

Aus dem Institut für Mikroskopische Anatomie und Neurobiologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Plasticity-related gene 2 (PRG-2/LPPR3) und seine intrazellulären Interaktionspartner

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Rahel Böttche
aus Bergisch-Gladbach

Mainz, 2022

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. U. Förstermann

1. Gutachter: xxxxx

2. Gutachter: xxxxx

Tag der Promotion: 12. Juli 2022

Für meine Tante Claudia

- In liebevoller Erinnerung -

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Vorstellung der Plasticity-related genes.....	1
1.2 Das Hefe-Zwei-Hybrid-System	2
1.3 Suche nach potentiellen Interaktionspartnern von PRG 2.....	3
1.4 Vorstellung der potentiellen Interaktionspartner.....	4
1.4.1 Radixin	4
1.4.2 DCAF 8	5
1.4.3 DDX 5.....	6
1.5 Zielsetzung.....	6
2 Materialien und Methoden.....	8
2.1 Materialien.....	8
2.1.1 Antikörper	8
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien	9
2.1.3 Puffer und Lösungen	11
2.1.4 Geräte und andere Materialien	12
2.2 Methoden	14
2.2.1 Präparation der murinen Gehirne	14
2.2.2 Zellaufschlussverfahren und Solubilisierung.....	15
2.2.3 Quantifizierung der Proteinkonzentration.....	17
2.2.4 Ko-Immunpräzipitation.....	17
2.2.5 Eindimensionale Gelelektrophorese	20
2.2.6 Western Blot.....	23
2.2.7 Immundetektion.....	24
2.2.8 Immunhistochemie bzw. Immunfluoreszenz	25
3 Ergebnisse	28
3.1 Testung der Antikörper im Western Blot	28
3.2 Ko-Immunpräzipitation.....	29
3.2.1 PRG2/Radixin.....	29
3.2.2 PRG 2/DCAF 8.....	34
3.2.3 PRG 2/DDX 5.....	35
3.3 Immunhistochemie	36
3.3.1 PRG 2/Radixin.....	36
4 Diskussion.....	39
4.1 PRGs - eine neue Protein-Familie	39
4.2 Y2H - Potentielle Kandidaten einer Protein-Protein-Interaktion.....	39

4.2.1	Verfahren und Weiterentwicklung	39
4.2.2	Einschränkungen und Fehlerquellen des Y2H	40
4.3	Überprüfung der potentiellen Interaktionspartner	41
4.3.1	Einfluss von Detergenzien auf Solubilisierung und PPI	41
4.3.2	PRG 2 und DDX 5	41
4.3.3	PRG 2 und DCAF 8	42
4.3.4	PRG 2 und Radixin	43
4.4	Ein genauerer Blick auf Radixin	45
4.4.1	Aufbau und Regulation der ERMs	45
4.4.2	ERMs in Mitose und Zellteilung	46
4.4.3	Bekannte Interaktionen der FERM-Domäne	47
4.4.4	ERMs in der neuronalen Embryonalentwicklung von Ratten	47
4.4.5	Homozygoter Radixin-Knockout verursacht Taubheit bei Mäusen	48
4.5	Neue Erkenntnisse zur Interaktion zwischen Radixin und PRG 2	49
4.5.1	Abweichungen der thalamokortikalen Projektion durch homozygoten PRG 2-Knockout	49
4.5.2	Kolokalisation von PRG 2 und Radixin in Wachstumskegeln	50
4.5.3	Auswirkungen von PRG 2 auf die Phosphorylierung von ERMs	50
4.5.4	Die Rolle von extrazellulärem LPA in der Phosphorylierung von ERMs	51
5	Zusammenfassung	52
6	Literaturverzeichnis	54
7	Anhang	57
8	Danksagung	58
9	Tabellarischer Lebenslauf	59

Abkürzungsverzeichnis

AG	Arbeitsgruppe
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BAT 3	engl.: HLA-B associated transcript 3 (Synonym: BAG 6)
BCA	Bicinchinonsäure, 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure (engl.: Bicinchoninic acid)
BCIG	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (Synonym: X-gal)
BSA	Bovines Serumalbumin
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	Unterscheidungsgruppen (engl.: Cluster of Differentiation)
cDNA	engl. complementary deoxyribonucleic acid
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCAF 8	engl.: DDB1- and CUL4-associated factor 8 (Synonym: WDR42A)
DDM	Dodecyl β -D-Maltosid
DDX 5	engl.: Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: deoxyribonucleic acid)
DTT	Dithiothreitol
E17	17. Tag der Embryonalentwicklung (analog E15, E19 usw.)
E3KARP	engl.: NHE3 kinase A regulatory protein (Synonym: NHERF2)
EBP50	engl.: ERM-binding phosphoprotein 50 (Synonym: NHERF1)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraessigsäure
engl.	englisch

ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	und andere (lateinisch: et alii)
Fab	Antigenbindendes Fragment (engl.: antigen-binding fragment)
Fc	Kristallisierbares Fragment (engl.: crystallisable fragment)
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HRP	Meerrettichperoxidase (engl.: Horseradish Peroxidase)
ICAM2	engl.: Intercellular adhesion molecule 2
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
kDa	Kilodalton
(Ko-) IP	(Ko-) Immunpräzipitation
KO	Ausschalten der Funktion eines bestimmten Gens (engl.: Knock-out)
LPA	Lysophosphatidsäure (engl.: lysophosphatidic acid)
LPC	Lysophosphatidylcholin
LPPs	Lipidphosphat-Phosphatasen
MG	Molekulargewicht
mRNS	engl. messenger Ribonukleinsäure
NGS	Normales Ziegenserum (engl.: Normal Goat Serum)
NHS	Normales Pferdeserum (engl.: Normal Horse Serum)
PB	Natriumphosphatpuffer (engl.: Sodium phosphate buffer)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl.: Phosphate buffered saline)
PBST	Phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween 20
PPI	Protein-Protein-Interaktionen
PRG 1	engl.: Plasticity-related gene 1 (Synonym: PLPPR 4)
PRG 2	engl.: Plasticity-related gene 2 (Synonym: PLPPR 3)

PRGs	engl.: Plasticity-related genes
Rdx	Radixin
rpm	Rotationen pro Minute
s. / s.o.	siehe / siehe oben
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: Sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
usw.	und so weiter
vgl.	vergleiche
WB	Western Blot
Y2H	Hefe-Zwei-Hybrid (engl.: Yeast two-hybrid)

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: In-situ-Hybridisierung von PRG 2 in murinen zerebralen Gewebeschnitten

Abb. 2: (A) Schema der LPP-Superfamilie (B) Schematische Darstellung von PRG 2

Abb. 3: Schema zur Solubilisierung von integralen Membranproteinen

Abb. 4: Schema der Ko-Immunpräzipitation

Abb. 5: Prinzip der SDS-PAGE

Abb. 6: Schema der Immundetektion

Abb. 7: Testung der Antikörper im Western Blot

Abb. 8: Kontroll-IP Anti-PRG 2-CT 2

Abb. 9: Kontroll-IP Anti-Radixin

Abb. 10: Ko-IP PRG 2/Radixin

Abb. 11: Ko-IP DCAF 8/PRG 2

Abb. 12: Ko-IP PRG 2/DDX 5

Abb. 13: Axonale Ko-Lokalisierung von PRG 2 und Radixin E14 (1)

Abb. 14: Axonale Ko-Lokalisierung von PRG 2 und Radixin E14 (2)

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Primärantikörper

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper

1 Einleitung

1.1 Vorstellung der Plasticity-related genes

Plasticity-related genes (PRGs) (Synonym: LPPRs; engl.: Lipid phosphate phosphatase-related proteins) sind eine neue Gruppe von Transmembranproteinen, die spezifisch zerebral in Wirbeltieren zu finden sind.

