehirn einer adulten Ratte und eines einen Tag alten Huhns verwendet.

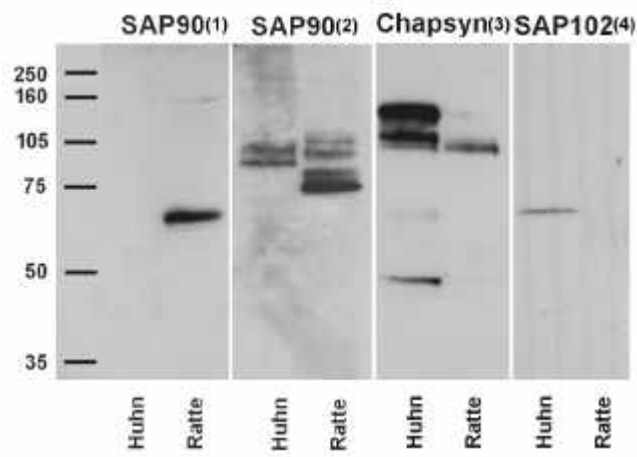


Abb. 21 Das Bild zeigt einen *Westernblot*, in dem Proteine aus dem Gehirn von Huhn und Ratte mit verschiedenen Antikörpern inkubiert wurden. 1) *Anti-human PSD95*, monoklonal von Biomol 2) *Anti-Rat SAP90* polyklonal (Kistner et al., 1993) 3) *Anti-Rat-Chapsyn110*, polyklonal von Alomone Labs 4) *Anti-Mouse-SAP102*, polyklonal von Alomone Labs

Der monoklonale Antikörper gegen SAP90 von Biomol (1) erkennt eine Bande im Ratten-Proteinextrakt, bindet aber nicht an Proteine des Huhns. Die Bande liegt weit unterhalb der erwarteten Größe von 90 kDa. Dieser Antikörper bindet laut Hersteller an die Aminosäuren 77-299 des menschlichen SAP90. Der SAP90-Antikörper von (Kistner et al., 1993) (2) markiert eine starke und drei schwächere Banden im Gehirnextrakt der Ratte. Beim Huhn zeigt er zwei Banden, die im Vergleich zur Ratte etwas verschoben sind. Die Größe der unteren Bande des Huhns korreliert gut mit dem erwarteten Molekulargewicht von 90 kDa. Die zweite Bande liegt kurz darüber. Daher handelt es sich bei der unteren Bande möglicherweise um SAP90 und bei der oberen Bande um SAP97. SAP97 ist beim Huhn um 96 Aminosäuren länger als SAP90 und ist bis auf die ersten 106 Aminosäuren mit ihm identisch. Das bedeutet, daß dieser Antikörper im Huhn wahrscheinlich an beide Proteine gleichzeitig binden kann. Dementsprechend könnte es sich bei den beiden unteren Banden im Extrakt der Ratte um zwei Spleißvarianten von SAP90 handeln, da dieses um 33 Aminosäuren kürzer ist als beim Huhn. Die beiden oberen Banden könnten demnach zwei Spleißvarianten von SAP97 enthalten. Dieses ist bei der Ratte um 162 Aminosäuren länger als SAP90 und um 33 Aminosäuren länger als SAP97 des Huhns. Eine noch genauere Zuordnung der Banden wäre durch einen Vergleich mit einem SAP97-Antikörper möglich, der aber nicht zur Verfügung stand. Der Antikörper gegen Chapsyn110 (3) markiert eine Bande der entsprechenden Größe im Proteinextrakt der Ratte und mehrere Banden beim Huhn. Er ist gegen die Aminosäuren 336-379 des Huhns

gerichtet. Dies ist der nur in Chapsyn110 vorkommende Abschnitt zwischen der 2. und 3. PDZ-Domäne. Aus diesem Grund ist es wahrscheinlicher, daß es sich bei den verschiedenen Banden um Spleißvarianten von Chapsyn110 handelt, als daß verschiedene SAP erkannt werden. Der Antikörper gegen SAP102 (4) bindet das Rattenprotein in diesem Westernblot nicht. Dafür ist eine schwache Bande im Proteinextrakt des Huhns sichtbar, die aber weit unter der erwarteten Größe von 102 kDa liegt. Eine sichere Zuordnung zu SAP102 ist daher nicht möglich. Es konnte nicht eindeutig gezeigt werden, daß die Antikörper mit nur einem SAP spezifisch interagieren. Daher wurden mit diesen Antikörpern keine immunocytochemischen Untersuchungen an Gehirnschnitten durchgeführt.

### 3.6 Expression rekombinanter SAP in Neuronen der Ratte

Beobachtungen an Gehirnschnitten der Ratte deuten darauf hin, daß SAP90 im Vorderhirn eher postsynaptisch (dendritisch) lokalisiert ist (Cho et al., 1992) und SAP97 präsynaptisch (axonal) lokalisiert ist (Müller, 1995). Daher sollte untersucht werden, ob rekombinante Proteine in kultivierten Hippocampusneuronen ebenfalls in unterschiedliche subzelluläre Regionen transportiert werden. Im Fall einer unterschiedlichen Lokalisierung von SAP90 und SAP97 sollte anschließend, durch Deletion bestimmter Teilstücke dieser Proteine, der für die Lokalisierung verantwortliche Bereich näher eingegrenzt werden. Als Expressionsvektoren wurden die Vektoren EGFP-C1 und EGFP-N3 von Clontech verwendet, in die die codierende Region der SAP97- und SAP90-cDNA der Ratte kloniert wurde. EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) ist ein Protein, daß im UV Licht grün leuchtet. Bei der Translation entstehen Fusionsproteine aus SAP und EGFP, die im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden können. Da mögliche Lokalisierungssignale am Carboxyterminus oder am Aminoternus der SAP liegen können, und durch das angehängte EGFP gestört werden könnten, wurden jeweils zwei verschiedene Vektoren verwendet. In einem lag das SAP am Carboxyterminus, also hinter dem EGFP und im anderen am Aminoternus, vor dem EGFP. Da die Eigenfluoreszenz des EGFP im Fusionsprotein sehr schwach war, wurden die Zellen nach der Fixierung mit einem Antikörper gegen EGFP markiert. Die Neurone wurden jeweils nach 12 bis 14 Tagen in Kultur fixiert. Zu diesem Zeitpunkt waren die transfizierten Zellen vollständig ausdifferenziert. Axone und Dendriten konnten morphologisch unterschieden werden.

Axone sind dünner, sehr viel länger, haben keine Dornen und fast keine Verzweigungen. Mit einem Antikörper gegen MAP2 (Mikrotubulus assoziiertes Protein 2) konnten selektiv Dendriten angefärbt werden. Mit einem Tau-Antikörper wurden nur Axone gefärbt. In allen mit SAP90 und mit SAP97 transfizierten Zellen war das Protein in der gesamten Zelle vorhanden. An der Morphologie der Zellausläufer war erkennbar, daß es sowohl in Dendriten und dendritischen Dornen, wie auch im Axon und im Zellkörper vorhanden war. In einer Doppelfärbung konnte außerdem gezeigt werden, daß Zellausläufer die nicht mit MAP2 gefärbt wurden EGFP enthielten, was bedeutet, daß es sich dabei um Axone handelte. Dies war bei Proteinen der Fall, bei denen das EGFP vor dem SAP lag und ebenso bei Proteinen mit umgekehrter Anordnung (Abb. 22). Aus diesem Grund scheint dieses System zur Analyse von Lokalisierungsdomänen in SAP nicht geeignet.



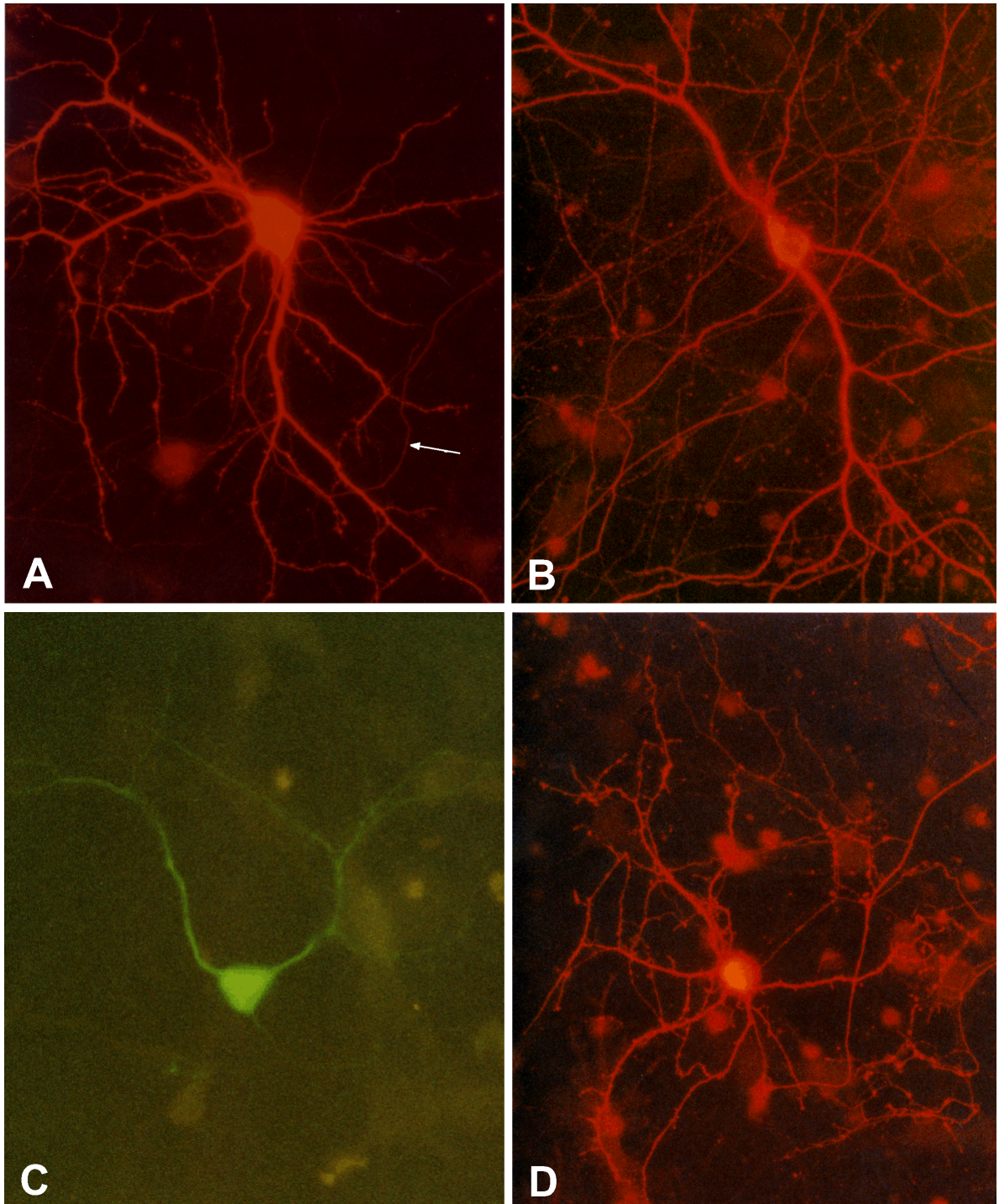


Abb. 22 Das Bild zeigt transfizierte Neurone nach 14 Tagen in Kultur, die mit einem Antikörper gegen EGFP markiert wurden. Der zweite Antikörper ist mit Cy3 (rot) bzw. mit Cy2 (grün) gekoppelt. Die Proteine sind in allen vier Zellen in Dendriten, Zellkörper und Axonen vorhanden. A) SAP90-EGFP-C1 der Pfeil markiert ein Axon. B) SAP90-EGFP-N3 C) SAP97-EGFP-C1 D) SAP97-EGFP-N3

## 4 Diskussion

Synapsenassoziierte Proteine spielen vermutlich eine zentrale Rolle beim Aufbau funktioneller Synapsen. Die Proteinfamilie umfaßt in Säugetieren vier Mitglieder. Als erstes dieser Proteine ist PSD95/SAP90 1992 aus der Ratte isoliert worden (Cho et al., 1992)). Durch intensive Forschung an SAP haben sich bis heute zahlreiche Hinweise auf mögliche Funktionen dieser Proteine ergeben. Die Proteine sind homolog zum Tumor-Suppressor-Protein *Disc-Large-1* von *Drosophila*. Hier gibt es nur ein Protein dieser Art. Der Vergleich der Proteine verschiedener Spezies gibt weitere Hinweise auf die Funktion und Entstehung der Proteine. Ziel dieser Arbeit war es eine molekulare Charakterisierung der synapsenassoziierten Proteine des Huhns (*Gallus domesticus*) vorzunehmen, um daran anschließend die mRNA-Verteilung im Gehirn und eine mögliche Beteiligung dieser Proteine bei der Prägung des Huhns zu untersuchen.

Die Analyse der Nukleotidsequenzen von cDNA und genomischer DNA zeigt, daß es beim Huhn vermutlich nur drei verschiedene Gene für synapsenassoziierte Proteine gibt, statt vier wie bei Säugern. Zwar gibt es auch beim Huhn vier den Säugerproteinen entsprechende Proteine, doch handelt es sich bei SAP97 und SAP90 um zwei verschiedene Isoformen, die durch ein gemeinsames Gen codiert werden. Die cDNA-Sequenzen von SAP97 und SAP90 sind über eine Länge von 2265 Nukleotiden zu 100 % identisch. Das entspricht 99,0 % der gesamten codierenden Sequenz von SAP90 und 87,8 % der gesamten codierenden Sequenz von SAP97. Dies zeigt, daß beide Formen aus einem Transkript stammen müssen, da bei verschiedenen Genen, auch wenn sie eng verwandt sind, immer einige Abweichungen bestehen. Durch die Analyse eines PCR-Produktes aus genomischer DNA, das sowohl den nur in der SAP90-cDNA enthaltenen Abschnitt wie auch den nur in der SAP97-cDNA enthaltenen Abschnitt enthält, konnte außerdem gezeigt werden, daß beide Sequenzabschnitte im Genom des Huhns ca. 9000 Nukleotide voneinander entfernt liegen. Dies zeigt, daß SAP90 und SAP97 beim Huhn Genprodukte eines Gens sind. Das SAP90/SAP97-Gen des Huhns scheint eine Art Vorläufer-Gen zu sein, aus dem sich später in der Evolution die beiden unabhängigen Gene für SAP90 und SAP97 der Säuger gebildet haben. Da das gemeinsame „Vorläufer-Gen“ (wie auch das einzige SAP-homologe Protein von *Drosophila* DLG1) ähnlicher zu SAP97 der Ratte ist, hat SAP90 durch die Einfügung von mehreren Abweichungen möglicherweise eine neue Funktion erhalten. Im Vergleich von SAP90 der Ratte mit SAP90 des Huhns, das ja weitgehend die gleiche Sequenz wie SAP97 hat, wird deutlich, welche Abschnitte sich im Laufe der Entwicklung am meisten



verändert haben. Sollte es Unterschiede in der Funktion zwischen SAP90 des Huhns und SAP90 der Ratte geben, so scheint es naheliegend, daß gerade die unterschiedlichen Abschnitte für die neuere Funktion beim Säuger eine Rolle spielen. Diese Ergebnisse zeigen, daß es auch in den letzten gemeinsamen Vorfahren von Vögeln und Säugern drei SAP-Gene (SAP90/SAP97, SAP102, Chapsyn110) geben muß. Interessanterweise, scheint das SAP102- und das Chapsyn110-Gen stark konserviert worden zu sein, während SAP90 und SAP97 sich relativ stark von ihren Ursprungsgenen wegentwickelt haben. Um die Entwicklung der SAP-Gene genauer beurteilen zu können, müßte man die SAP-Gene weiterer Tiere wie Fisch, Frosch und Reptilien untersuchen.