PRGs haben sechs Transmembrandomänen und drei extrazelluläre katalytische Domänen (s. Abb. 2). Domänen sind Proteinbereiche mit einer festgelegten Faltungsstruktur und Funktion. Hier weisen die PRGs Übereinstimmungen mit den Lipidphosphat-Phosphatasen (LPPs) auf. LPPs können phosphorylierte Lipidsubstrate wie bspw. Lysophosphatidsäure (LPA, engl. lysophosphatidic acid) oder Sphingosin-1-phosphat (S1P) dephosphorylieren [1, 2]. Aufgrund von Abweichungen spezifischer Aminosäuren in den extrazellulären katalytischen Domänen haben die PRGs jedoch keine ektoenzymatische Aktivität wie andere Proteine der LPP-Superfamilie [3].

LPA und S1P gehören zu den bioaktiven Lipidphosphaten und sind u.a. involviert in Tumorwachstum, Angiogenese sowie die Entwicklung des zerebralen Kortex [4, 5].

Diese extrazellulären Signalmoleküle sind Schlüsselfaktoren für die Initiierung von rezeptorvermittelten Signalkaskaden bspw. über G-Protein gekoppelte Rezeptoren [6, 7]. LPA und S1P werden von dem nach extrazellulär sezernierten Enzym Autotaxin aus Lysophosphatidylcholin (LPC), einem ubiquitär vorkommenden Phospholipid, gebildet [8].

Autotaxin spielt ebenfalls eine entscheidende Rolle in der embryonalen Neurogenese. So sterben Mäuseembryonen, deren Autotaxin-Gen ausgeschaltet wurde, am 10. Tag der Embryonalentwicklung aufgrund von fehlgebildeten Gefäßen und einem defekten Neuralrohr, der embryonalen Anlage des zentralen Nervensystems. In der Embryonalperiode wird Autotaxin u.a. in der Bodenplatte, dem ventralen Anteil des sich entwickelnden Neuralrohrs exprimiert [9-11].

PRG 2 wird hauptsächlich im embryonalen Organismus gebildet. Die PRG 2-Expression beginnt am 12. Tag der Embryonalperiode im sich entwickelnden Kortex. Zunächst ist es in der ventrikulären Zone, dem Hauptort der kortikalen Neurogenese, lokalisiert. Später findet es sich ebenfalls in der kortikalen Platte, die postmitotische Neurone enthält. Postnatal nimmt die PRG 2-Expression stufenweise ab. Das Membranprotein ist dann noch in Regionen der postnatalen Neurogenese (Gyrus dentatus und Ventrikelwand) und in sich hauptsächlich postnatal entwickelnden Strukturen wie dem Kleinhirn detektierbar [unpublizierte Daten] (s. Abb. 1).

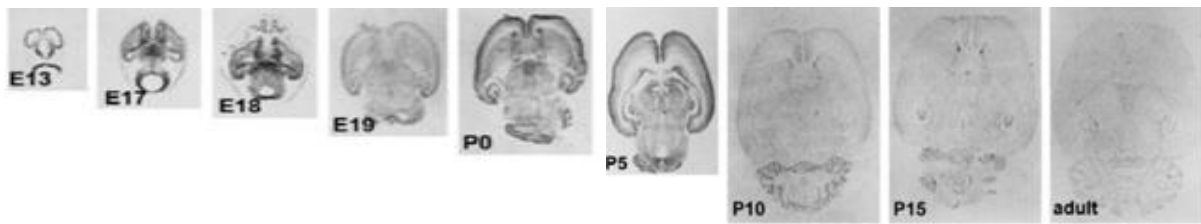


Abb. 1: In-situ-Hybridisierung von PRG2 in murinen zerebralen Gewebeschnitten (E13-adult). Bei diesem Verfahren werden die Gewebeschnitte nach Fixation mit Formaldehyd mit einer mRNA-Sonde inkubiert. Es werden nur diejenigen Zellen markiert, in denen das PRG 2- Gen aktiv ist und transkribiert wird [unpublizierte Daten, AG Nitsch].

Eine Besonderheit von PRG 1 und PRG 2 in der Familie der PRGs ist ihre intrazelluläre hydrophile C-terminale Domäne von ca. 400 Aminosäuren [2] (s. Abb. 2). Man geht davon aus, dass diese zytoplasmatische Domäne nach Interaktion der extrazellulären Domäne mit bioaktiven Phospholipiden die intrazelluläre Signaltransduktion vermittelt.

Die Bestimmung von intrazellulären Interaktionspartnern von PRG 2 ist wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit.

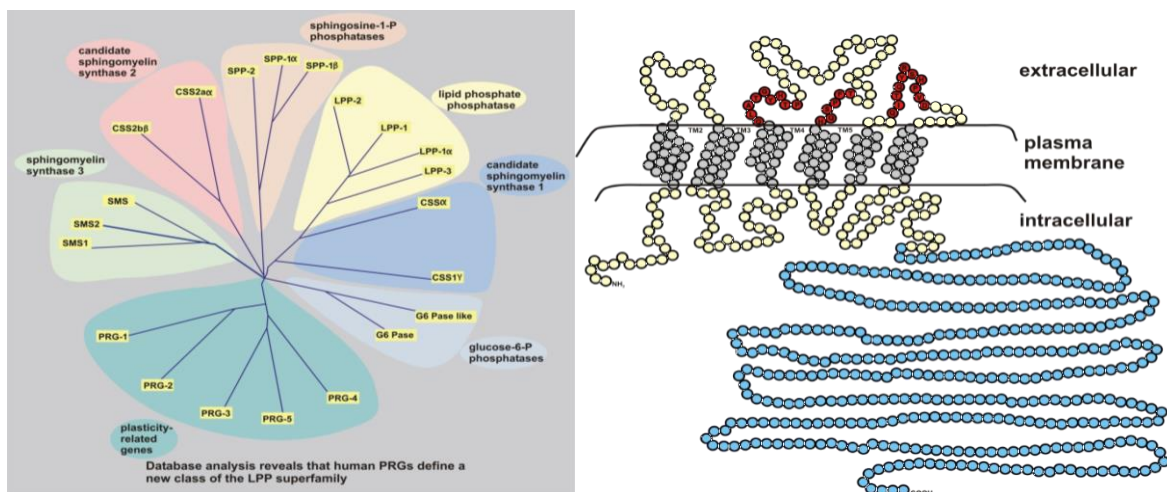


Abb. 2: (A) Schema der LPP-Superfamilie. Plasticity-related genes (PRGs) bilden eine neue Klasse der LPP-Superfamilie. [AG Nitsch] **(B) Schematische Darstellung von PRG 2.** Es besitzt sechs Transmembrandomänen (grau) und eine zytoplasmatische C-terminale Domäne von ca. 400 Aminosäuren Länge (blau). PRG 2 besitzt drei extrazelluläre konservierte funktionelle Domänen (rot), an denen es Ähnlichkeiten zu den LPPs aufweist [3].

1.2 Das Hefe-Zwei-Hybrid-System

Zur Identifikation von möglichen Protein-Interaktionspartnern von PRG 2 wurde zunächst ein Hefe-Zwei-Hybrid-System (Y2H, engl.: Yeast Two-Hybrid) verwendet. Bei diesem genetischen Verfahren zur Identifikation von Protein-Protein-Interaktionen, das erstmals von S. Fields und O. Song im Jahr 1989 beschrieben wurde, nutzt man die Eigenschaften des GAL 4-Proteins.

Das GAL 4-Protein ist ein Transkriptionsfaktor für ein Gen der Galaktose-Verwertung in *Saccharomyces cerevisiae*, der Backhefe. GAL 4 besteht aus zwei trennbaren aber funktionell essentiellen Domänen. Die N-terminale Domäne bindet an eine spezifische DNA-Sequenz, den GAL 4-Promoter, (GAL 4-DBD: GAL 4-DNA-bindende Domäne) während die C-terminale Domäne für die Aktivierung der Transkription benötigt wird (GAL 4-AD: GAL 4-Aktivierende Domäne). Fields und Song stellten zwei Fusionsproteine her: Ein Köderprotein gebunden an GAL 4-DBD sowie ein Beuteprotein gebunden an GAL 4-AD. Normalerweise befinden sich die beiden Domänen des GAL 4-Proteins auf einer Polypeptidkette. Eine Aktivierung der Transkription konnte allerdings auch erreicht werden, wenn die beiden GAL 4-Domänen (GAL 4-AD und GAL 4-DBD) durch nicht kovalente Bindung zwischen dem Köder- und Beuteprotein zusammengebracht wurden.

Als Reportergen, dessen Transkription durch den GAL 1-Promoter gesteuert wurde, verwendeten Fields und Song das lacZ-Gen aus *E. coli* Bakterien [12]. Das lacZ-Gen kodiert für das Enzym β -Galaktosidase, das bakteriell zur Spaltung von Laktose (Milchzucker) benötigt wird. Durch die Zugabe des Laktose-Analogons X-gal bzw. BCIG, das aus Galaktose und einem Indol besteht, kann eine chromogene d.h. farbgebende Reaktion ausgelöst werden. Das Substrat X-gal wird von der β -Galaktosidase gespalten wobei 5-Brom-4-chlor-indoxyl entsteht. Diese Substanz oxidiert an der Luft und das Produkt der Oxidation bildet ein Dimer, den blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo. Die sogenannte Blau-Weiß-Selektion dient dem Nachweis der β -Galaktosidase Aktivität in Bakterien oder Hefen [13].

1.3 Suche nach potentiellen Interaktionspartnern von PRG 2

Ein weiterentwickeltes Y2H-Verfahren wurde von Stelzl et al. für die Erstellung eines Netzwerkes von humanen Protein-Protein-Interaktionen genutzt. Dafür wurde cDNA von einer humanen fetalen zerebralen Expressionsdatenbank verwendet. cDNA ist synthetisch hergestellte DNA, die ausschließlich aus kodierenden Abschnitten eines Gens besteht und in der Molekularbiologie zur Anwendung kommt. Die humanen cDNA-Fragmente und die Gene der GAL 4-DBD oder GAL 4-AD wurden in Plasmide eingefügt. Plasmide bestehen aus ringförmiger extrachromosomaler DNA und kommen in Bakterien und Hefen vor. Haploide Hefezellen, d.h. Hefezellen mit einem einfachen Chromosomensatz wurden mit den so entstandenen 5543 Köderplasmiden (enthalten humane cDNA und das GAL 4-DBD-Gen) und 5640 Beutepiasmiden (enthalten humane cDNA und das GAL 4-AD-Gen) transfiziert. Zellen, die ihre Reportergene bereits vor der Verpaarung selbst aktivierten, wurden aussortiert. Im ersten Untersuchungsdurchgang wurden jeweils acht Köderhefen gepoolt und danach mit allen Beuteklonen verpaart. In den verpaarten diploiden Hefezellen wurden demnach zwei Fusionsproteine synthetisiert: Köder und Beute.

Als Reportergene wurden im ersten Schritt des Experiments das HIS3- und das URA3-Gen verwendet und das Wachstum auf selektiven Nährböden beobachtet. Das Genprodukt von HIS3 ist ein Enzym zur Histidinsynthese und das URA3-Gen kodiert für ein Pyrimidin bzw. Uracil synthetisierendes Enzym der Backhefe. Auf Nährböden, die kein Histidin und Uracil enthalten, können demnach nur Hefepilze wachsen, bei denen eine Protein-Protein-Interaktion von Köder- und Beuteprotein stattgefunden hat und folglich Histidin und Uracil selbst hergestellt werden können.

Konnte im ersten Schritt des Experiments ein Wachstum beobachtet werden, wurden die acht zuvor gepoolten Köderhefen noch einmal einzeln mit der Hefe, die das positiv getestete Beuteplasmid enthielt, verpaart. Dabei wurde zu den zwei oben genannten Reportergenen zusätzlich noch das lacZ-Reportergen verwendet (s. 1.2).

Nur wenn beide Testverfahren positiv ausfielen und alle drei Reportergene aktiviert wurden, wurde von einer hochwahrscheinlichen Protein-Protein-Interaktion ausgegangen [14].

Die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Dr. Nitsch ließ in einem externen Labor in Heidelberg einen Y2H analog zum von Stelzl et al. vorgestellten Verfahren durchführen. Dabei wurde die C-terminale intrazelluläre Domäne von PRG 2 als Köderprotein verwendet. Für die Beuteproteine wurden eine humane embryonale Expressionsdatenbank (20. Schwangerschaftswoche) und zwei murine embryonale Datenbanken (11. und 17. Tag der Embryonalentwicklung) verwendet. Es ergaben sich sechs potentielle Protein-Interaktionspartner von PRG 2: Radixin (murin), DDX 5, DCAF 8, BAT3 und Striatin 4 und ANKS1B (human).