Mit Hilfe der PCR wurde die codierende Region der SAP90- und der SAP97-mRNA in fast der gesamten Länge synthetisiert. In beiden PCR-Produkten unterscheiden sich die Sequenzen in einem Abschnitt, der zwischen den Bereichen liegt, die die SH3- und die GK-Domäne codieren. Dieser ist bei der SAP97-cDNA 45 Nukleotide und bei der SAP90-cDNA 39 Nukleotide lang. Es ist nicht klar, ob dieser Unterschied typisch für die mRNAs von SAP90 und SAP97 ist. Ebenso scheint es möglich, daß die unterschiedlichen Abschnitte in alternativen Spleißvarianten beider mRNAs vorkommen können. Aus den beiden Abschnitten läßt sich eine Aminosäuresequenz von 13 bzw. 15 Aminosäuren Länge ableiten, die nicht in der SAP90-Sequenz der Ratte enthalten ist. Dafür ist der bei SAP97 gefundene Teil ganz und der bei SAP90 gefundene Teil zur Hälfte in der Sequenz von SAP97 der Ratte enthalten. Ein in anderen Proteinen bekanntes Motiv wurde in diesen Abschnitten nicht gefunden. Welche Rolle dieser unterschiedliche Sequenzabschnitt spielt bleibt unklar. Bei (Lue et al., 1994)+(Lue, 1996) werden im humanen Homologen von SAP97 (=Hdlg) zwei alternativ gespleißte Abschnitte beschrieben, die als I 2 und I 3 (Insertion 2+3) bezeichnet werden und ebenfalls zwischen der SH3- und der GK-Domäne liegen. Das dort beschriebene Insert 2 ist 12 Aminosäuren lang. Es ist mit einer Aminosäuresubstitution auch in der SAP97-Sequenz des Huhns enthalten und liegt direkt vor dem Abschnitt der bei SAP90 und SAP97 des Huhns unterschiedlich ist. Das beschriebene alternativ vorkommende Insert 3 (34 AS) scheint die membranständige Lokalisierung des Proteins in CX-1-Zellen zu vermitteln. Diese Sequenz ist nicht in der cDNA-Sequenz des Huhns enthalten. Bei (Wu, 2000) wird außerdem gezeigt, daß dieses Insert 3 wahrscheinlich einen hemmenden Einfluß auf die Bindung von GKAP an die GK-Domäne von SAP97 der Ratte hat. In dieser Untersuchung wurde Insert 3 und 12 weitere Aminosäuren deletiert, so daß auch der Teil fehlte, der in SAP97 des Huhns, aber nicht in

SAP90 des Huhns vorkommt. Die Deletion führte zu einer besseren GKAP Bindung. Daher scheint es möglich, daß der bei SAP97 des Huhns gefundene Abschnitt, auch dort zur Unterdrückung einer GKAP-Bindung beiträgt.

Ein eindeutiger Unterschied zwischen den Aminosäuresequenzen von SAP90 und SAP97 des Huhns besteht in den aminoterminalen Sequenzabschnitten. Dieser Abschnitt ist bei SAP97 106 und bei SAP90 10 Aminosäuren lang ist. Über fast den gesamten übrigen Bereich sind die beiden Proteine identisch. Dies impliziert, daß auch die Domänenstruktur und die Bindungseigenschaften gegenüber anderen Proteinen weitgehend identisch sind, und funktionelle Unterschiede zwischen beiden Proteinen auf die beiden unterschiedlichen aminoterminalen Abschnitte zurückzuführen sind. Tatsächlich haben SAP97 und SAP90 auch in der Ratte ähnliche Bindungseigenschaften. Beide Proteine können beispielsweise an Shaker-Typ-K<sup>+</sup>-Kanäle binden (Sheng, 1996). Im Gegensatz zu SAP90 und Chapsyn110 kann SAP97 aber keine *Cluster* mit diesen Kanälen an der Zelloberfläche bilden (Kim, 1996). SAP97 und SAP90 haben außerdem unterschiedliche subzelluläre Verteilungsmuster und kommen zum Teil in verschiedenen Geweben vor. SAP97 kommt als einziger Vertreter der SAP im Huhn, wie die *in situ* Hybridisierungen zeigen, und auch in der Ratte (Müller, 1995), in epithelialen Zellen vor. Bei der Ratte wurde SAP97 in Herz, Muskel, Leber, Lunge und Hoden nachgewiesen. Im Gehirn, Leber und Herz der Ratte wurde gezeigt, daß SAP97 eng an die Membran assoziiert ist (Müller, 1995). In Neuronen ist es entlang der Membran von unmyelinisierten Axonen und in Synapsen lokalisiert. In Epithelzellen kommt SAP97 an lateralen Zellkontaktstellen vor und ist mit E-Cadherin assoziiert (Reuver und Garner, 1998). Es konnte gezeigt werden, daß die ersten 65 Aminosäuren von SAP97 die Lokalisierung an die laterale Membran in kultivierten CACO-2-Zellen (*human colon carcinoma cell line*) vermitteln (Wu et al., 1998). In *Drosophila* ist das homologe Protein in *septate junctions* zu finden (Woods und Bryant, 1993). Der Verlust dieses Gens führt bei *Drosophila* zu einer Auflösung der Zellkontakte in den Imaginalscheiben und zu einem unkontrollierten Wachstum dieser. Diese Befunde deuten darauf hin, daß SAP97 eine wichtige Rolle bei der Adhäsion verschiedener Zelltypen spielt, SAP90 dagegen eine Funktion einnimmt, die auf Synapsen des ZNS beschränkt ist. Geht man davon aus, daß die beiden Proteine auch im Huhn diese unterschiedlichen Funktionen erfüllen, so muß dieser Unterschied beim Huhn in der Sequenz der aminoterminalen Abschnitte begründet sein. Daher ist es denkbar, daß die ersten 106 Aminosäuren von SAP97 für die spezifische subzelluläre Lokalisierung dieses

Proteins verantwortlich sind. Um dies zu bestätigen, wäre es sinnvoll die Verteilung des Proteins in Neuronen und in Epithelzellen des Huhns durch Immunocytochemie zu überprüfen. Ein weiterer Hinweis auf die Funktion dieser Aminoterminalen Sequenzabschnitte für die subzelluläre Lokalisierung geht aus Untersuchungen über SAP90 der Ratte hervor. Der spezifische aminoterminalen Sequenzabschnitt von SAP90 ist nur 10 Aminosäuren lang. Diese ersten 10 Aminosäuren sind bei Huhn und Ratte vollständig identisch. Bei der Ratte konnte gezeigt werden, daß die in Position 3 und 5 liegenden Cysteine palmyliert werden (Topinka und Bredt, 1998), und daß nur palmyliertes SAP90 in der postsynaptischen Membran lokalisiert werden kann. Auf Grund der gleichen Sequenz scheint es wahrscheinlich, daß SAP90 des Huhns ebenfalls palmyliert und membranständig lokalisiert werden kann. Ein chimeres Proteins, bei dem der Aminoterminus von SAP97 durch die ersten 13 Aminosäuren von SAP90 ersetzt worden war, zeigte in Zellkultur ein synaptisches Verteilungsmuster (Craven, 1999). Das normale SAP97 zeigt dagegen eine diffuse Proteinverteilung. Dadurch konnte gezeigt werden, daß der Aminoterminus von SAP90 in der Ratte die Lokalisierung des Proteins in Synapsen vermittelt. Weiterhin wurde gezeigt, daß die Cysteine in Position 3 und 5 von SAP90 für die Multimerisierung der Proteine und für die Bildung von Ionenkanal-*Clustern* essentiell sind (Hsueh et al., 1997). Auch Chapsyn110 ist zu dieser *Clusterbildung* fähig. SAP90 und Chapsyn110 können jeweils homomultimere Komplexe, wie auch gemeinsame heteromultimere Komplexe bilden. Die Proteine sind dabei über Disulfidbrücken am Aminoterminus miteinander verbunden (Hsueh et al., 1997). Der für Chapsyn110 typische aminoterminalen Sequenzabschnitt ist 14 Aminosäuren lang und enthält an Position 5 und 7 zwei Cysteine. Dieser Abschnitt ist ebenfalls zwischen Huhn und Ratte vollständig konserviert.

Im folgenden werden weitere Unterschiede zwischen SAP des Huhns und SAP der Ratte diskutiert. Die Identität von SAP97 des Huhns und SAP97 der Ratte ist mit 89,7 % relativ hoch. Innerhalb der PDZ-, SH3- und GK-Domänen sind die Sequenzen hoch konserviert. Deutlich abweichende Sequenzen treten zwischen der PDZ-Domäne 1 und 2, und zwischen der PDZ-Domäne 2 und 3 auf. Bei der Ratte ist hinter Aminosäure 161 (vor PDZ1) ein zusätzlicher Abschnitt von 33 Aminosäuren inseriert (161-194), der beim Huhn nicht vorhanden ist. Zwischen der 3. PDZ-Domäne und der SH3-Domäne, sowie zwischen der SH3- und der GK-Domäne sind beide Sequenzen sehr ähnlich, wobei die Sequenz der Ratte um 7 Aminosäuren länger ist.

Vergleicht man die Sequenz von SAP90 des Huhns (die fast vollkommen mit SAP97 des Huhns identisch ist) mit SAP90 der Ratte, so zeigen sich sehr viele einzelne Aminosäuresubstitutionen über die gesamte Länge verteilt und bestimmte Abschnitte in denen die Sequenzen stark unterschiedlich sind. Die Identität beträgt 72,6 %. Die charakteristischen ersten 10 Aminosäuren sind vollständig identisch. Der Abschnitt zwischen Aminosäure 34 und 66 (des Huhns) fehlt bei der Ratte. An dieser Stelle muß im Gen im Laufe der Entwicklung ein Teil des Exons verloren gegangen sein oder ein neues kürzeres entstanden sein, denn es konnte gezeigt werden, daß der gesamte Abschnitt von Aminosäure 11-66 beim Huhn in einem Exon codiert ist (Exon3). Bei SAP90 von Huhn und Ratte sind die Abschnitte zwischen der 1. und 2. PDZ-Domäne, zwischen der 2. und 3. PDZ-Domäne und zwischen der SH3- und der GK-Domäne sehr unterschiedlich. Zwischen der SH3- und der GK-Domäne fehlt bei der Ratte ein Abschnitt von 26 Aminosäuren im Vergleich zum Huhn.

Die Identität von Chapsyn110 bei Huhn und Ratte ist mit 95% sehr hoch. Es gibt nur wenige einzelne Aminosäuresubstitutionen. Zwischen der 2. und 3. PDZ-Domäne treten die meisten Abweichungen auf, wo ein Abschnitt von 11 Aminosäuren stark unterschiedlich ist. Chapsyn110 besitzt zwischen der 2. und 3. PDZ-Domäne einen zusätzlichen Sequenzabschnitt, der in den anderen SAP nicht vorkommt. Dieser Abschnitt kann beim Huhn in einer längeren und in einer kürzeren Form vorkommen. Bei der längeren Isoform ist dieser Teil 75 Aminosäuren lang und bei der kürzeren Form 23. An dieser Stelle ist bei der Ratte kein alternatives Spleißen bekannt. Bei Chapsyn110 der Ratte gibt es zwei Isoformen, die sich zwischen der SH3- und der GK-Domäne unterscheiden (Kim et al., 1996).

Die ermittelte Sequenz von SAP102 des Huhns, ab Mitte der 2. PDZ-Domäne bis 23 AS vor dem Stopcodon enthält nur sehr wenige Abweichungen zur Ratte. Die Identität beträgt hier 95,8 %. Da nur Teile der cDNA-Sequenz aus dem codierenden Bereich ermittelt werden konnten, liegen keine cDNA-Sequenzen aus der 3' UTR oder anderen für SAP102 einmaligen Bereichen vor. Aus diesem Grunde war es nicht möglich eine spezifische Sonde für SAP102 herzustellen, um die Verteilung der mRNA zu ermitteln.

Nach Betrachtung der Aminosäuresequenzen der SAP von Huhns und Ratte wird verständlich, warum einige Antikörper, die im *Westernblot* an Proteine der Ratte binden, nicht an Proteine des Huhns binden oder dort an mehrere Proteine binden können. Der Antikörper gegen SAP90 von Biomol (1) ist gegen die Aminosäuren 77-299 des

menschlichen SAP90 gerichtet. Dieser Bereich beginnt kurz vor der 1. PDZ-Domäne und endet kurz vor der 3. PDZ-Domäne. Die Sequenz unterscheidet sich hier deutlich von SAP90 des Huhns. Der Antikörper von Kistner gegen SAP90 (2) (Kistner et al., 1993) bindet im Huhn höchstwahrscheinlich an SAP90 und SAP97, die als zwei Banden sichtbar sind. Dies verwundert nicht, da die Sequenzen weitgehend identisch sind und der Antikörper bereits 1992, bevor SAP97 bekannt war, hergestellt wurde. Eine genau Angabe über das Epitop wird nicht gemacht. Ein selektiver Antikörper für SAP90 und SAP97 kann nur hergestellt werden, indem dieser gegen die ersten 10 Aminosäuren von SAP90 bzw. gegen die ersten 106 Aminosäuren von SAP97 gerichtet ist. Ein solcher Antikörper gegen SAP97 wird bei (Müller, 1995) verwendet. Der Antikörper gegen Chapsyn110 ist gegen die Aminosäuren 336-379 der Ratte gerichtet, die für Chapsyn110 spezifisch sind. Dieser Antikörper erkennt möglicherweise verschiedene Isoformen von Chapsyn110 im Huhn. Aufgrund fehlender Antikörper, die SAP des Huhns spezifisch binden, konnten keine immunocytochemischen Untersuchungen durchgeführt werden, die vorhersagen, wo SAP vorkommen und wie sie innerhalb der Neurone verteilt sind.