1.4 Vorstellung der potentiellen Interaktionspartner

1.4.1 Radixin

Radixin bildet mit Ezrin und Moesin eine gemeinsame Proteinfamilie, im Weiteren ERMs genannt. Diese eukaryotischen zytoplasmatischen Proteine stellen eine Verbindung zwischen Phospholipiden und Proteinen der Zellmembran und dem Aktinkortex des Zytoskeletts her. ERMs zeichnen sich durch drei aufeinanderfolgende Domänen aus. Am N-terminalen Ende besitzen sie eine membranassoziierte FERM-Domäne (engl. four-point-one, ezrin, radixin, moesin) gefolgt von einer zentralen α -helikalen Region. Das C-terminale Ende, auch C-ERMAD (engl. C-terminal ERM-association domain) genannt, kann sowohl die FERM-Domäne als auch Aktinfilamente über die sogenannte ABD (engl. actin-binding domain) binden. ERMs spielen eine bedeutende Rolle während der Mitose und der Polarisierung von Epithelzellen [15].

Bei den ERMs wird ein aktiver und ein ruhender Konformationszustand unterschieden. Im zytoplasmatischen ruhenden Zustand werden die Bindungsstellen für Proteine der Zellmembran und Aktin durch eine intramolekulare Bindung der FERM-Domäne an die C-ERMAD blockiert. Die Aktivierung erfolgt über eine Bindung der FERM-Domäne an Membranbereiche, die reich an Phosphatidyl-Inositol 4,5-bisphosphat sind. Danach erfolgt die Phosphorylierung eines Threonin-Restes im C-ERMAD, wobei die Position der Phosphorylierungsstelle zwischen den ERMs variiert. Die Phosphorylierung kann durch unterschiedliche Phosphorylasen wie der Rho-Kinase oder der Proteinkinase C α erfolgen. Durch diese beiden Schritte sinkt die Affinität (Bindungsstärke) der FERM-Domäne für die C-ERMAD und Bindungsstellen für Aktin und Membranproteine werden freigegeben [16, 17].

Mintz et al. konnten 2003 die Expression von ERMs in neuronalen Fortsätzen in der Intermediärzone des embryonalen Kortex der Ratte nachweisen. In dieser Zone findet während der Entwicklung v.a. neuronale Migration und axonales Wachstum statt [18].

Desweiteren findet sich Radixin verstärkt in den cochleären und vestibulären Stereozilien von Mäusen. Ein homozygoter Radixin Knock-out, d.h. das Ausschalten der Genfunktion von Radixin, verursacht bei Mäusen einen tauben Phänotyp während die Vestibularfunktion uneingeschränkt bleibt. Das Fehlen von Radixin kann bei diesen Mäusen anscheinend teilweise durch Ezrin kompensiert werden, was eine funktionelle Redundanz der ERMs vermuten lässt [19].

1.4.2 DCAF 8

DCAF 8 (engl.: DDB1- and CUL4-associated factor 8; Synonym: WDR42A, engl.: WD repeat-containing protein 42A) ist ein Mitglied der Familie der WD40-repeat-Proteine, die ubiquitär, d.h. überall verbreitet in eukaryotischen Zellen sind. Das WD40-Motiv ist ein Proteinbereich von ca. 40 Aminosäuren Länge, der typischerweise mit einem Dipeptid bestehend aus Tryptophan (Abkürzung: W) und Aspartat (Abkürzung: D) endet. Die Domäne ist eine der zehn häufigsten Domänen im eukaryotischen Genom. In den WD40-repeat-Proteinen finden sich meist sieben Wiederholungen des namengebenden Motivs und die Domäne bildet eine zirkuläre β -Propeller-Struktur, die häufig aus sieben Blättern besteht [20, 21]. Während für die WD40-Domäne selbst bisher keine katalytische Aktivität nachgewiesen werden konnte, zeigte sich, dass Interaktionen mit Proteinen, Peptiden und DNA an drei verschiedenen Bereichen des β -Propellers möglich sind. So konnten sowohl in Hefezellen als auch im Menschen außergewöhnlich viele Interaktionen des WD40-Motivs mit anderen Proteinen nachgewiesen werden. Man geht davon aus, dass die WD40-Proteine als eine Plattform für die reversible Anordnung von Proteinkomplexen, also als Gerüstprotein dienen. Ihre Komplexität wird auch

deutlich durch die Vielzahl ihrer zellulären Funktionen wie Signaltransduktion, Organisation des Zytoskeletts und RNA-Prozessierung [22, 23].

Wu et al. charakterisieren DCAF 8 als ein Protein, das zwischen Nukleus und Zytoplasma hin und her pendelt und beschreiben spezifisch die Mechanismen des nukleären Im- und Exports von DCAF 8 [24].

Mehrere Publikationen deuten darauf hin, dass DCAF-Proteine Bestandteil des CUL4-DDB1-Ubiquitinligase-Komplexes sind. Dort dienen sie vermutlich als Verbindungsstruktur zwischen dem zu ubiquitinierenden Substrat und der Ubiquitin-Ligase CUL4-DDB1, die u.a. an DNA Reparatur und Transkription beteiligt ist [25]. Die Ubiquitinierung ist eine reversible posttranslationale Modifikation von Proteinen, die die zelluläre Verteilung, Funktion oder Aktivität des entsprechenden Enzyms beeinflusst. Das Ubiquitin-System dient u.a. der Steuerung des Zellzyklus und der Degradation von Proteinen durch Proteasome [26].

1.4.3 DDX 5

DDX 5 (Synonym: RNA Helikase p68) ist eine nukleäre RNA-Helikase von Eukaryoten und gehört zur Superfamilie der DEAD-Box-RNA-Helikasen. DEAD-Box steht für das charakteristische Motiv bestehend aus Aspartat-Glutaminsäure-Alanin-Aspartat. DDX 5 ist beteiligt am Spleißen und dem alternativen Spleißen von prä-mRNA zu mRNA im Zellkern. Desweiteren fungiert DDX 5 als Ko-Aktivatoren der Transkription durch den Östrogen-Rezeptor α . Außerdem reguliert es die Aktivität von Tumorsuppressor p53, einem Transkriptionsfaktor, der bei zellulärem Stress (z.B. DNS-Schädigung) Gene zur DNS-Reparatur oder der Apoptose aktiviert [27].

1.5 Zielsetzung

In einem ersten Schritt konnten mit dem genetischen Verfahren des Y2H sechs potentielle Protein-Interaktionspartner von PRG 2 identifiziert werden (fünf humane und ein murines Protein). Das Ziel der durchgeführten Arbeit war eine weitere Überprüfung der potentiellen Interaktionspartner von PRG 2 mittels biochemischer und immunhistochemischer Verfahren. Es ergeben sich folgende Aufgaben und Fragestellungen für die nachfolgenden Experimente:

- Welche potentiellen Protein-Interaktionspartner von PRG 2 aus dem Y2H können durch eine Ko-Immunpräzipitation bestätigt werden?
- Welche Proteine zeigen eine zerebrale Kolo-kalisierung mit PRG 2 in der Immunhistochemie bzw. Immunfluoreszenz?
- Welche möglichen Schlüsse lassen sich aus einem Interaktions-Nachweis ziehen?

- Welche weiteren Erkenntnisse konnten aus den funktionellen Folgeuntersuchungen (Cheng et al.) gewonnen werden?