Mit Hilfe radioaktiver *in situ Hybridisierung* wurde die Verteilung der SAP-mRNAs im Gehirn untersucht. Es zeigte sich, daß die SAP90-, SAP97- und Chapsyn110-Transkripte sehr unterschiedliche Verteilungsmuster haben. Besonders auffallend ist, daß die Verteilungsmuster der SAP90- und SAP97-mRNA exakt gegensätzlich sind und sich sozusagen ergänzen. In den Bereichen, in denen die SAP90-mRNA nicht vorhanden ist, kommt die SAP97-mRNA vor. In keinem der Gehirnoreale sind beide mRNAs gleichzeitig vorhanden. Dabei ist zu bedenken, daß es sich bei dem Vorkommen der SAP90- und SAP97-mRNA nicht um unterschiedliche Genexpression handelt, da in den verschiedenen Gehirnregionen ja dieselbe Vorläufer-mRNA transkribiert wird und die Expression von einem Promotor gesteuert wird. Die Verteilung der SAP90 und SAP97-mRNA unterliegt einer posttranskriptionalen Kontrolle durch alternatives Spleißen. Anders als bei dieser gegensätzlichen Verteilung der SAP90- und SAP97-mRNA, hat die Chapsyn110-mRNA ein Verteilungsmuster, daß sich mit dem von SAP90 und SAP97 überschneidet. Es kommt also mit beiden mRNAs zusammen in denselben Gehirnregionen vor. Da Chapsyn110 mit SAP90 Heteromultimere und NMDA-Rezeptor-Cluster bilden kann (Kim et al., 1996), ist zu vermuten, daß sie innerhalb dieser Gehirnregionen in gemeinsamen Komplexen vorliegen.

Synapsenassoziierte Proteine können mit Glutamatrezeptoren des NMDA-Typs und mit  $K^+$ -Kanälen interagieren, indem sie mit der 1. und 2. PDZ-Domäne an den Carboxyterminus der Rezeptoren binden (Kornau et al., 1997). Sie können über die SH3-Domäne an Kainatrezeptoren binden (Garcia, 1998). Außerdem können sie an Neuroline und an die Signaltransduktionsmoleküle SynGAP und nNOS binden. Damit scheinen SAP eine wichtige Funktion bei der Lokalisierung und Verankerung von Transmitterrezeptoren in Neuronen zu haben und an der Bildung von Signaltransduktionskomplexen beteiligt zu sein. Durch die enge Assoziation von SAP90 mit NMDA-Rezeptoren, ist besonders ein Vergleich der Verteilungsmuster von SAP90 und NMDA-Rezeptoren interessant. Es zeigte sich, daß tatsächlich eine starke Korrelation zwischen der Verteilung der SAP90-mRNA und dem Vorkommen von NMDA-Rezeptoren im Gehirn des Huhns besteht (Henley, 1989). (Dabei ist zu beachten, daß das Protein in Nervenendigungen vorkommt und die RNA in den Zellkörpern der Neuronen, was räumliche Unterschiede ergeben kann.) Die SAP90-mRNA ist im Vorderhirn fast überall vorhanden, mit Ausnahme des Ectostriatum und des Paleostriatum primitivum. Dasselbe trifft für NMDA-Rezeptoren zu, die im Vorderhirn relativ gleichmäßig vorhanden sind, aber im Ectostriatum und Paleostriatum primitivum nicht (oder nur in minimalen Mengen) vorkommen (Henley, 1989). Im Cerebellum des Huhns werden keine NMDA-Rezeptoren gefunden. Ebenso wurde in dieser Arbeit auch keine SAP90-RNA im Cerebellum gefunden. Die NMDA-Rezeptoren wurden über die Bindung des NMDA-Rezeptor-Blockers MK-801 nachgewiesen. Daher kann man die Möglichkeit nicht ganz ausschließen, daß es andere NMDA-Rezeptorsubtypen gibt, die MK-801 nicht binden und in jenen Bereichen vorkommen. Im Gegensatz zur Verteilung der NMDA-Rezeptoren und der SAP90-mRNA ist gerade im Ectostriatum und Paleostriatum primitivum die SAP97-mRNA zu finden.

Im folgenden werden die einzelnen Gehirnbereiche näher erklärt. SAP97 kommt nur in wenigen Bereichen des Vorderhirns vor. Dies sind primäre *Input*-Schichten für visuelle und akustische Signale im Telencephalon. SAP90 kommt dagegen in den weiterverarbeitenden, d.h. umliegenden Bereichen vor. Das Ectostriatum ist einer der zwei Eingangsbereiche für visuelle Signale im Vorderhirn. Hier enden die Axone aus dem Nucleus rotundus. Von dort aus projizieren Neurone in den ectostriatalen Gürtel, der das Ectostriatum umgibt. Das Verarbeitungszentrum für akustische Signale bei Vögeln ist der Feld L-Komplex, zu dem Feld L (Neostriatum) und der akustische Teil des Hyperstriatum ventrale gehören. Das Feld L ist aus drei Schichten aufgebaut, die von dorsomedial nach

ventrolateral mit L1, L2 und L3 bezeichnet werden. Diese Schichten sind in den Autoradiogrammen deutlich zu erkennen. SAP97 kommt in der mittleren Schicht L2 vor. Dies ist die Eingangsschicht, in der akustische Signale aus dem Nucleus ovoidalis das Vorderhirn erreichen. Im nachfolgenden Schritt werden die Signale in Schicht L1 und L3 und in den darüber liegenden Teil des Hyperstriatum ventrale weitergeleitet (Bonke, 1979), in dem die SAP90-mRNA in hohem Maße vorhanden ist. Die Expression von Chapsyn110 ist im Feld L-Komplex besonders hoch. Der dritte sensorische Komplex ist das trigeminale System. In diesem gehen sensorische Signale aus dem Gesichtsfeld über den Trigemini in den Hirnstamm ein. Von dort projizieren Neurone direkt ins Telencephalon in den Nucleus basalis. Im Nucleus basalis ist eine besonders hohe Expression von Chapsyn110 zu beobachten. SAP90 und SAP97 werden hier nicht exprimiert.

Zusammenfassend zeigt die RNA-Verteilung der SAP, daß diese besonders in sensorischen Systemen des Huhns exprimiert werden. Dabei ist Chapsyn110 in allen Eingangsregionen sensorischer Signale besonders stark exprimiert (Feld L, Nucleus basalis, Hyperstriatum intercalatum) und in weiter verarbeitenden Bereichen schwächer. Die SAP97-mRNA ist im Vorderhirn nur in den Eingangsbereichen des visuellen und akustischen Systems vorhanden (Ectostriatum und Feld L 2). Die SAP90-mRNA ist überwiegend in nachgeschalteten reizverarbeitenden Regionen vorhanden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß gerade SAP90 mit der Verarbeitung äußerer Wahrnehmungen in assoziativen Denkvorgängen und der Umwandlung dieser in Verhaltensänderungen im Zusammenhang steht. Denk- bzw. Lernvorgänge erfordern ein gewisses Maß an synaptischer Plastizität, bei der vor allem NMDA-Rezeptoren eine Rolle spielen, nicht aber AMPA-Rezeptoren, die für eine schnelle synaptische Transmission sorgen (Kim, 1999). Betrachtet man die Gehirnregionen, in denen der Gehalt an SAP90-mRNA am höchsten ist, so fällt auf, daß dies tatsächlich gerade die Bereiche sind, die mit Lernvorgängen in Zusammenhang gebracht werden (Hyperstriatum ventrale, LPO, Ndc und IMHV).

Die Weiterverarbeitung der Signale aus den beschriebenen Eingangsbereichen erfolgt in den nachfolgend beschriebenen Arealen. Von den drei sensorischen Gehirnregionen werden die Signale in den dorsocaudalen Teil des Neostriatums (Ndc) weitergeleitet. Der Ndc dient als assoziatives Zentrum, von dort werden Signale in die prägnanzrelevanten Regionen MNH, IMHV und ins Archistriatum weitergeleitet. SAP90 ist im gesamten Neostriatum vorhanden, und im Ndc vermehrt. Chapsyn110 ist ebenfalls im gesamten Neostriatum vorhanden, ist aber gleichmäßig verteilt. Chapsyn110 ist im MNH deutlich

erhöht. Das MNH ist ein Bereich der eine Rolle bei akustischer Prägung spielt (Metzger, 1998). Bei SAP90 ist das MNH nicht deutlich markiert. Hier erfolgt im ventralen Teil (neostriatal) nur schwache Expression, dafür aber starke Expression im dorsalen Teil (Hyperstriatum ventrale). Im IMHV werden SAP90 und Chapsyn110 exprimiert. Im Lobus parolfactorius (LPO) und Paleostriatum augmentatum (PA) wird SAP90 stark exprimiert. Der LPO spielt ebenfalls eine Rolle bei bestimmten Lernvorgängen (Csillag A., 1997) und enthält zahlreiche Glutamaterezeptoren. Der LPO erhält seinen Hauptinput aus dem Archistriatum.

Auffallend ist, daß Chapsyn110 im gesamten ventralen Teil des Vorderhirns, also unterhalb der Lamina medullaris dorsalis, nur schwach exprimiert ist. In diesem Bereich wurde ein besonders hohes Vorkommen an Dopaminrezeptoren (D1) nachgewiesen (Schnabel, 1996). Ein Zusammenhang dazu ist allerdings nicht bekannt. Insgesamt kann man sagen, daß Chapsyn110 in nahezu allen Teilen des Gehirns vorhanden ist. Durch seinen geschichteten Aufbau ist dies besonders im Mittelhirn und Cerebellum deutlich zu sehen. Daraus läßt sich schließen, daß Chapsyn110 wahrscheinlich eine sehr grundlegende Rolle in excitatorischen Synapsen spielt. Deutlich ist im Mittelhirn der Nucleus mesencephalicus lateralis (Mld) markiert, der zum akustischen System gehört. Besonders stark sind die Purkinjezellen im Cerebellum markiert. Dies wurde auch für die Expression von Chapsyn110 bei der Ratte festgestellt (Fukaya, 1999). In den Purkinjezellen werden Kainat-Rezeptoren sehr stark und AMPA-Rezeptoren etwas weniger stark exprimiert. Die Rezeptoren wurden in der Molekularschicht gefunden. In der Molekularschicht liegen Axone der Körnerzellen, die excitatorische Signale an Dendriten der Purkinjezellen übertragen. Da Kainat- und AMPA-Rezeptoren in Dendriten vorhanden sind, werden sie wie Chapsyn110 in den Purkinjezellen exprimiert. Dies könnte bedeuten, daß Chapsyn110 an der Lokalisierung dieser Rezeptoren beteiligt ist.

Im Mittelhirn und Cerebellum sind die SAP90- und SAP97-mRNAs genau umgekehrt verteilt wie im Vorderhirn. Im Vorderhirn ist fast ausschließlich die SAP90-mRNA zu finden. Dasselbe gilt bei der Ratte (Fukaya, 1999)+(Müller, 1995). Dagegen ist die SAP97-mRNA beim Huhn im Mittelhirn und Cerebellum viel weiter verbreitet als die SAP90-mRNA. SAP97 kommt hier im Tectum opticum und in der Körnerschicht des Cerebellums vor, nicht aber in den Purkinjezellen. Auch bei der Ratte wird die SAP97-mRNA in der Körnerschicht gefunden, nicht aber in den Purkinjezellen (Müller, 1995). Das Protein ist in der Molekularschicht in hohem Maße vorhanden. Im Cerebellum liegen Zellkörper und



Zellfortsätze in unterschiedlichen Schichten, sind also räumlich voneinander getrennt. Die Verteilung der mRNA zeigt, wo die Zellkörper der Zellen liegen, in deren Fortsätzen das Protein gefunden wird. Dadurch lassen sich präsynaptische und postsynaptische Zellausläufer relativ gut unterscheiden. In der Molekularschicht (außen) liegen die Axone der Körnerzellen, ihre Zellkörper liegen in der Körnerschicht. Wenn die RNA in den Körnerzellen exprimiert wird und das Protein in der Molekularschicht vorhanden ist, so ist das ein deutliches Zeichen dafür, daß SAP97 präsynaptisch, also in Axonen vorkommt. SAP97 wird bei (Müller, 1995) im Zytoplasma von Axonen beschrieben. Es wurde in unmyelinisierten Fasern gefunden. Neuerdings wurde gezeigt, daß SAP97 mit Glutamatrezeptoren des AMPA-Typs interagiert und mit diesen in Komplexen vorliegt (Valtschanoff, 2000). Da AMPA-Rezeptoren in der postsynaptischen Membran lokalisiert sind, scheint eine postsynaptische Lokalisierung von SAP97 verständlicher. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde festgestellt, daß SAP97 in der postsynaptischen Dichte vorkommt. Es wird vorwiegend (nicht ausschließlich) postsynaptisch gefunden. Dies ist ein Widerspruch zu den früheren Befunden. Eine Erklärung für diese Diskrepanz ist möglich, wenn man annimmt, das die mRNA von SAP97, die in der Körnerschicht des Cerebellums vorkommt, dort nicht in den Körnerzellen, sondern in Golgizellen vorhanden ist. Diese Zellen liegen ebenfalls in der Körnerschicht, sind dort vereinzelter aber größer. Von diesen Zellen verzweigen sich Dendritenbäume in der Molekularschicht, wo sie excitatorischen Input von den Körnerzellen erhalten.

SAP97 kommt im Gegensatz zu SAP90 und Chapsyn110 auch in der Wand des Ventrikels, also in epithelialen Zellen vor. Damit stellt sich die Frage, was die Funktion von SAP97 in nicht-neuronalen Zellen ist. Bei (Lue, 1996) wird gezeigt, daß ein Bereich, der die 1. und 2. PDZ-Domäne einschließt, mit dem Zytoskelettprotein 4.1 interagiert. Dieses Protein kann mit seinem T/SXV-Motiv, welches auch die Bindung der Glutamatrezeptoren an PDZ-Domänen vermittelt, um die Bindung konkurrieren. Das bedeutet, daß beide an der gleichen Stelle von SAP97 binden können. Auf diese Weise könnte durch die Bindung unterschiedlicher Proteine an der gleichen Bindungsdomäne, einerseits die Zelladhäsion in Epithelzellen wie andererseits Rezeptor-*Clustering* in Neuronen vermittelt werden.

Es ist sehr deutlich, daß die SAP97-mRNA beim Huhn auch in Fasertrakten vorkommt. Stark markiert ist die tiefere Faserschicht des Cerebellums, der Fasciculus prosencephali lateralis und die Commissura tectalis. Dies sind myelinisierte Fasertrakte. Bei (Müller,

1995) wird das Protein dagegen in unmyelinisierten Fasern gefunden. Es ist wahrscheinlicher, daß die SAP97-mRNA beim Huhn in Gliazellen dieser Fasertrakte vorkommt und nicht in den Axonen, besonders weil die Markierung hier extrem stark ist. Ob SAP97 in Gliazellen vorkommt ist bislang nicht untersucht worden.