Die potentiellen Protein-Interaktionen mit BAT 3, ANKS1B und Striatin 4 wurden nicht weiterverfolgt.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Antikörper

Primärantikörper

Antikörper	Verfahren	MG (murin)	Spender	Isotyp	Hersteller
PRG 2-CT 2	IP, WB und IHC	77 kDa	Kaninchen	Polyklonal, IgG	AG Nitsch
Radixin	IP und WB	69 kDa	Kaninchen	Monoklonal, IgG	Abcam, Cambridge, UK (ab 52495)
	IHC		Ziege	Polyklonal, IgG	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg (sc - 6408)
DDX 5	WB	69 kDa	Maus	Monoklonal, IgG	Cosmo Bio Co., Tokyo, Japan (2257C3a)
β -Actin	WB	42 kDa	Maus	Monoklonal, IgG	MP Biomedicals, Santa Ana, USA (691001)
	WB	42 kDa	Maus	Monoklonal, IgG	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA (MA5-15739)
DCAF 8	IP	46 kDa	Kaninchen	Polyklonal, IgG	Abcam, Cambridge, UK (ab 80629)

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Primärantikörper. IHC: Immunhistochemie, IP: Immunpräzipitation, MG: Molekulargewicht, WB: Western Blot

Sekundärantikörper

Antikörper	Verfahren	Kopplung an	Spender	Isotyp	Hersteller
Anti-Maus	WB	HRP	Ziege	Polyklonal, IgG	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA (115-035-003)
	IHC	Invitrogen™ Alexa Fluor® 568	Ziege	Polyklonal, IgG	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA (A-11004)
Anti-Kaninchen	WB	HRP	Esel	Polyklonal, IgG	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA (711-035-152)
	IHC	Invitrogen™ Alexa Fluor® 488	Esel	Polyklonal, IgG	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA (R37118)
	IHC	Invitrogen™ Alexa Fluor® 488	Ziege	Polyklonal, IgG	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA (R37116)
Anti-Ziege	IHC	Invitrogen™ Alexa Fluor® 568	Esel	Polyklonal, IgG	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA (A-11057)

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper. HRP: Meerrettichperoxidase (engl.: Horseradish Peroxidase), IHC: Immunhistochemie, WB: Western Blot

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Zellyse und Immunpräzipitation

cComplete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets von Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz (Produktnummer: 04693132001)

Chemikalien von Carl Roth, Karlsruhe: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) (fest), Natriumchlorid (NaCl), Magnesiumdichlorid (MgCl₂), Milchpulver (fettarm), Glycin, Salzsäure (HCl), Methanol, Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA), Agarose (low melt), Glycerin (Propan-1,2,3-triol), Isopropanol (2-Propanol), Kaliumchlorid (KCl), SDS (Natriumdodecylsulfat) ultra pure, Tween 20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat), Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat (Na(H₂PO₄) x 2 H₂O),

di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat ($\text{Na}_2(\text{HPO}_4) \times 2 \text{H}_2\text{O}$), Kaliumdihydrogenphosphat ($\text{K}(\text{H}_2\text{PO}_4)$), Dodecyl β -D-Maltosid (DDM), Dithiothreitol (DTT), Bromphenolblau-Natriumsalz, Ammoniumperoxodisulfat (APS), N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)

Triton® X-100 (Octoxinol 9) von Carl Roth, Karlsruhe (Bestellnummer: 3051.4) und Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA (Katalognummer: T8787)

Pierce™ Protein G Agarose von Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA (Katalognummer: 20398)

Pierce™ BCA Protein Assay Kit von Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA (Katalognummer: 23225)

BradfordUltra™ von Expedeon, Cambridgeshire, UK (Katalognummer: BFU1L)

Gelelektrophorese

Rotiphorese® Gel 30 (30% Acrylamid-/Bisacrylamid-Lösung im Verhältnis 37,5:1) von Carl Roth, Karlsruhe (Bestellnummer: 3029.2)

Page Ruler™ Prestained Protein Ladder von Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Western Blot und Proteindetektion

Roti®-Block von Carl Roth, Karlsruhe (Bestellnummer: A151.2)

Gelatine Pulver von VWR, Radnor, PA, USA (Katalognummer: 24360.233)

Albumin Bovine Fraction V (Bovines Serumalbumin) pH 7,0 von SERVA Electrophoresis, Heidelberg (Katalognummer: 11930.03)

Amersham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagent von GE Healthcare, Buckinghamshire, UK (Produktnummer: RPN2106)

SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate von Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA (Katalognummer: 34095)

Immunhistochemie

Normal Goat Serum Blocking Solution von Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA (Katalognummer: S-1000)

Normal Horse Serum Blocking Solution von Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA (Katalognummer: S-2000)

ProLong® Gold Antifade Mountant von Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA (Katalognummer: P36930)

DAPI von Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA (Katalognummer: D3571)

Histoacryl® von B. Braun, Melsungen (Artikelnummer: 9381104)

2.1.3 Puffer und Lösungen

Für die Herstellung aller Puffer und Lösungen wurde Reinstwasser aus einer Reinstwasseranlage verwendet (Milli-Q Plus von Millipore).

Zellyse und Immunpräzipitation

0,5 M TRIS-HCl (pH 7,4): 30,3 g TRIS (fest), auffüllen auf 400 ml mit H₂O, pH mit Salzsäure auf 7,4 adjustieren, mit H₂O auf 500 ml auffüllen

RIPA-Lysepuffer: 50 mM TRIS-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % Triton® X-100, 0,1 % SDS

ONYX-Lysepuffer: 20 mM TRIS-HCl pH 7,4, 135 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 10 % Glycerin, 1,5 % DDM

Proteaseinhibitor-Stammlösung (25fach): Jeweils eine Tablette cOmplete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche) wurde in 2 ml Lysepuffer (ohne Detergenz) aufgelöst. Die Stammlösung wurde zu je 400 µl aliquotiert und bei -20° Celsius gelagert. Unmittelbar vor Gebrauch des Lysepuffers wurden 400 µl dieser Stammlösung zu je 10 ml Lysepuffer hinzugefügt.

Gelelektrophorese

1 M TRIS-HCl (pH 6,8): 60,6 g TRIS (fest), auffüllen auf 400 ml mit H₂O, pH mit Salzsäure auf 6,8 adjustieren, mit H₂O auf 500 ml auffüllen

1 M TRIS-HCl (pH 8,8): 60,6 g TRIS (fest), auffüllen auf 400 ml mit H₂O, pH mit Salzsäure auf 8,8 adjustieren, mit H₂O auf 500 ml auffüllen

APS (10%): 100 mg Ammoniumperoxodisulfat, auffüllen auf 1 ml mit H₂O

Ladepuffer (5fach): 5 ml Glycerin, 2,5 ml 1 M TRIS-HCl pH 6,8, 1 g SDS, 0,77 g DTT, auffüllen auf 10 ml mit H₂O und Zugabe von 20 mg Bromphenolblau-Natriumsalz

Laufpuffer (10fach): 30,3 g TRIS (fest), 144 g Glycin, 10 g SDS, auffüllen auf 1 l mit H₂O, vor Verwendung 1:10 mit H₂O verdünnen

Trenngel (10%): 4,2 ml H₂O, 3,4 ml 30% Acrylamid, 2,5 ml 1M TRIS-HCl pH 8,8, 100 µl 10% APS, 10 µl TEMED

Sammelgel (5%): 3,45 ml H₂O, 830 µl 30% Acrylamid, 630 µl 1M TRIS-HCl pH 6,8, 50 µl 10% APS, 5 µl TEMED

Western Blot und Proteindetektion

Blotpuffer: 3,03 g TRIS (fest), 14,4 g Glycin, 150 ml Methanol, auffüllen auf 1 l mit H₂O

PBS (10fach, pH 7,4): 160 g NaCl, 4 g KCl, 23 g Na₂(HPO₄) x 2 H₂O, 2 g K(H₂PO₄), auffüllen auf 1,9 l mit H₂O, pH mit Salzsäure auf 7,4 adjustieren, mit H₂O auf 2 l auffüllen, vor Verwendung 1:10 mit H₂O verdünnen

PBST (10fach, pH 7,4): 10 ml Tween 20 zu 1,999 l PBS (10fach) hinzufügen

Magermilch-PBST (10%): 5 g Magermilchpulver, auffüllen auf 50 ml mit PBST

Gelatine-PBST (5%): 2,5 g Gelatinepulver, auffüllen auf 50 ml mit PBST

BSA-PBST (1%): 1 g Bovines Serumalbumin, auffüllen auf 100 ml mit PBST

ROTI®-Block-Arbeitslösung: 10 ml ROTI®-Block-Konzentrat auf 100 ml mit H₂O auffüllen

Immunhistochemie

0,1 M PB (pH 7,4): Stammlösung A (0,2 M): 71,2 g Na₂(HPO₄) x 2 H₂O auf 2 l mit H₂O auffüllen, Stammlösung B (0,2 M): 31,2 g Na(H₂PO₄) x 2 H₂O auf 1 l mit H₂O auffüllen, 810 ml Stammlösung A und 190 ml Stammlösung B vermischen und auf 1,9 l mit H₂O auffüllen, pH mit Salzsäure auf 7,4 adjustieren und auf 2 l mit H₂O auffüllen

NGS-Lösung (5%): 500 µl Normal Goat Serum auf 10 ml mit 0,1 M PB auffüllen

NHS-Lösung (5%): 500 µl Normal Horse Serum auf 10 ml mit 0,1 M PB auffüllen

Triton-PB (0,5%): 50 µl Triton® X-100 auf 10 ml mit 0,1 M PB auffüllen

Agarose-Lösung (4%): 4 g Agarose Low Melt auf 100 ml mit H₂O auffüllen und auf 100° Celsius erhitzen bis sich das Agarosepulver vollständig gelöst hat

2.1.4 Geräte und andere Materialien

Reinstwasseranlage Ultra-pure Water Purifier Milli-Q Plus von Millipore, Eschborn (?)

Homogenisator Precellys® 24 von PEQLAB Biotechnologie, Erlangen

Zirconiumoxidkugeln (Keramikkugeln) 1,4 mm von Bertin Corp., Rockville, MD, USA
(Katalognummer: 03961-1-103)

Rotator Mixer RM-Multi 1 von Starlab, Hamburg (Katalognummer: N2400-5000)

Schüttelapparat Typ 3011 und 3019 von GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel

Magnetrührer MR Hei-Tec und MR Hei-Mix S von Heidolph Instruments, Schwabach
(Bestellnummer: 505-30000-00 und 503-02000-00)

Magnetrührstäbchen von VWR, Radnor, PA, USA

Elektronische Analysenwaage ALC-810.2 von Acculab Sartorius AG, Göttingen

pH-Einstabmesskette Blue line 14 pH von SI Analytics, Mainz (kalibriert in 3 M Kaliumchlorid-
Lösung) (Bestellnummer: 285129147)

Vortex-Genie 2 von Scientific Industries, Bohemia, NY, USA

Multimode microplate reader Infinite® 200 PRO und Software i-control™ (1.10) von Tecan,
Männedorf, Schweiz

Mini-PROTEAN® Tetra System, Glasplatten für Gele Mini-PROTEAN® System,
Probenkämme und Spatel von Bio-Rad, Hercules, CA, USA

TransBlot® SD Semi-Dry Transfer Cell von Bio-Rad, Hercules, CA, USA

Criterion™ Blotter von Bio-Rad, Hercules, CA, USA

Nitrozellulosemembran 0,45 µm von Bio-Rad, Hercules, CA, USA

Whatman® gel blotting paper (Grade GB003) von Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

ThermoMixer® comfort von Eppendorf, Hamburg

Electrophoresis power supply Consort EV202 von Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Röntgenkassetten von Dr. Goos-Suprema, Heidelberg

Universalfilm Super RX von Fujifilm, Tokio, Japan (Katalognummer: 4741019230)

Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine Agfa CP1000 von Agfa-Gevaert, Mortsel, Belgien

Fusion FX7™ AdvanceMulti-Imagingsystem und Software Fusion-CAPT™ Advance FX7 von
PEQLAB Biotechnologie, Erlangen

Heraeus Fresco 21 Centrifuge von Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Mechanische Einkanalkolbenpipetten Research plus von Eppendorf, Hamburg

Microm HM 650 V Vibration microtome von Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Einbettenschälchen Peel-A-Way® von Polysciences, Warrington, PA, USA (Katalognummer: 18646A)

Objektträger von VWR, Radnor, PA, USA (Katalognummer: 631-1553)

Deckgläser 24 x 50 mm Stärke 1 von Thermo Fisher Scientific Gerhard Menzel, Braunschweig (Katalognummer: BBAD02400500#A1)

Leica TCS SP5 Confocal / DM 6000 Mikroskop mit LAS-AF Software von Leica microsystems, Wetzlar

Objektiv zur 40fachen Vergrößerung HCX PL APO CS 40x Oil (NA 1,25) von Leica microsystems, Wetzlar (ID-Nummer: N°11506251)

Objektiv zur 63fachen Vergrößerung HCX PL APO lambda blue 63x Oil (NA 1,4) von Leica microsystems, Wetzlar (ID-Nummer: N°11506192)

Pipetus® Akku-betriebene Pipettierhilfe von Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt (Codenummer: 9907200)

Glaswaren (z.B. Flaschen) von Schott, Mainz

Pipettenspitzen ohne Filter von StarLab, Hamburg

Zellkulturschalen / 96-Well-Mikrotiterplatten / 12-Well-Platten Greiner CELLSTAR®, Reaktionsgefäße (1,5 / 2 / 15 / 50 ml) und serologische Pipetten von Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation der murinen Gehirne

Es wurden Gehirne von Mäuseembryonen der Gattung *Mus musculus* vom Wildtyp verwendet. Für die Herstellung der Zelllysate erfolgte die Präparation der Gehirne zwischen dem 16. und 18. Tag der Embryonalentwicklung. Zunächst wurde das zervikale Rückenmark der Muttertiere durchtrennt und das Abdomen sowie der Uterus des Muttertieres eröffnet. Die Embryonen wurden entnommen und in einer Petrischale auf Eis gekühlt. Nacheinander wurden die Embryonen dekapitiert und der Kopf mit Hilfe einer Pinzette in den Orbitae fixiert. Danach wurde der Schädel durch einen fronto-okzipital und zwei temporo-okzipital verlaufende Schnitte eröffnet. Im Anschluss wurde zunächst mit einem kleinen Spatel das gesamte Gehirn herausgelöst.