Anhand der Prägung des Huhns wurde untersucht, ob die Expression der SAP-Gene bei Lernvorgängen verändert wird. Junge Hühner erleben in natürlicher Umgebung kurz nach dem Schlüpfen eine Prägung auf ihr Muttertier. Der Ruf der Henne prägt sich bei den Küken ein. Sie können darauf hin das Tier an den mütterlichen Rufen wieder erkennen und folgen ihm überall hin. Dieses Verhalten kann nicht nur durch die natürliche Mutter, sondern auch durch bestimmte Objekte und Geräusche ausgelöst werden. Dabei lernt das Tier ein Objekt oder einen bestimmten Ton wieder zu erkennen. Dieser Prägungsvorgang eignet sich gut, um morphologische und biochemische Vorgänge im Gehirn zu untersuchen, die beim Lernen stattfinden. Nach der Prägung finden im Gehirn des Huhns eine Reihe von Veränderungen statt. Auf Grund dieser konnten verschiedene Gehirnregionen bestimmt werden, die für bestimmte Lernvorgänge eine Rolle spielen. Experimente, bei denen durch Läsionen, Elektroschock oder die Gabe von Antagonisten der Lernerfolg verhindert wurde, zeigten, daß die festgestellten Veränderungen tatsächlich auf den Lernvorgang zurückzuführen sind, und nicht Nebeneffekte der visuellen oder akustischen Stimulation sind. Für Lernen relevante Regionen sind das IMHV, der MNH bei akustischer Prägung, der Ndc, das Archistriatum und der LPO (Mc Cabe, 1991), (Bredenkötter, 1997), (Bock, 1997), (Sojka, 1995).

Es wurde gezeigt, daß nach der Prägung die Zahl der synaptischen Dornen im Ndc und im IMHV abnimmt (Bock, 1999)+(Horn et al., 1985). Im Gegensatz dazu ist bei (Patel, 1988) angegeben, daß nach einem *passive avoidance task* eine Zunahme der Anzahl synaptischer Dornen im IMHV erfolgt. Hierbei lernen die Tiere, das Aufpicken bitter schmeckender Körner zu vermeiden. Auch bei (Sojka M., 1995) wurde eine Zunahme der Dichte synaptischer Dornen im LPO nach *passive avoidance*-Training beschrieben. Diese Differenz wird bei (Rose, 2000) damit erklärt, daß nach einer anfänglichen Vermehrung, später eine Reduktion der Synapsen stattfindet. Eine andere Folge des Lernens ist die Vergrößerung der postsynaptischen Dichte. Sie wurde im IMHV nach visueller Prägung festgestellt (Horn et al., 1985). Durch Inkorporation von <sup>3</sup>H-Uracil in RNA konnte auch gezeigt werden, daß nach Prägung vermehrt RNA synthetisiert wird (Horn, 1986).

Außerdem ist die Proteinsynthese verstärkt. Die Dichte der NMDA-Rezeptoren steigt im IMHV nach visueller Prägung (Mc Cabe, 1991). In anderen Gehirnregionen ist dies nicht der Fall. Die meisten Veränderungen finden in der linken Seite des Gehirns statt (linkes IMHV + linkes LPO). Untersuchungen haben gezeigt, daß NMDA-Rezeptoren eine entscheidende Rolle bei Lernvorgängen spielen (Stewart, 1992). Ihre Blockierung durch Antagonisten verhindert den Lernerfolg (Bock, 1996). All diese Veränderungen deuten darauf hin, daß SAP eine Rolle bei Lernvorgängen spielen könnten. SAP sind wichtiger Bestandteil postsynaptischer Dichten und vermitteln die Lokalisierung und Verankerung von NMDA-Rezeptoren. Aus diesem Grunde wurde in dieser Arbeit untersucht, ob akustische Prägung einen Einfluß auf die Expression der SAP hat.

Es zeigte sich, daß der Gehalt an SAP90-mRNA im lateralen HV und im IMHV 5 Stunden nach dem Training erhöht ist. Es konnte kein Unterschied zwischen linker und rechter Hemisphäre festgestellt werden. Der Anstieg im lateralen HV ist signifikant. Im IMHV wurde eine Tendenz zur einer Erhöhung festgestellt, die aber nur durch die Untersuchung möglichst vieler weiterer Versuchspaare bestätigt werden kann. Auch im medialen Teil des HV gibt es einen Hinweis auf eine Erhöhung, der aber bisher nicht abgesichert ist. Eine Veränderung des RNA-Gehaltes von SAP97 und Chapsyn110 trat nicht auf. Dies bekräftigt die Bedeutung von SAP90 bei Lernprozessen, die schon durch Versuche an Mäusen nachgewiesen wurde (Migaud, 1999). In einer genetisch manipulierten Maus mit einem mutiertem SAP90-Gen wurden erhebliche Defizite des räumlichen Lernvermögens festgestellt. In diesem Fall wurde ein Stopcodon in die für die dritte PDZ-Domäne codierende Region eingefügt, so das die Maus nur ein verkürztes SAP90 synthetisieren konnte. Die Anordnung der NMDA-Rezeptoren war in diesen Tieren unverändert. Möglicherweise war durch die Mutation im SAP90-Gen bei diesen Tieren die Verbindung zwischen NMDA-Rezeptoren und bestimmten Signaltransduktionsmolekülen unterbrochen worden. Das HV spielt bei der Gedächtnisbildung eine besondere Rolle. Die Bedeutung des caudalen medialen Teil (IMHV) ist vielfach gezeigt worden (Horn, 1986). Da hier ein Anstieg der SAP90-mRNA festgestellt wurde, und außerdem eine Vermehrung der NMDA-Rezeptoren stattfindet, wird die Vorstellung einer funktionellen Kopplung beider Proteine unterstützt. Über die Funktion des lateralen Teiles des HV gab es bisher keine Hinweise. Der laterale Teil des HV tritt bei der Markierung mit der SAP90-Sonde als dunkler Bereich sehr deutlich hervor. Er ist optisch als ein ovales abgegrenzt wirkendes Areal (oder dunkler Fleck) zu erkennen. Dieses liegt direkt über der Lamina hyperstriatica

an der Stelle, wo diese eine ventrale Einbuchtung hat. In diesem Teil des HV ist ein signifikanter Anstieg der SAP90 mRNA um 13 % meßbar. Diese Veränderung weist darauf hin, daß auch dieser Teil eine Bedeutung für den Prägungsvorgang hat.

Die Tatsache, daß SAP90 in mehreren Bereichen des HV erhöht ist und in anderen Bereichen nicht (LPO, FeldL), zeigt daß Artefakte z.B. durch unterschiedliche Schnittdicke oder ungleichmäßige Verteilung der Sonden, auszuschließen sind. In diesem Fall müßte in allen Gehirnbereichen die gleiche Tendenz auftreten und auch bei den anderen Genen dieselben Unterschiede meßbar sein. Ein Anstieg der RNA findet aber nur bei SAP90 und nur im HV statt.

Alle Veränderungen im Gehirn sind abhängig vom Zeitpunkt nach dem Training. Sie sind nur in einem bestimmten Zeitfenster meßbar. Der Anstieg der SAP90-mRNA ist 5 Stunden nach der Prägung feststellbar. Nach 30 Minuten ist noch keine Änderung eingetreten. Nach 10 Stunden ist der Effekt nicht mehr meßbar. Zu diesem Zeitpunkt ist die Genexpression möglicherweise wieder auf ihrem Basisniveau, so daß die SAP90-RNA schon wieder abgebaut wird. Ein Anstieg der NMDA-Rezeptordichte im IMHV tritt zwischen 6 und 8,5 Stunden nach der Prägung auf (Mc Cabe, 1991). Bei diesen Versuchen wurde ein visueller Reiz unter zusätzlicher Beschallung mit dem Ruf einer Henne eingesetzt. Interessanterweise findet im IMHV und im anterioren Teil des medialen Hyperstriatum ventrale (wie auch im Ectostriatum und im posterioren medialen Neostriatum) 10 Stunden nach (visueller) Prägung, eine Reduktion der mRNA der GABA-Rezeptoruntereinheit  $\gamma 4$  statt (Harvey, 1998). GABA-Rezeptor-Agonisten können, wenn sie kurz vor oder kurz nach dem Training appliziert werden, Gedächtnisverlust hervorrufen (Rose, 2000). Betrachtet man diese Effekte zusammen so könnte dies bedeuten, daß im IMHV nach der Prägung eine Verminderung der inhibitorischen Signalübertragung mit der Verstärkung NMDA-Rezeptorabhängiger excitatorischer Signalübertragung einher geht. In zeitlicher Reihenfolge findet also zuerst die Vermehrung der SAP90-mRNA nach ca. 1-5 h statt, dann erfolgt nach 6-8,5 h ein Vermehrung der NMDA-Rezeptoren und nach ca. 5-10 h tritt eine Abnahme der GABA-Rezeptor-mRNA ein.

Zusammengenommen lassen die Befunde einige Schlußfolgerungen über die Evolution der synapsenassoziierten Proteine zu. Beim Huhn wird SAP90 im Vorderhirn viel stärker exprimiert als SAP97. Im Mittelhirn und Cerebellum ist es dagegen genau umgekehrt. Das Vorderhirn ist der phylogenetisch neuere Teil und hat sich im Laufe der Evolution am

meisten weiterentwickelt. Das Cerebellum ist das Zentrum für Haltungs- und Bewegungskoordination, der Aufbau ist hoch geordnet und hat sich im Laufe der Evolution wenig verändert. Das Vorderhirn ist Zentrum für assoziative Leistungen und Lernen. Die Entwicklung des Vorderhirns unterliegt den individuellen Erfahrungen des Individuums. Gerade hier spielt sich in großem Maße synaptische Plastizität ab. Das heißt, daß durch die persönlichen kognitiven Leistungen eine Vielzahl synaptischer Veränderungen stattfinden. Dies sind unter anderem die Bildung und Rückbildung von Synapsen, die Veränderung der Rezeptorausstattung oder der Rezeptoraktivität. SAP90 spielt bei synaptischer Plastizität eine wichtige Rolle (Migaud, 1999), (Okabe, 1999). Die Entwicklung des Vorderhirns begründet das Abstraktionsvermögen und die Lernfähigkeit, und bestimmt damit die Organisationshöhe der Tiere. Mit höherer Organisation der Organismen steigt die Anzahl der SAP-Gene: ein Gen bei der Fliege, drei Gene beim Vogel, vier Gene beim Säuger. Die Vervielfältigung von Genen erlaubt unterschiedlichen Kopien eine Spezialisierung auf verschiedene Aufgaben. Eine der ursprünglichen Aufgaben scheint die Vermittlung von Zelladhäsion zu sein. SAP kommen an Zell-Kontaktstellen vor und interagieren mit Zelladhäsionsmolekülen. Das zu SAP homologe Protein bei *Drosophila* DLG1 kommt in Imaginalscheiben vor und ist an *septate junctions* für die Zelladhäsion verantwortlich. SAP97 kommt in *tight junctions* in Muskel, Leber, Herz, Lunge, Hoden vor (Müller et al., 1996). SAP90 ist dagegen nur im Gehirn vorhanden (Kistner et al., 1993), (Cho et al., 1992). Synapsen sind eine besondere Form von Zell-Kontaktstellen, sie zeichnen sich durch eine besondere Ausstattung an Rezeptoren, Zelladhäsionsmolekülen und Signaltransduktionsmolekülen aus. So könnte das SAP90-Gen als neue neuronale Form eine evolutive Weiterentwicklung eines Gens sein, das ursprünglich noch andere Aufgaben hatte.

Ausgangspunkt für die Transfektionsexperimente mit SAP97 und SAP90 war, daß diese Proteine innerhalb von Neuronen in unterschiedlichen Kompartimenten vorkommen. So wurde bei (Müller, 1995) dargestellt, daß SAP97 in Gehirnschnitten der Ratte, im Hippocampus und im Cerebellum, an präsynaptischen Nervenenden und in Axonen vorkommt. Dagegen ist SAP90 postsynaptisch lokalisiert (Hunt et al., 1996). Es kommt in Dendriten vor und ist an synaptischen Kontaktstellen besonders hoch konzentriert. Die innerhalb dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen haben keine unterschiedliche Lokalisierung des rekombinant exprimierten SAP90 und SAP97 in kultivierten Neuronen gezeigt. Die Proteine waren bei allen transfizierten Neuronen in der gesamten Zelle zu

finden. Dies war der Fall, wenn das EGFP am Aminoterminus von SAP90 und SAP97 lag, und ebenso wenn es am Carboxyterminus der SAP lag. Bei (Valtschanoff, 2000) wurde inzwischen gezeigt, daß SAP97 eher in postsynaptischen Zellausläufern vorherrscht. Dies stellt die angenommene Voraussetzung in Frage, nach der für eine präsynaptische und eine postsynaptische Lokalisierung in beiden Proteinen unterschiedliche Lokalisierungssignale vorhanden sind. Bei (Craven, 1999) wurde gezeigt, daß rekombinantes SAP97 in kultivierten Hippocampusneuronen diffus verteilt ist, wie es auch in dieser Arbeit beobachtet wurde. Dies deutet darauf hin, daß SAP97 in Zellkultur nicht in bestimmte subzelluläre Bereiche lokalisiert wird, weshalb möglicherweise kein Lokalisierungssignal vorhanden ist. Im Gegensatz dazu hat sich inzwischen herausgestellt, daß rekombinantes SAP90 in kultivierten Hippocampusneuronen in Synapsen vorkommt und ein punktförmiges Verteilungsmuster hat (Rao et al., 1998), (Craven, 1999). Es ist dort mit AMPA- und NMDA-Rezeptoren zusammen lokalisiert, also in excitatorischen Synapsen vorhanden. Da dieses Verteilungsmuster in dieser Arbeit nicht beobachtet wurde, ergibt sich die Frage, was zu diesen verschiedenen Beobachtungen geführt hat. Ein experimenteller Unterschied bestand darin, daß die Proteine in dieser Arbeit durch Antikörperfärbung sichtbar gemacht wurden. Die Signalintensität wurde dadurch wahrscheinlich so verstärkt, daß auch geringe Mengen an SAP90 sichtbar wurden, die in Dendriten und Axonen vorhanden sind. Somit konnte möglicherweise nicht mehr quantitativ zwischen geringer Proteinkonzentration in Zellfortsätzen und einer Proteinhäufung in den Synapsen unterschieden werden, wodurch eine gleichmäßige Verteilung des Proteins in Neuronen suggeriert wurde. Es muß daher angenommen werden, daß SAP90 und SAP97 in Zellkultur tatsächlich unterschiedlich verteilt sind, nämlich SAP90 in Synapsen und SAP97 diffus. In einer während dieser Arbeit erschienenen Publikation von (Craven, 1999) wurden drei Bereiche des Proteins, als notwendig für die synaptische Lokalisierung von SAP90 angegeben. Dies sind die ersten 13 Aminosäuren sowie die Aminosäuren 13-25 vom Carboxyterminus aus und die 1.+ 2. PDZ-Domäne. Da sich in dieser Arbeit gezeigt hat, daß sich die Aminosäuresequenz von SAP90 der Ratte erheblich von SAP90 und SAP97 des Huhns unterscheidet, ist nicht ohne weiteres anzunehmen, daß dieselben Gegebenheiten auch beim Huhn zutreffen. Innerhalb der letzten 13-25 Aminosäuren vom Carboxyterminus aus unterscheiden sich die Sequenzen beispielsweise in 6 von 13 Aminosäuren. Sollte die subzelluläre Verteilung von SAP90 und SAP97 im Huhn unterschiedlich sein, so muß dieser Unterschied innerhalb der