Für die Herstellung der Zelllysate wurde entweder das gesamte embryonale Gehirn oder nur Cortex und Hippocampus, die Bereiche mit der stärksten PRG 2-Exprimierung, verwendet. Dafür wurden die beiden Strukturen aus dem Gesamthirn herauspräpariert. Direkt nach der Präparation wurden das gesamte Gehirn bzw. der Hippocampus und der Cortex eines Embryos in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Präparate wurden entweder direkt weiterverarbeitet oder für eine spätere Verwendung unmittelbar in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Aufbewahrung erfolgte bei - 80° Celsius.

2.2.2 Zellaufschlussverfahren und Solubilisierung

Das Zellaufschlussverfahren bzw. die Zellyse dient dem Aufbrechen zellulärer Strukturen um an deren Inhalt - wie z.B. Zellorganellen, Proteine oder DNA - zu gelangen. Bei den physikalischen Zellaufschlussverfahren lassen sich mechanische und nicht-mechanische Aufschlussverfahren unterscheiden. Bei mechanischen Aufschlussverfahren führen Druck- und Scherbeanspruchungen zum Aufreißen der Zellmembranen wobei Wärme als Nebenprodukt entsteht. Um einen zu starken Temperaturanstieg, der zur Denaturierung von Proteinen führen kann, zu vermeiden, muss während des Aufschlussverfahrens eine kontinuierliche Kühlung erfolgen [28].

Nach dem Aufschluss der Zelle befinden sich die Proteine in einer unphysiologischen Umgebung und müssen daher vor Inaktivierung, Denaturierung und Proteolyse, d.h. enzymatische Verdauung durch sogenannte Proteasen, geschützt werden. Zur Vermeidung von Proteolyse durch bspw. Serin- oder Cysteinproteasen nutzt man Proteaseinhibitoren.

Die Molarität des verwendeten Puffers sollte möglichst dem natürlichen Zellmilieu entsprechen und lag bei den eingesetzten Puffern zwischen 135 und 150 mM. Eine zu geringe Ionenstärke des Lösungsmediums kann außerdem zu einer Anlagerung von Proteinen aneinander oder an Zelltrümmer führen (Debye-Hückel-Theorie).

Außerdem ist auf einen konstanten pH-Wert zu achten, wofür Puffer auf Basis einer TRIS-Lösung (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan) mit einem pH-Wert von 7,4 eingesetzt wurden.

Chelatoren, z.B. EDTA oder EGTA, bilden Komplexe mit Metallionen wie zweiwertigem Calcium oder zweiwertigem Magnesium. Durch das Abfangen dieser zweiwertigen Kationen wird eine Aktivierung von Metalloproteasen verhindert. Eine Oxidation von Thiolgruppen, die häufige funktionelle Gruppen von Proteinen sind, wird durch die Verwendung von bspw. Dithiothreitol (DTT) unterbunden. Um hydrophobe Wechselwirkungen in dem Zelllysate zu verhindern, werden nichtionische Detergenzien wie z.B. Triton X-100 eingesetzt.

Eine besondere Herausforderung ist die Solubilisierung von integralen Membranproteinen wie PRG 2, d.h. das Herauslösen von transmembranären Proteinen aus der Zellmembran. Für die

Solubilisierung benötigt man amphiphile Seifen bzw. Detergenzien. Diese bestehen aus hydrophoben Anteilen z.B. Steroidgerüste, aliphatische Ketten oder Phenylderivate, und aus hydrophilen Anteilen, z.B. Sulfatgruppen. Die hydrophoben Bestandteile der Seife lagern sich an die lipophilen, d.h. vor allem an die transmembranären Bereiche des Proteins an, und verdrängen dabei Phospholipide der Zellmembran. Wenn sich eine ausreichende Anzahl von Seifenmolekülen an das Membranprotein angelagert haben, geht es in Lösung über und es entsteht ein Komplex aus Detergenz, Phospholipiden und dem gelösten Membranprotein [29] (s. Abb. 3).

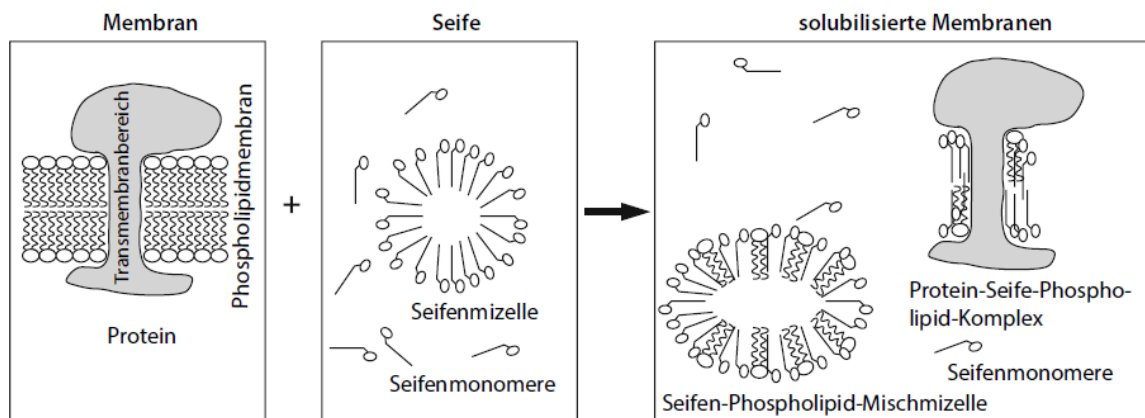


Abb. 3: Schema zur Solubilisierung von integralen Membranproteinen. Um ein Transmembranprotein aus der Phospholipid-Doppelschicht der Zellmembran herauszulösen benötigt man amphiphile Seifen. Die Seifenmonomere lagern sich an das Membranprotein an und überführen es hierdurch in Lösung [29, S. 119].