ersten 10 Aminosäuren von SAP90 oder möglicherweise auch innerhalb der 15 Aminosäuren zwischen der SH3- und GK-Domäne festgelegt sein, da die Sequenzen im übrigen identisch sind. Eine mögliche Bedeutung der 1.+ 2. PDZ-Domäne und des hinteren Abschnittes, wie es bei der Ratte beschrieben wurde, könnte dann nur für beide Proteine zutreffend sein, z.B. für einen Transportmechanismus, ohne die Richtung für den Transport zu bestimmen. Um dies heraus zu finden, wäre es sinnvoll die Transfektion von Neuronen mit SAP90 und SAP97 des Huhns durchzuführen, und zwar am besten in kultivierten Neuronen des Huhns. Wäre dabei ein Unterschied in der Lokalisierung festzustellen, so hat das den Vorteil, daß das Lokalisierungssignal schon auf 10 (bzw. 10+15) Aminosäuren eingegrenzt werden kann, ohne aufwendige Deletionsmutationen durchführen zu müssen. Schließlich ist noch zu bedenken, daß es möglich ist, daß Proteine in Zellkultur anders lokalisiert werden als im Gewebe, da die Lebensbedingungen der Zellen in Zellkultur anders sind, als im Gewebeverband. Die Zellen wachsen ohne Differenzierungssignale von benachbarten Zellen und ohne synaptischen *Input*. Es ist gut möglich, daß die Erregung der Neuronen für die Ausbildung der Zellidentität und der korrekten Lokalisierung der Proteine eine notwendige Voraussetzung ist.

## 5 Literaturverzeichnis

- Blichenberg, A., Schwanke, B., Rehbein, M., Garner, C. C., Richter, D. und Kindler, S. (1999). Identification of a *cis*-acting dendritic targeting element in MAP2 mRNAs. *J. Neurosci.* 19(20): 8818-8829.
- Bock, J., Wolf, A., Braun, K. (1996). Influence of the N-Methyl-D-aspartate Receptor Antagonist DL-2Amino-5-phosphonovaleric Acid on Auditory Filial Imprinting in the Domestic Chick. *Neurobiology of Learning and Memory* 65: 177-188.
- Bock, J., Schnabel R., Braun K. (1997). Role of the dorso-caudal Neostriatum in filial imprinting of the domestic chick: a pharmacological and autoradiographical approach focused on the involvement of NMDA-receptors. *European Journal of Neuroscience* 9: 1262-1272.
- Bock, J., Braun, K. (1999). Filial imprinting in domestic chicks is associated with spine pruning in the associative area, dorsocaudal neostriatum. *Eur. J. Neurosci.* 11: 2566-2570.
- Bonke, B., A., Bonke, D., Scheich, H. (1979). Connectivity of the auditory forebrain nuclei in the Guinea Fowl (*Numida meleagris*). *Cell Tissue Research* 200: 101-121.
- Bredenkötter, M., Braun, K. (1997). Enhanced auditory evoked neuronal activity in the mediorostral neostriatum/hyperstriatum after auditory filial imprinting in the domestic chick. *Neuroscience* 2: 355-365.
- Bredt, D., Snyder, S. (1992). Nitric Oxide a Novel Neuronal Messenger. *Neuron* 8: 3-11.
- Cho, K.-O., Hunt, C. A. und Kennedy, M. B. (1992). The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein. *Neuron* 9: 929 - 942.
- Craven, S., El-Husseini, A., Bredt, D. (1999). Synaptic targeting of the postsynaptic density protein PSD-95 mediated by lipid and protein motifs. *Neuron* 22: 497-509.
- Csillag A., S. A., Stewart M. (1997). Synaptic terminals immunolabelled against glutamate in the lobus parolfactorius of domestic chicks (*Gallus domesticus*) in relation to afferents from the archistriatum. *Brain Res.* 750: 171-179.
- Fujita, A. und Kurachi, Y. (2000). SAP family proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269(1): 1-6.
- Fukaya, M., et al. (1999). Distinct spatiotemporal expression of mRNAs for the PSD-95/SAP90 protein family in the mouse brain. *Neurosci. Res.* 33: 111-118.
- Garcia, E., Metha, S., Blair, L., Wells, D., Shang, J., Fukushima, T., Fallon, J., Garner, C., Marshall, J. (1998). SAP90 binds and clusters Kainate Receptors causing incomplete desensitisation. *Neuron* 21: 727-739.



- Garner, C., Nash, J., Huganir, RL. (2000). PDZ domains in synapse assembly and signaling. *Trends Cell Biol.* 10: 274-280.
- Gehr D., C. B., Gräbner P. Gahr M., Leppelsack HJ. (1999). Funktional organisation of the field-L-complex of adult male zebra finches. *NeuroReport* 10: 375-380.
- Goslin, K. und Banker, G. (1991). Rat hippocampal neurons in low density culture. In: *Culturing nerve cells*, Hrsg.: G. Banker und K. Goslin (Cambridge, MA, U.S.A.: MIT Press), S. 251-281.
- Harvey, R., Mc Cabe, B., Solomon, R., Horn, G., Darlison, M. (1998). Expression of the GABA<sub>A</sub> receptor  $\gamma$ 4-subunit gene: anatomical distribution of the corresponding mRNA in the domestic chick forebrain and the effect of imprinting training. *European Journal of Neuroscience* 10: 3024-3028.
- Heil, P., Scheich, H. (1991). Functional organisation of the avian auditory cortex analogue. I Topographic representation of isointensity bandwidth. *Brain Res.* 539: 110-120.
- Henley, J. M., Moratallo, R., Hunt, S.P., Barnard, E.A. (1989). Lokalisation and quantitative autoradiography of glutamatergic ligand binding sites in chick brain. *Eur. J. Neurosci.* 1: 516-523.
- Horn (1986). Imprinting, Learning and Memory. *Behavioral Neuroscience* 100: 825-832.
- Horn, G. (1985). *Memory, Imprinting and the Brain* (Oxford: Oxford University Press).
- Horn, G., Bradley, P. und McCabe, B. J. (1985). Changes in the structure of synapses associated with learning. *J. Neurosci.* 5(12): 3161-3168.
- Hsueh, Y. P., Kim, E. und Sheng, M. (1997). Disulfide-linked head-to-head multimerization in the mechanism of ion channel clustering by PSD-95. *Neuron* 18(5): 803-814.
- Hunt, C. A., Schenker, L. J. und Kennedy, M. B. (1996). PSD-95 is associated with the postsynaptic density and not with the presynaptic membrane at forebrain synapses. *J. Neurosci.* 16(4): 1380-1388.
- Irie, M., Hata, Y., Takeuchi, M., Ichtchenko, K., Toyoda, A., Hirao, K., Takai, Y., Rosahl, T. und Südhof, T. (1997). Binding of neuroligins to PSD-95. *Science* 277: 1511-1514.
- Kennedy, M. B. (1997). The postsynaptic density at glutamatergic synapses. *Trends Neurosci.* 20(6): 264-268.
- Kennedy, M. B. (1998). Signal transduction molecules at the glutamatergic postsynaptic membrane. *Brain Res Brain Res Rev* 26(2-3): 243-257.
- Kim, E., Sheng, M. (1996). Differential K<sup>+</sup> channel clustering activity of PSD-95 and SAP97, two related membrane-associated putative guanylate kinases. *Neuropharmacology* 35: 993-1000.

- Kim, E., Cho, K.-O., Rothschild, A. und Sheng, M. (1996). Heteromultimerization and NMDA receptor-clustering activity of Chapsyn-110, a member of the PSD-95 family of proteins. *Neuron* 17: 103-113.
- Kim, J., Huganir, R. (1999). Organisation and regulation of Proteins at Synapses. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11: 248-254.
- Kistner, U., Wenzel, B. M., Veh, R. W., Cases-Langhoff, C., Garner, A., Appeltauer, U., Voss, B., Gundelfinger, E. D. und Garner, C. C. (1993). SAP90, a rat presynaptic protein related to the product of the *Drosophila* tumor suppressor gene *dlg-A*. *J. Biol. Chem.* 268: 4580-4583.
- Kornau, H. C., Seeburg, P. H. und Kennedy, M. B. (1997). Interaction of ion channels and receptors with PDZ domain proteins. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7(3): 368-373.
- Kuenzel, W. J., Masson, M. (1988). A Stereotaxic Atlas of the Brain of the Chick (*Gallus domesticus*) (Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press).
- Lue, R. A., Brandin, E., Chan, E.P., Branton, D. (1996). Two Independent Domains of hDLG are sufficient for subcellular targeting: The PDZ1-2 Conformational unit and an alternatively Spliced Domain. *The Journal of Cell Biology* 135: 1125-1137.
- Lue, R. E., Marfatia, S. M., H., C. A. und Branton, D. (1994). Cloning and characterization of hdlg: The human homologue of the *Drosophila* discs-large tumor suppressor gene binds to protein 4.1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 9818-9822.
- McCabe, B. J., Horn G. (1991). Synaptic Transmission and Recognition Memory: Time Course of Changes in N-Methyl-D-Aspartate Receptors After Imprinting. *Behavioral Neuroscience* 105: 289-294.
- McCabe, H., G. (1988). Learning and memory: Regional changes in N-methyl-D-aspartate receptors in the chick brain after imprinting. *Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2849-2853.
- Metzger, M., Jiang, S., Braun, K. (1998). Organisation of the dorsocaudal neostriatal complex: A retrograde and anterograde tracing study in the domestic chick with emphasis on pathways relevant to imprinting. *The Journal of comparative Neurobiology* 395: 380-404.
- Migaud, M. e. a. (1999). Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature* 396: 433-439.
- Morris, R., Anderson, E, Lynch, GS, Baudry, M (1986). Selektive impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319: 774-776.
- Müller, B., et all (1995). Molecular Charakterization and spatial distribution of SAP97, a novel presynaptic protein homologous to SAP90 and the *Drosophila* Discs-Large tumor suppressor protein. *The Journal of Neuroscience* 15: 2354-2366.

- Müller, B. M., Kistner, U., Kindler, S., Chung, W. J., Kuhlendahl, S., Fenster, S. D., Lau, L.-F., Veh, R. W., Haganir, R. L., Gundelfinger, E. D. und Garner, C. C. (1996). SAP102, a novel postsynaptic protein that interacts with NMDA receptor complexes in vivo. *Neuron*.
- Naisbitt, S., Kim, E., Weinberg, R. J., Rao, A., Yang, F. C., Craig, A. M. und Sheng, M. (1997). Characterization of guanylate kinase-associated protein, a postsynaptic density protein at excitatory synapses that interacts directly with postsynaptic density-95/synapse-associated protein 90. *J. Neurosci.* 17(15): 5687-5696.
- Niethammer, M., Kim, E. und Sheng, M. (1996). Interaction between the C terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases. *J. Neurosci.* 16(7): 2157-2163.
- Niethammer, M., Valtschanoff, J. G., Kapoor, T. M., Allison, D. W., Weinberg, T. M., Craig, A. M. und Sheng, M. (1998). CRIPT, a novel postsynaptic protein that binds to the third PDZ domain of PSD-95/SAP90. *Neuron* 20(4): 693-707.
- Okabe, S., Kim, H., Miwa, A., Kuriu, T., Okado, H. (1999). Continual remodeling of postsynaptic density and its regulation by synaptic activity. *Nature Neuroscience* 2(9): 804-811.
- Patel, S., Rose, S., Stewart, M. (1988). Training induced dendritic spine density changes are specifically related to memory formation processes in the chick, *Gallus domesticus*. *Brain Res.* 463: 168-173.
- Rao, A., Kim, E., Sheng, M. und Craig, A. M. (1998). Heterogeneity in the molecular composition of excitatory postsynaptic sites during development of hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* 18(4): 1217-1229.
- Reuver, S. M. und Garner, C. C. (1998). E-cadherin mediated cell adhesion recruits SAP97 into the cortical cytoskeleton. *J. Cell Sci.* 111(Pt 8): 1071-1080.
- Rose, S. P. R. (2000). God's Organism? The chick as a model system for memory studies. *Learning and Memory* 7: 1-17.
- Sakimura, K., Kutsuwada, Ito, Manabe, Takayama, Kushiya, Yagi, Aizawa, Sugiyama, Mishina (1995). Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor GluR1 subunit. *Nature* 373: 151-155.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Auflage (Cold Spring Harbor, NY, U.S.A.: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Scheich, H., Bonke, B.A., Bonke, D., Langner, G. (1979). Functional Organization of some auditory nuclei in the Guinea Fowl Demonstrated by the 2-Deoxyglucose Technique. *Cell Tissue Research* 204: 17-29.
- Schnabel, R., Braun, K. (1996). Development of dopamin receptors in the forebrain of domestic chick in relation to auditory imprinting. An autoradiographic study. *Brain Research* 720:120-130

- Sheng, M. (1996). PDZs and receptor/channel clustering: rounding up the latest suspects. *Neuron* 17: 575-578.
- Shepherd, G. M. (1994). *Neurobiology*: Oxford University Press
- Sojka, M., Davies, H.A., Harrison, E., Stewart, M.G. (1995). Long-term increases in synaptic density in chick CNS after passive avoidance training are blocked by an inhibitor of protein synthesis. *Brain Res.* 684: 209-214.
- Steele, R., Stewart, M., Rose, S. (1995). Increases in NMDA receptor binding are specifically related to memory formation for a passive avoidance task in the chick: a quantitative autoradiographic study. *Brain Res.* 674: 352-356.
- Stewart, M. G., Bourne, R.C., Steele, R.J. (1992). Quantitative autoradiographic demonstration of changes in Binding to NMDA-sensitive [3H] Glutamate and [3H]MK801, but not [3H]AMPA receptors in chick forebrain 30 min. after passive avoidance training. *Eur. J. Neurosci.* 4: 936-943.
- Takeuchi, M., et.al. (1997). SAPAPs. *J. Biol. Chem.* 272(May 2): 11943-11951.
- Topinka, J. R. und Brecht, D. (1998). N-terminal palmitoylation of PSD-95 regulates association with cell membranes and interaction with K<sup>+</sup> channel Kv1.4. *Neuron* 20: 125-134.
- Valtschanoff, J., Burette, A., Davare, M., Leonard, S., Hell, W., Weinberg, R. (2000). SAP97 concentrates at the postsynaptic density in cerebral cortex. *Eur. J. Neurosci.* 12: 3605-3614.
- Woods, D. F. und Bryant, P. J. (1993). ZO-1, DlgA and PSD-95/SAP90 - Homologous Proteins in Tight, Septate and Synaptic Cell Junctions. *Mech. Dev.* 44: 85-89.
- Wu, H., et al. (2000). Intramolecular interactions regulate SAP97 binding to GKAP. *The EMBO Journal* 19: 5740-5751.
- Wu, H., Reuver, S. M., Kuhlendahl, S., Chung, W. J. und Garner, C. C. (1998). Subcellular targeting and cytoskeletal attachment of SAP97 to the epithelial lateral membrane. *J. Cell Sci.* 111(Pt 16): 2365-2376.
- Zamanillo, D., et. al. (1999). Importance of AMPA-Receptors for hippocampal synaptic plasticity but not for spatial learning. *Science* 284: 1805-1810.

## 6. Anhang

### Nukleotid- und Aminosäuresequenz von SAP90 des Huhns

1	AAATGTTTGGGAAAATACCTGCTATGCTGAAACAATGGATTGTTTATGCATTGTGACGAC	60
1	M D C L C I V T T	9
61	CAAGAAATACCGCTATCAGGATGAAGATACACCTCCGAGGAGCAGCTCGCCGCACAT	120
10	K K Y R Y Q D E D T P P Q E H S S P H I	29
121	TGCCAACGAGGTGACGGGTCCGGAGCTGGTTACAGTATCGGAGAAGAATCTGTCCACAGAT	180
30	A N E V T G P E L V H V S E K N L S Q I	49
181	TGAGAATGTACATGGATTGTTTCTCATTCTCATATTTCCGAGTAAAGGCAAAACCCACC	240
50	E N V H G F V S H S H I S P V K A N P P	69
241	TCCAGTTCTGGTGAATACAGATTCTTTGGACACTCCAACATACCTCAATGGCACAGATGC	300
70	P V L V N T D S L D T P T Y V N G T D A	89
301	AGATTACGAGTATGAAGAAATTAATCTTTGAAAGGGGAAATTCAGGACTTGGCTTTAGCAT	360
90	D Y E Y E E I T L E R G N S G L G F S I	109
361	TGCAGGTGGCAGACAAACCCACATATTGGGGATGATTCAAGTATTTTCATTACCAAAAT	420
110	A G G T D N P H I G D D S S I F I T K I	129
421	TATAGCTGGAGTGCAGTGCACAGGATGGAAGATTACGGGTTAATGATTGTATTCTACG	480
130	I A G G A A A Q D G R L R V N D C I L R	149
481	AGTAAATGAGGTTGATGTTCCGTGATGTGACACACAGCAAAGCAGTTGAAGCATTAAGA	540
150	V N E V D V R D V T H S K A V E A L K E	169
541	AGCGGGATCAATTTGACGATTGTATGTCAAAAAGAAGAAAACCAAGTGACGGAATAATAGT	600
170	A G S I V R L Y V K R R K P V T E K I V	189
601	GGAAATAAAACTGTAAAAGGCCCAAGGCTTGGTTTCAGTATTGCTGGTGGTGTAGG	660
190	E I K L V K G P K G L G F S I A G G V G	209
661	AAATCAGCATATACTGGAGACAACAGCATCTATGTAACCAAAATCATTGAAGAGGGGC	720
210	N Q H I P G D N S I Y V T K I I E G G A	229
721	AGCCCAAAAAGATGGAAAACCTCAAAATGGTGACAAAACCTTTAGCTGTGAATAGTGTG	780
230	A H K D G K L Q I G D K L L A V N S V C	249
781	CTTAGAAGAAGTTACTCATGAAGAAGCAGTACTGCCTTAAAAACACTTCTGACTTTGT	840
250	L E E V T H E E A V T A L K N T S D F V	269
841	TTATCTGAAAGTTGAAAACCCACCAGCATGTTTCATGAATGATAGTTACGCCCTCTGAC	900
270	Y L K V A K P T S M F M N D S Y A L L T	289
901	ATCACAACTCTTATTCTCCAACAGTGGACAACCCATATCACTCCATCTGCTACTTAGG	960
290	S Q T L I L Q P V D N P Y H S I C Y L G	309
961	ACAGTCCCTTCCCCAGCATCTCCAGGGCGATATTCACCAATTCCAAAGGGAATGCTTGG	1020
310	Q S L P P A S P G R Y S P I P K G M L G	329
1021	AGATGATGAGATTACCAGGAGCCTAGAAAAGTTGCTCGCATCGAGGATCAACGGGCTCT	1080
330	D D E I T R E P R K V V L H R G S T G L	349
1081	TGGTTTCAACATTGTTGGAGGAGAAGATGGAGAAGGAATTTTCATCTCCTTCATCCTTGC	1140
350	G F N I V G G E D G E G I F I S F I L A	369
1141	AGGAGGACCAGCTGACCTCAGTGGAGAACCTTAGGAAAAGGCGATCGTATAATTTCTGTAAA	1200
370	G G P A D L S G E L R K G D R I I S V N	389
1201	TGGAGTTGACCTGAAGGACCAACCCATGAACAAGCAGCAACAGCTTTGAAGAATGCAGG	1260
390	G V D L K A A T H E Q A A T A L K N A G	409
1261	CCAAGCAGTAACTATTGTGGCTCAGTACCGTCCAGAAGAATACAGTCGTTTTGAAGTAA	1320
410	Q A V T I V A Q Y R P E E Y S R F E A K	429
1321	AATACATGATTTACGGGAGCAGATGATGAACAGTAGCATTAGCTCAGGATCAGGATCTTT	1380
430	I H D L R E Q M M N S S I S S G S G S L	449

1381	GCGAACCGCCAGAAGAGATCCCTATATGTGACAGCCCTTTTGTATTATGACAAGACTAA	1440
450	R T S Q K R S L Y V R A L F D Y D K T K	469
1441	AGACAGTGGCCTTCCAAGTCAAGGACTGAACTTCAAATTTGGTGATATTCTCCATGTCAT	1500
470	D S G L P S Q G L N F K F G D I L H V I	489
1501	TAATGCTTCTGATGATGAATGGTGGCAAGCAGGTAACCTCCAGATGGAGAAAGTGA	1560
490	N A S D D E W W Q A R Q V T P D G E S D	509
1561	TGAAATTTGGAGTTATCCCAAGCAAACGACAGATTGAGAAAAAAGAAGAGCCGTTTAAA	1620
510	E I G V I P S K R R V E K K E R A R L K	529
1621	GACAGTGAATTCATTCGAAGACAAGAGGAGAGAAAAGGGAGTCCCTGACGACATGGG	1680
530	T V K F N S K T R G E K G E V P D D M G	549
1681	ATCAAAGGCCTGATTATCTTGATTACAGATGAGTACGGTTGTTCAAAGGTGGCCAAGA	1740
550	S K G L I I L I T D E Y G C S K G G Q E	569
1741	GGAATATGCTTGTCTTACGAACAAGTCAATCAACAAGAAGTGAATATACTCGACTGT	1800
570	E Y V L S Y E Q V N Q Q E V N Y T R P V	589
1801	GATTTGTTTGGGACCCATGAAAGACAGAATTAACGACGATCTGATTTCAGAATTTCCAGA	1860
590	I V L G P M K D R I N D D L I S E F P D	609
1861	CAAATTTGGCTCATGTGTCCACATACTACTAGACAAAACGAGATTATGAGTGGATGG	1920
610	K F G S C V P H T T R P K R D Y E V D G	629
1921	ACGTGATTACCAATTTGTCACTTCTCGAGAGCAAATGGAGAAGGATATTCAGGAGCACAA	1980
630	R D Y H F V T S R E Q M E K D I Q E H K	649
1981	ATTCATTGAAGCTGGCCAGTACAATAATCATCTTTATGGAACAAGTGTGAATCAGTGGC	2040
650	F I E A G Q Y N N H L Y G T S V Q S V R	669
2041	AGAAGTAGCAGAAAAGGTTAAACATTGTATTCTTGATGTTTCTGGTAATGGCATCAAAAG	2100
670	E V A E K G K H C I L D V S G N A I K R	689
2101	GTTGCAGATTGCCAGCTGTACCCAATCTCCATTTTTATTAACCAAAAACAGTGGAAAA	2160
690	L Q I A Q L Y P I S I F I K P K T V E N	709
2161	TATCATGGAATGAATAAACCGCTTAAACGGAAGAACAAGCCAGGAAGACATTTGAAAGAGC	2220
710	I M E M N K R L T E E Q A R K T F E R A	729
2221	AATGAAACTGGAGCAAGAGTTTACTGAACACTTCACAGCTATTATCCAAGGAGACACACT	2280
730	M K L E Q E F T E H F T A I I Q G D T L	749
2281	GGAAGAAATCTACAACCAAGTGAACAGATCATAGAGGAACAATCTGGGCCTTACATCTG	2340
750	E E I Y N Q V K Q I I E E Q S G P Y I W	769
2341	GGTTCAGCAAAGGAAAAATATGAAAAACGGATTTTTGCTTTTCATTTCTATCTGACGT	2400
770	V P A K E K L *	777

### 3' UTR von SAP90 bzw. SAP97

2401	CACCTACTACATCTGACAACCTTTAAGCCCTTCCAGTGGAGCCTGCCTCTAGTTCCTCCC	2460
2461	AGCGTGGTTTACACCCTAACCATCACATTTCTGCAGTCCCATAACGCTTTAAAATTTGATG	2520
2521	TCTCTCTTAGTTTAAATAATTTGATTTATGCGTGTGTTGGTTTGGCATTTTTCAAACA	2580
2581	TGACAGTGAATGGCCTGACCAGCTATTACTTCGGGGTGGGGTGGGAGGGGATTCCTTG	2640
2641	GTAAAATTCCTTAATGTTTAAAGGAAAGTAACTTTCAAAGATTTTTCAAAGAAAGCTTTAT	2700
2701	AGACATCTTTTAAAGTTTCATAACAATGAAAGAAAAGTTGTTTTCCAGGAAGCTGTAA	2760
2761	ATCAGCAGTAACTTTGCACGCTTAACTTTAATAGCATGTTTGGTCAGGGCAATCAATTT	2820
2821	CAGGTTTTATTTTnTGAGTTAAATTTCTATTCTCACAGATTTATTTTTTTTTCTTTCCA	2880
2881	GGCAGTTAAAGAGAAAACCTTCAGATTTTGAGTTAACGTTTTTCATTAACCTCCATCTCC	2940
2941	TTCTCAAGGAAATTCATTTTTCATAATTTTCATATGGATATTTTATAATCTATTTTTTCA	3000
3001	TTTTTTTGGCAATAAAAATTTGCTAGGGATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	3049

## Nukleotid- und Aminosäuresequenz von SAP97 des Huhns

1 CCGCCCCGCGCGGGTCGGGCTCAAAGTTTGCAGGGCGGAGCCGCCATGCCCGTCAGGAA 60  
 1 M P V R K 5  
 61 GCAAGATACCCAGCGCGCCCTCGCCCTCCTGCAGGAGTACCGCTCCAAGCTGAGCCAGGC 120  
 6 Q D T Q R A L R L L Q E Y R S K L S Q A 25  
 121 GGAGGACCGGCAGCTCGGAACTCCATCGAGCGGGTCATCGGCATCTTCCAGAGCAACCT 180  
 26 E D R Q L R N S I E R V I G I F Q S N L 45  
 181 TTTCAGGCGCTGATCGATATTCAAGAATTTTATGAAGTGACCTTACTTGACAATCCAAA 240  
 46 F Q A L I D I Q E F Y E V T L L D N P K 65  
 241 ATGCATCGATCACTCTCAGCCGCTGAACCAATACAGCCTGTGAATACCTGGGACTTCTC 300  
 66 C I D H S Q P S E P I Q P V N T W D F S 85  
 301 CAGCCTTCCGAGCACAACAGTACATCAGAAACACTGCCAAGCAGCCTTAGCCCAAGTGT 360  
 86 S L P S T T V T S E T L P S S L S P S V 105  
 361 AGAAAATACCGCTATCAGGATGAAGATACACCTCCGAGGAGCAGACTCGCCGCACAT 420  
 106 E K Y R Y Q D E D T P P Q E H S S P H I 125  
 421 TGCCAACGAGGTGACGGGTCCGGAGCTGGTTACGTATCGGAGAAGAATCTGTCCAGAT 480  
 126 A N E V T G P E L V H V S E K N L S Q I 145  
 481 TGAGAATGACATGGATTGTTTCTCATTCTCATATTTGCCAGTAAAGGCAAAACCACC 540  
 146 E N V H G F V S H S H I S P V K A N P P 165  
 541 TCCAGTTCTGGTGAATACAGATTCTTTGGCACTCCAACATACGTCAATGGCACAGATGC 600  
 166 P V L V N T D S L D T P T Y V N G T D A 185  
 601 AGATTACGAGTATGAAGAAATTACTCTTGAAGGGGAAATTCAGGACTTGGCTTTAGCAT 660  
 186 D Y E Y E E I T L E R G N S G L G F S I 205  
 661 TGCAAGTGGCAGACAAACCCACATATTGGGGATGATTCAAGTATTTTCATTACCAAAAT 720  
 206 A G G T D N P H I G D D S S I F I T K I 225  
 721 TATAGCTGGAGTGCAGCTGCACAGGATGGAAGATTACGGGTTAATGATTGATTCTACC 780  
 226 I A G G A A A Q D G R L R V N D C I L R 245  
 781 AGTAAATGAGGTGATGTTCTGTGATGTGACACACAGCAAAGCAGTTGAAGCATTAAAGA 840  
 246 V N E V D V R D V T H S K A V E A L K E 265  
 841 AGCGGGATCAATTTGACGATTGTATGTCAAAAAGAAGAAAACAGTGACGGAATAAATAGT 900  
 266 A G S I V R L Y V K R R K P V T E K I V 285  
 901 GGAATAAACTTGTAAAAGGCCCAAGGTCTTGGTTTCAGTATTGCTGGTGGTGTAGG 960  
 286 E I K L V K G P K G L G F S I A G G V G 305  
 961 AAATCAGCATATACCTGGAGACAACAGCATCTATGTAACCAAAATCATTGAAGGAGGGGC 1020  
 306 N Q H I P G D N S I Y V T K I I E G G A 325  
 1021 AGCCCAAAAGATGGAAAACCTTCAAATTTGGTGACAAAACCTTTAGCTGTGAATAGTGTTG 1080  
 326 A H K D G K L Q I G D K L L A V N S V C 345  
 1081 CTTAGAAGAAGTACTCATGAAGAAGCAGTGACTGCCTTAAAAACACTTCTGACTTTGT 1140  
 346 L E E V T H E E A V T A L K N T S D F V 365  
 1141 TTATCTGAAAGTTGAAAACCCAGCATGTTTCATGAATGATAGTTACGCCCTCCTGAC 1200  
 366 Y L K V A K P T S M F M N D S Y A L L T 385  
 1201 ATCACAACCTCTTATTCTCCAACAGTGGACAACCCATATCACTCCATCTGCTACTTAGG 1260  
 386 S Q T L I L Q P V D N P Y H S I C Y L G 405  
 1261 ACAGTCCCTTCCCCAGCATCTCCAGGGCGATATTACCAATTCCAAAGGAATGCTTGG 1320  
 406 Q S L P P A S P G R Y S P I P K G M L G 425  
 1321 AGATGATGAGATTACCAGGGACCTAGAAAGGTTGCTCCTGCATCGAGGATCAACGGGTCT 1380  
 426 D D E I T R E P R K V V L H R G S T G L 445

1381 TGGTTTCAACATTGTTGGAGGAGAAGATGGAGAAGGAATTTTCATCTCCTTCATCCTTGC 1440  
 446 G F N I V G G E D G E G I F I S F I L A 465  
 1441 AGGAGGACAGCTGACCTCAGTGGAGAACTTAGGAAAGGCGATCGTATAATTTCTGTAAA 1500  
 466 G G P A D L S G E L R K G D R I I S V N 485  
 1501 TGGAGTTGACCTGAAGGAGCAACCCATGAACAAGCAGCAACAGCTTTGAAGAATGCAGG 1560  
 486 G V D L K A A T H E Q A A T A L K N A G 505  
 1561 CCAAGCAGTAACTATTGTGGCTCAGTACCGTCCAGAAGAATACAGTCGTTTTGAAGCTAA 1620  
 506 Q A V T I V A Q Y R P E E Y S R F E A K 525  
 1621 AATACATGATTTACGGGAGCAGATGATGAACAGTAGCATTAGCTCAGGATCAGGATCTTT 1680  
 526 I H D L R E Q M M N S S I S S G S G S L 545  
 1681 GCGAACCAGCCAGAAGATCCCTATATGTCAGAGCCCTTTTGGATTATGACAAGACTAA 1740  
 546 R T S Q K R S L Y V R A L F D Y D K T K 565  
 1741 AGACAGTGGCCTTCCAAGTCAAGGACTGAACTTCAAATTTGGTGATATTTCCATGTCAT 1800  
 566 D S G L P S Q G L N F K F G D I L H V I 585  
 1801 TAATGCTTCTGATGATGAATGGTGGCAAGCACGGCAGGTAACCTCCAGATGGAGAAAGTGA 1860  
 586 N A S D D E W W Q A R Q V T P D G E S D 605  
 1861 TGAATTTGGAGTTATCCAAGCAACGACAGATTGAGAAAAAAGAACGAGCCGTTTAAA 1920  
 606 E I G V I P S K R R V E K K E R A R L K 625  
 1921 GACAGTGAATTCATTCGAAGACAAGAGGAGAAAAGGGAGGTCCTGACGACATGGG 1980  
 626 T V K F N S K T R G E K G E V P D D M G 645  
 1981 ATCAAAGGCCTGAAGCATGTAACCTCTAATGCCAGCGATAGTAAAAGTAGTTACCGTGG 2040  
 646 S K G L K H V T S N A S D S E S S Y R G 665  
 2041 CCAAGAGGAATATGCTTGTCTTACGAACAAGTCAATCAACAAGAGTGAACATACTCG 2100  
 666 Q E E Y V L S Y E Q V N Q Q E V N Y T R 685  
 2101 ACCTGTGATGTTTGGGACCCATGAAAGACAGAATTAACGACGATCTGATTTCAGAATT 2160  
 686 P V I V L G P M K D R I N D D I S E F 705  
 2161 TCCAGACAAAATTTGGCTCATGTGTTCCACATACTACTAGACAAAACGAGATTATGAGGT 2220  
 706 P D K F G S C V P H T T R P K R D Y E V 725  
 2221 GGATGGACGTGATTACCATTTTGTCACTTCTCGAGAGCAAATGGAGAAGGATATTGAGGA 2280  
 726 D G R D Y H F V T S R E Q M E K D I Q E 745  
 2281 GCACAAATTCATTGAAGCTGGCCAGTACAATAATCATCTTTTGAACAAGTGTGCAATC 2340  
 746 H K F I E A G Q Y N N H L Y G T S V Q S 765  
 2341 AGTGCAGAAAGTAGCAGAAAAGGTAACATTGTATTCTTGATGTTTCTGGTAATGCCAT 2400  
 766 V R E V A E K G K H C I L D V S G N A I 785  
 2401 CAAAAGTTGCAGATTGCCAGCTGTACCAATCTCCATTTTTATTAACCCAAAACAGT 2460  
 786 K R L Q I A Q L Y P I S I F I K P K T V 805  
 2461 GGAAAATATCATGGAAATGAATAAACGCTTAAACGGAAGAACAAGCCAGGAAGACATTTGA 2520  
 806 E N I M E M N K R L T E E Q A R K T F E 825  
 2521 AAGAGCAATGAACTGGAGCAAGAGTTTACTGAACACTTACAGCTATTATCCAAGGAGA 2580  
 826 R A M K L E Q E F T E H F T A I I Q G D 845  
 2581 CACACTGGAAGAAATCTACAACCAAGTGAACAGATCATAGAGGAACAATCTGGGCCTTA 2640  
 846 T L E E I Y N Q V K Q I I E E Q S G P Y 865  
 2641 CATCTGGTTCAGCAAAAGGAAAATATGAAAACGGATTTTTGCTTTTCATTTCTATC 2700  
 866 I W V P A K E K L \* 875

**Nukleotid- und Aminosäuresequenz von Chapsyn110 des Huhns**

1 GGTAGATAGTCGACGAAGAGCTATGTAGCTTTCACTCAGTGCCTTCAAGACATGTCTTT 60  
 61 TGTAGTCAGAAAAACAGAGATCAATGCATTTTCAAACAGACAGGGAACGGATGCTCCT 120  
 121 TAGTAGCACATGCTCGGGATCGTGTGTGTACCGTTTGTGACAGACAGAGACGCTGAATAC 180  
 181 TGGTCCATATGCTCCTTGTCTTACTGCAATGTTTTTTCATGTTACTGTGCACTCCGGACT 240  
 1 M F F A C Y C A L R T 11  
 241 AATGTGAAGAAATACCGTTATCAAGATGAGGATGCTCCACAGATCATACTTTGCCTCGA 300  
 12 N V K K Y R Y Q D E D A P H D H T L P R 31  
 301 TTGACCCATGAAGTGAAGGCCAGAGCTTGTTCACGTGTCAGAGAAGAACTTGTCTCAA 360  
 32 L T H E V R G P E L V H V S E K N L S Q 51  
 361 ATAGAGAATGTCCATGGATATGTCTTACAGTCGCACATTTCTCCTTTGAAGGCAAGCCCT 420  
 52 I E N V H G Y V L Q S H I S P L K A S P 71  
 421 GCCCTATAAATGTCAATACAGACACCTTGGACACAATCCCTTATGTCAATGGAACAGAA 480  
 72 A P I I V N T D T L D T I P Y V N G T E 91  
 481 ATTGAATGAATTTGAAGAAATTACGTTGGAAGGGGAATTCTGGCCTGGGGTTCAGT 540  
 92 I E Y E F E E I T L E R G N S G L G F S 111  
 541 ATTGCTGGAGAACAGATAACCCACACATTGGGGATGATCCTGGGATATTCTACTAAG 600  
 112 I A G G T D N P H I G D D P G I F I T K 131  
 601 ATTATACCAGGAGGAGCTGCAGCAGAGGATGGAAGACTCAGGGTCAACGACTGCATCTTG 660  
 132 I I P G G A A A E D G R L R V N D C I L 151  
 661 CGAGTAATGAGGTGAATGTGTCAGAAGTCTCACACAGCAAAGCCGTGGGCCCTAAAA 720  
 152 R V N E V D V S E V S H S K A V E A L K 171  
 721 GAGGCTGGCTCCATAGTCCGATTGTATGTTCTGCGAAGGAGACCTATTCTGGAGACCGTG 780  
 172 E A G S I V R L Y V R R R R P I L E T V 191  
 781 GTGGAGATCAAGTTGTTAAAGGCCCTAAAGGCTGGGTTTCAATGTCAGGAGGAGTG 840  
 192 V E I K L F K G P K G L G F S I A G G V 211  
 841 GGAAACCAACACATTTCTGGGGACAACAGCATTATGTACCAAGATTATTGAAGGAGGA 900  
 212 G N Q H I P G D N S I Y V T K I I E G G 231  
 901 GCTGCGCAAAAAGATGGGAGGTTACAGGTTGGAGATAGACTTCTTATGGTAAACAATTAT 960  
 232 A A Q K D G R L Q V G D R L L M V N N Y 251  
 961 AGTTTAGAAGAAGTTACCCATGAAGAAGCTGTAGCGATACTGAAGAACATCAGATGTA 1020  
 252 S L E E V T H E E A V A I L K N T S D V 271  
 1021 GTGTATCTAAAAGTTGGAAGGCCACCACCATTATACATGACCGATCCTTATGGCCACCA 1080  
 272 V Y L K V G K P T T I Y M T D P Y G P P 291  
 1081 GACATTACTACTCTTATTCTCCACCAATGGAATAATCATATACTCTCTCTGGAACAAC 1140  
 292 D I T H S Y S P P M E N H I L S S G N N 311  
 1141 GGCACCTTAGAGTACAAGCGCTTTTGGCCCTATCTACCTGGAAGATACTACCCATT 1200  
 312 G T L E Y K A S L A P I S P G R Y S P I 331  
 1201 CCAAAGCACATGCTTGTGGAGGATGACTACACAGGCCTCCTGAACCTGTTTACAGACA 1260  
 332 P K H M L V E D D Y T R P P E P V Y S T 351  
 1261 CAGTTTGTTCACAGTGTGTAACACAGGTTTCAGGAGGCACTATTCCCCTGTGAGTGTGAC 1320  
 352 Q F V H S A V N R F R R H Y S P V E C D 371  
 1321 AAAAATCTCTTCTTACAGCTCCCTATCCCACTACACATAGGCCTGCTCCCTGACTCT 1380  
 372 K N F L T A P Y P H Y H I G L L P D S 391  
 1381 GAGATCACAGTCATTCCAGCAGCACCAGCAACAGTCCGCCACAGTGAAGTGTGAC 1440  
 392 E I T S H S Q H S T A T R P P T V S L Q 411  
 1441 CGGACATCTCCGTGAAGGAGGCCTCGAAAAATCATCTCCACAAGGGGTCACCCGGA 1500  
 412 R T I I S V E G E P R K I I L H K G S T G 431  
 1501 CTGTGCTTTAACATTTGTGGAGGAGAAAGATGGGGAAGGCATTTTCTGTCTTTCATCTTA 1560  
 432 L G F N I V G G E D G E G I F V S F I L 451  
 1561 GCAGCGGGCTGTGATCTCAGTGGAGAAGTGCAGAGAGGAGATCAGATTTTGTCTGTG 1620  
 452 A G G P A D L S G E L Q R G D Q I L S V 471

1621 AATGGCATCGATCTTCAGAGGTGCTACCCACGAGCAGGCTGCAGCTGCACCTCAAAGGAGCA 1680  
 472 N G I D L R G A T H E Q A A A A L K G A 491  
 1681 GGCAGACGGTAAACATCATAGCACAAATACCAGCCGGAGGAATACGCTCGGTTTGAGGCA 1740  
 492 G Q T V T I I A Q Y Q P E E Y A R F E A 511  
 1741 AAAATCCATGACCTGCGTGCAGATGATGAATCACAGCATGATTTCTGGTCCGCTCC 1800  
 512 K I H D L R E Q M M N H S M S S G S G S 531  
 1801 CTGAGGACTAATCAGAAGAGGTCAGTGTATGTCAGAGCCATGTTTACTATGACAAGAGC 1860  
 532 L R T N Q K R S L Y V R A M F D Y D K S 551  
 1861 AAAGACAGTGGCTCCCAAGCAAGGACTCAGTTTAAAGTATGGAGACATCCTTCACGTC 1920  
 552 K D S G L P S Q G L S F K Y G D I L H V 571  
 1921 ATCAATGCCTCGGACGACGAATGGTGGCAGCGGAGAGGGTCACTCTGGAGGAGACAGT 1980  
 572 I N A S D D E W W Q A R R V T L E G D S 591  
 1981 GAGGAGATGGGAGTTATACCCAGCAAGAGGAGTGGAAAAGGAGGCGTGGCCCTTTG 2040  
 592 E E M G V I P S K R R R V E R K E R A L 611  
 2041 AAGACAGTGAAGTTCAACGCAAAAGCCTGGTGTCAATGATGCAAAAAGGGGACATCCCGGA 2100  
 612 K T V K F N A K P G V I D A K G D I P G 631  
 2101 TTAGTGCAGCAGGTTATGGAACAAAGACTCTGAGAGGCCAAGAAGACTGCATCCTTTCT 2160  
 632 L G D D G Y G T K T L R G Q E D C I L S 651  
 2161 TATGAGCTGTCAACAGCAGAAATTAATTACCCAGGCCAGTATTATTCTGGGTCT 2220  
 652 Y E P V T R Q E I N Y T R P V I I L G P 671  
 2221 ATGAAAGATCGGATCAATGATGACTTGTATCTGAATTCcTGATAAGTTTGGGTCAATG 2280  
 672 M K D R I N D D L I S E F P D K F G S C 691  
 2281 GTACCACATACCACAGCAAAAGCCTGAcTATGAAAGTGGAGGAGATTATCATT 2340  
 692 V P H T T R P K R D Y E V D G R D Y H F 711  
 2341 GTCATTTCAAGACAACAAATGGAATATCAAGAGCACAATTTATAGAAGCCGGG 2400  
 712 V I S R E Q M E K D I Q E H K F I E A G 731  
 2401 CAGTACAATGATAATTTATGAAACTAGTGTCCAGTCTGTGAGATTCTGGCAGAGAGG 2460  
 732 Q Y N D N L Y G T S V Q S V R F V A E R 751  
 2461 GGCAAGCACTGTATTCTTGTATGTCAGGAAATGGCATCAAAGACTACAAGTTGCACAA 2520  
 752 G K H C I L D V S G N A I K R L Q V A Q 771  
 2521 CTATATCCCATCGTATCTTCAATTAAGCCTAAATCATGGGAGCCTCTGATGGAATGAAT 2580  
 772 L Y P I A I F I K P K S W E P L M E M N 791  
 2581 AAACGCTTACAGAGGAGCAAGCAAGAAAACCTATGATCGTGGATTAAGTTAGAACAA 2640  
 792 K R L T E E Q A K K T Y D R A I K L E Q 811  
 2641 GAATTTGGAGAATATTTTACAGCTATTGTCGAAGGAGATAGCTTAGAAGATATATAAT 2700  
 812 E F G E Y F T A I V Q G D S L E D I Y N 831  
 2701 CAATGCAAACTGTAATTGAAGAACAGTCTGGGCTTTTCACTGGATTCCCAAGGAA 2760  
 832 Q C K L V I E E Q S G P F I W I P S K E 851  
 2761 AAATTATAAATAGCCACTGCACCTCTGATTACGACGGGAGAAATTTAGAGAAAAC 2820  
 852 K L \* 854  
 2821 TAATATACTATTTGGAGGCTTTCTGTTTTTGTGCAATTTATGTTCTTTGCACTCAATGT 2880  
 2881 GAATTTTGTGATGAATGTACAACAAAAGTGTTTGAAGCCATGAAGGCACTGATGGGTC 2940  
 2941 AGGGTAGAACAACAAAGACTTCTACCATATAAAGCAAACTGTTGTGTGCTGAAAGCACC 3000  
 3001 AGTTGTAGGTATAAACTTCTGACATGGAGACCTCTGTCAAGGGGAGTACCCACTCTT 3060  
 3061 GTGCCATCGGCACATTTTGTCAATTTCAATGGCTGAGCTCAGtGTGTGATTGCTTTA 3120  
 3121 AAGAGAAGTCCAGCTCTTGAACCTCATATAGGGCTTGTATTCTGCAAGGCGCTCAGCAC 3180  
 3181 TTGACCCCAATCTCACATGTGAGTAGCCATTGACTTTGGAGTTACTTGTGATCCTTC 3240  
 3241 CCTATGCCATTGAGTCCCATGCTCAGTCCAGTAGGACTATTGATGCTCAAAGCTAAGCAC 3300  
 3301 GGGCTTAAGCGTTCAGCTAGATCAGGGCCACAGCACCTTGCAAAATCAAGCTCAGAGT 3360  
 3361 CTGTGCTCACTTCTACTGAAGTCAATGATAGGACTGTCTTTGACTTGACTGGAGGTTG 3420  
 3421 ACCTATTCTAAGCTTGTCTTGCACATTTGTAGTTGGTACACCTCGACTTTGTTAACTA 3480  
 3481 TGCACATCTTTGATTTCTGAAACCAAGTCAAGCATTTCTTT 3522

**Partielle Nukleotid- und Aminosäuresequenz von SAP102 des Huhns**

TAACACCAACCTGCAGGACGTGCGGCACGAGGAGGCGGT 39  
 N T N L Q D V R H E E A V 13  
 GGCCGCGCTGAAGAACACCTCGGACGTGGTGTACCTGAAAGTGGCCAAGCCTGGCAGCCT 99  
 A A L K N T S D V V Y L K V A K P G S L 33  
 GCACCTCAACGACATGTACGCGCCCCCGACTACGCCAGCACCTTTTCAGCCTTGGCTGA 159  
 H L N D M Y A P P D Y A S T F S A L A D 53  
 CAACCACATAAGCCATAACTCCAGTCTGGGTACTTGGGTGGTGTGAGAGCAAGCCTGC 219  
 N H I S H N S S L G Y L G G V E S K P A 73  
 ATACCCCGTCCCCCACAGGTGACCCCTCCAGGTATTGCCCCATCCCTCGGCACATGAT 279  
 Y P V P P Q V T P S R Y S P I P R H M I 93  
 CGGGGATGAAGACTTCACCAGGGAGCCCCGAAAATCATCCTGCACAAAGGCTCCACCGG 339  
 G D E D F T R E P R K I I L H K G S T G 113  
 CCTGGGCTTCAACATCGTGGGGGAGAGGACGGAGGTGTATCTTCTGTCCTTCATCCT 399  
 L G F N I V G G E D G E C I F V S F I L 133  
 GGCCGGAGGCCCCCGACCTCAGCGGGAGCTGCGGAGGGGAGCCGATCCTGTGCGGT 459  
 A G G P A D L S G E L R R G D R I L S V 153  
 GAACGGCGTGAACCTCCGTAACGCCACCCACGAGCAGCGCGGCGCGCTGAAGCGGGC 519  
 N G V N L R N A T H E Q A A A A L K R A 173  
 GGGCAGACGGTGACCATCATCGCGCAGTACCGCCCGAAGAGTACAGCCGCTTCGAGTC 579  
 G Q T V T I I A Q Y R P E E Y S R F E S 193  
 CAAGATCCAGACTTGAGAGCAGATGATGAACAGCAGCATGAGCTCTGGCTCTGGCTC 639  
 K I H D L R E Q M M N S S M S S G S G S 213  
 ACTTCGGACAAGCGAGAAGAGGTCCCTCTATGTCCGAGCTCTGTTGACTATGACCGGAC 699  
 L R T S E K R S L Y V R A L F D Y D R T 233  
 CCGGGACAGCTGTTACCCAGCCAGGGCTCAGCTTCTCTATGGGGACATCCTCCATGT 759  
 R D S C L P S Q G L S F S Y G D I L H V 253  
 CATCAATGCCTCTGATGATGAGTGGTGGCAAGCCAGGCTTGTGACACCTCAGGCGAGAG 819  
 I N A S D D E W W Q A R L V T P H G E S 273  
 TGAGCAGATTGGAGTCATCCCAGCAAGAAGAGGGTGGAGAAGAAGGAGAGAGCGCGGTT 879  
 E Q I G V I P S K K R V E K K E R A R L 293  
 GAAAACGGTGAAGTTCACGCCAGGACTGGCATGATAGAGTCCAACCGGACTTCCCTGG 939  
 K T V K F H A R T G M I E S N R D F P G 313  
 GTTAAGTGACGATTATTATGGAGCAAGAACCTGAAGGCGTGCATCAAACACCAGTGA 999  
 L S D D Y Y G A K N L K G V T S N T S D 333  
 CAGCGAGAGCAGTTCAAAGGACAAGAGGACTATCCTGTACATACGAGCCAGTGACAGC 1059  
 S E S S S K G Q E D T I L S Y E P V T R 353  
 GCAAGAAATCACTACGCCAGGCTGTGATCATCGTGGGGCCCAAGGACCGAATCAA 1119  
 Q E I H Y A R P V I I V G P T K D R I N 373  
 TGACGACCTCATCTCTGAATTTCCACACAAGTTTGGTTCTGCTGCGCCACACACCACAG 1279  
 D D L I S E F P H K F G S C V P H T T R 393  
 GCCTCGGCGTGATAATGAGGTGGATGGACAGGATTACCACTTCTGCTCTCCCGAGAACA 1339  
 P R R D N E V D G Q D Y H F V V S R E Q 413  
 GATGGAGAAGGATATTCAAGACAACAAGTTATAGAGGCCGGCAGTTCAACGACAATCT 1499  
 M E K D I Q D N K F I E A G Q F N D N L 433  
 CTACGGGACCAGCATTCACTCGGTGCGGGCGGTCGAGAGAGGGGAAAACACTGCATCCT 1559  
 Y G T S I Q S V R A V A E R G K H C I L 453  
 GGATGTATCTGGCAATGCTATCAAGAGTTGCAACAAGCACAACCTTATCCCATTGCCAT 1619  
 D V S G N A I K R L Q Q A Q L Y P I A I 473

TTTCATCAAACAAAATCCATCGAAGCGCTCATGGAGATGAACCCGAGGCAGACATACGA 1779  
 F I K P K S I E A L M E M N R R Q T Y E 493  
 ACAGGCCAACAAAGGTCTTTGACAAAGCCATGAAACTCGAGCAAGAATTTGGAGAGTATTT 1839  
 Q A N K V F D K A M K L E Q E F G E Y F 513  
 TACAGCCATCGTACAAGGAGACTCCCTCCCGGAATTC 1876  
 T A I V Q G D S L P E F 525



### Meßwerte für die relative Expressionsstärke der SAP

SAP90 30min HV medial				SAP90 30 min HV lateral				SAP90, 30 min, IMHV				SAP90, 30 min, Feld L1			
naiv		geprägt		naiv		geprägt		naiv		geprägt		naiv		geprägt	
li	re	li	re	li	re	li	re	li	re	li	re	li	re	li	re
1,9	1,87	1,65	1,56	2,16	2,14	1,68	1,67	2,31	2,16	2,09	2,23	2,54	2,33	2,36	2,39
1,89	1,84	1,93	1,92	2,16	2,3	2,31	2,29	2,17	2,13	2,38	2,38	2,21	2,12	2,7	2,68
1,77	1,71	1,94	1,93	2,21	2,08	2,16	2,21	1,67	1,7	2,25	2,29	1,94	2	2,77	2,76
Mittelwerte:				Mittelwerte:				Mittelwerte:				Mittelwerte:			
1,85	1,81	1,84	1,8	2,18	2,17	2,05	2,06	2,05	2	2,24	2,3	2,23	2,15	2,61	2,61
SAP90, 5h, HV medial				SAP90, 5h, HV lateral				SAP90, 5h, IMHV				SAP90, 5h, Feld L1			
naiv		geprägt		naiv		geprägt		naiv		geprägt		naiv		geprägt	
li	re	li	re	li	re	li	re	li	re	li	re	li	re	li	re
1,64	1,66	1,92	1,8	1,97	1,94	2,1	2,03	1,78	1,78	1,95	1,87	1,92	1,92	2,23	2,14
1,74	1,58	2,18	2,16	2,1	2	2,63	2,4	1,88	1,81	2,02	2,04	2,15	2,13	2,2	2,01
1,9	1,76	1,81	1,84	2,13	2,12	2,3	2,38	2,11	2,04	2,18	2,19	2,37	2,13	2,2	2,01
Mittelwerte:				Mittelwerte:				Mittelwerte:				Mittelwerte:			
1,76	1,67	1,97	1,93	2,07	2,02	2,34	2,27	1,92	1,88	2,05	2,03	2,15	2,06	2,21	2,05
SAP90, 5h, LPO				SAP90, 10h, HV medial				SAP90, 10h, HV lateral				SAP90, 10h, IMHV			
naiv		geprägt		naiv		geprägt		naiv		geprägt		naiv		geprägt	
li	re	li	re	li	re	li	re	li	re	li	re	li	re	li	re
1,5	1,55	1,66	1,58	1,63	1,52	1,71	1,71	1,98	1,79	1,92	1,94	1,32	1,38	1,42	1,35
1,93	1,83	2,05	1,99	1,95	1,94	1,96	1,96	2,21	2,22	2,01	2,01	1,54	1,58	1,89	1,83
1,84	1,67	1,79	1,73	1,59	1,51	1,61	1,57	1,70	1,70	1,86	1,87	1,4	1,36	1,31	1,28
Mittelwerte:				Mittelwerte:				Mittelwerte:				Mittelwerte:			
1,76	1,68	1,83	1,77	1,72	1,66	1,76	1,75	1,96	1,9	1,93	1,94	1,42	1,44	1,54	1,49
SAP90, 10h, Feld L				SAP90, 10h, LPO				SAP97, 30 min, Feld L2				SAP97 30min Ectoatriat.			
naiv		geprägt		naiv		geprägt		naiv		geprägt		naiv		geprägt	
li	re	li	re	li	re	li	re	li	re	li	re	li	re	li	re
1,62	1,66	1,71	1,66	1,66	1,74	1,93	1,97	2,08	2,09	2,07	2,02	1,59	1,64	1,63	1,63
2,23	2,12	2,24	2,33	2,16	2,23	1,93	1,99	2,1	2,07	2,36	2,42	1,53	1,54	1,62	1,61
1,66	1,59	1,53	1,54	1,60	1,60	1,57	1,62	2,1	1,99	1,9	1,95	1,66	1,59	1,68	1,66
Mittelwerte:				Mittelwerte:				Mittelwerte:				Mittelwerte:			
1,84	1,79	1,83	1,84	1,81	1,86	1,81	1,86	2,09	2,05	2,11	2,13	1,59	1,59	1,64	1,63
SAP97, 5h, Feld L2				SAP97, 5h, Ectoatriatum				SAP97, 10h, Feld L2				SAP97 10h Ectoatriatum			
naiv		geprägt		naiv		geprägt		naiv		geprägt		naiv		geprägt	
li	re	li	re	li	re	li	re	li	re	li	re	li	re	li	re
1,98	1,99	1,96	2,07	1,46	1,5	1,5	1,47	1,58	1,56	1,46	1,43	1,81	1,75	1,38	1,5
2,42	2,35	2,18	2,18	1,56	1,58	1,4	1,49	1,48	1,48	1,66	1,7	1,7	1,67	1,54	1,67
2,17	2,17	2,06	2,09	1,53	1,53	1,52	1,56	1,39	1,34	1,32	1,31	1,67	1,62	1,53	1,54
Mittelwerte:				Mittelwerte:				Mittelwerte:				Mittelwerte:			
2,19	2,17	2,07	2,11	1,52	1,54	1,47	1,51	1,48	1,46	1,48	1,48	1,73	1,68	1,48	1,57
Chapsyn110, 30min MNH				Chaps., 30min Feld L2				Chapsyn110, 5h, MNH				Chapsyn110, 5h Feld L2			
naiv		geprägt		naiv		geprägt		naiv		geprägt		naiv		geprägt	
li	re	li	re	li	re	li	re	li	re	li	re	li	re	li	re
3,37	3,32	3,76	3,67	4,41	4,27	3,7	3,44	4,01	4	4,11	4,11	4,06	4,04	4,25	4,29
3,8	3,76	3,66	3,79	4,19	4,23	4,12	4,05	3,89	3,99	4	3,91	4,11	4,05	4,01	3,84
3,78	3,84	3,76	3,79	4,18	4,28	4,13	4,04	3,76	3,67	3,52	3,54	3,87	3,77	3,85	3,96
Mittelwerte:				Mittelwerte:				Mittelwerte:				Mittelwerte:			
3,65	3,64	3,73	3,75	4,26	4,26	3,98	3,84	3,89	3,89	3,88	3,85	4,01	3,95	4,04	4,03
Chapsyn110, 10h MNH				Chapsyn110, 10h FeldL2											
naiv		geprägt		naiv		geprägt									
li	re	li	re	li	re	li	re								
3,94	3,89	4,17	4,19	3,32	3,25	3,25	3,27								
2,98	2,73	2,98	2,99	3,97	3,96	4,09	4,1								
				2,91	2,91	2,57	2,61								
Mittelwerte:				Mittelwerte:											
3,46	3,31	3,58	3,59	3,4	3,37	3,3	3,33								