Für die nachfolgenden Experimente wurde eine mechanische Zellyse mit Hilfe von Keramikugeln (Durchmesser 1,4 mm) durchgeführt. Das embryonale Gehirn wurde je nach Gewicht in 600 bis 1000 µl Lysepuffer aufgenommen. Es wurde entweder RIPA-Lysepuffer mit dem nichtionischen Detergenz Triton X-100 oder ONYX-Lysepuffer mit dem nichtionischen Detergenz DDM verwendet. Das Triton X-100 lag in einer Konzentration von 1%, das DDM mit 1,5 % vor. Zu 10 ml Lysepuffer wurden 400 µl einer 25fachen Proteaseinhibitor-Stammlösung (cOmplete EDTA-free von Roche) hinzugegeben. Die Homogenisierung erfolgte im Homogenisator (Precellys® 24 von PEQLAB) für zweimal 20 Sekunden bei 5000 rpm und 4° Celsius. Anschließend wurde das homogenisierte Zellmaterial von den Keramikugeln getrennt und für 40 Minuten bis zu einer Stunde auf Eis inkubiert. Danach wurde das Zellmaterial zehn Minuten bei 13.000 rpm und 4° Celsius zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde verworfen und der Überstand, der die solubilierten Membranproteine enthält, in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.2.3 Quantifizierung der Proteinkonzentration

Die quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration der Zelllysate erfolgte photometrisch bzw. kolorimetrisch unter Verwendung des Bradford- oder des BCA-Tests.

Beim Bradford-Test bindet der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 im sauren Milieu an Proteine, wodurch sich das Absorptionsmaximum der Farbe von 465 nm ohne Protein auf 595 nm mit Protein verschiebt. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist dabei ein Maß für die Proteinkonzentration einer Lösung [30]. Es wurden dreimal 100 µl Lysat (1:500 verdünnt) mit je 100 µl BradfordUltra™-Lösung (Expedeon) durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vermischt und auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen. Nach dem gleichen Verfahren wurde zweimal ein BSA-Standard mit Konzentrationen von 0, 1, 5, 10, 20, 50 und 100 µg/ml aufgetragen. Danach wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen, die Mittelwerte der Extinktionen berechnet und die Proteinkonzentration des Lysats durch den Vergleich mit dem BSA-Standard bestimmt.

Beim BCA-Test nutzt man die Biuretreaktion, bei der Proteine in alkalischer Lösung mit zweiwertigen Kupferionen einen Komplex bilden. Dabei werden die zweiwertigen Kupferionen zu einwertigen Kupferionen reduziert. Durch die Chelatbildung von zwei Molekülen Bicinchoninsäure (engl.: bicinchoninic acid, BCA) mit einem einwertigen Kupferion entsteht ein violetter wasserlöslicher Farbkomplex. Dieser Farbkomplex weist bei einer Wellenlänge von 562 nm eine starke Absorption auf, die nahezu linear mit zunehmender Proteinkonzentration ansteigt [31].

Es wurden dreimal 25 µl Lysat (1:100 verdünnt) mit je 200 µl Arbeitsreagenz (bestehend aus 50 Teilen Reagenz A und 1 Teil Reagenz B) in einer Mikrotiterplatte auf dem Schüttler für 30 Sekunden vermischt. Nach dem gleichen Verfahren wurde zweimal ein BSA-Standard mit Konzentrationen von 0, 50, 100, 250, 350, 500, 600 und 750 µg/ml aufgetragen. Anschließend wurde bei 37° Celsius für 30 Minuten schüttelnd inkubiert. Nach dem Abkühlen der Platte auf Raumtemperatur wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen, die Mittelwerte der Extinktionen berechnet und die Proteinkonzentration des Lysats durch den Vergleich mit dem BSA-Standard bestimmt.

2.2.4 Ko-Immunpräzipitation

Bei der Ko-Immunpräzipitation werden mit Hilfe von an Sepharose gebundenen Antikörpern Interaktionen zwischen Proteinen nachgewiesen. Dazu wird zunächst ein Zelllysate unter möglichst nicht-denaturierenden Bedingungen hergestellt (s. 3.2.2. Zellaufschlussverfahren und Solubilisierung), das die beiden potentiellen Protein-Interaktionspartner enthält. Durch die Bindung eines spezifischen Antikörpers an mit Protein G beschichtete Sepharose-Kügelchen

entsteht eine stationäre Phase. Sepharose (engl.: **S**eparation-**P**harmacia-**A**garose) ist der Handelsname für quervernetzte Agarose, ein Polysaccharid aus D-Galactose und 3,6-Anhydro-L-Galactose, die glykosidisch miteinander verbunden sind.

Protein G ist ursprünglich ein Zellwandprotein von Streptokokken der Gruppe G. Für die Biotechnologie wird ein rekombinantes Protein G in *E. coli* Bakterien synthetisiert, das mit hoher Spezifität die Fc-Teile (kristallisierbares Fragment, engl.: crystallisable) der meisten Säugetier-Immunglobuline binden kann ohne wie das native Protein G unspezifisch an Albumin und/oder Zelloberflächen zu binden.

Durch die stationäre Phase werden das Protein/Antigen, gegen das der Primärantikörper gerichtet ist, und seine Interaktionspartner präzipitiert und können im Anschluss durch Gelelektrophorese und Western Blot nachgewiesen werden.

Für die Ko-Immünpräzipitationen wurden zwischen 200 µg und 1 mg Protein aus dem Zelllysat verwendet. Zuerst wurde das Lysat mit 25-50 µl Protein G (50-100 µl der 50%igen Pierce™ Protein G Agarose Lösung) vermischt, auf ein Reaktionsvolumen von ca. 600 µl mit kaltem Lysepuffer aufgefüllt und für eine Stunde bei 4° Celsius schüttelnd inkubiert. Dieser Schritt, der als Preclearing (Aufreinigen) bezeichnet wird, dient der Eliminierung von Proteinen und anderen Zellbestandteilen, die unspezifisch an Protein G und/oder die quervernetzte Agarose binden. Nach der Inkubation mit Protein G wurden die Proben für 4 Minuten bei 4° Celsius und 13.000 rpm zentrifugiert. Das Agarosepellet wurde verworfen, der Überstand wird im Weiteren als Precleared (aufgereinigtes Lysat) bezeichnet.

Zum Präzipitieren wurden zwei verschiedene Methoden verwendet: Bei der indirekten Methode bindet das Protein zuerst an den Antikörper und in einem zweiten Schritt bindet der Antigen-Antikörper-Komplex an Protein G und Sepharose. Hierfür wurde die gewünschte Menge Protein zunächst mit dem Antikörper (5 bis 10 µg) und 500 µl Lysepuffer bei 4° Celsius schüttelnd für 1 Stunde oder über Nacht inkubiert. Im Anschluss wurden 25 µl Protein G (50 µl der 50%igen Pierce™ Protein G Agarose Lösung) hinzugefügt und erneut für 1 Stunde bei 4° Celsius schüttelnd inkubiert.

Bei der direkten Methode wird der Antikörper zunächst an Protein G und Sepharose gebunden und danach das Antigen hinzugefügt. Dafür wurden der Antikörper (1 bis 10 µg) und 25 µl Protein G (50 µl der 50%igen Pierce™ Protein G Agarose Lösung) mit 500 µl Lysepuffer vermischt und für 1 Stunde bei 4° Celsius schüttelnd inkubiert. Danach wurde für 2 Minuten bei 8.000 rpm und 4° Celsius zentrifugiert und das entstandene Agarosepellet mit 500 µl Lysepuffer resuspendiert/gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (2 Minuten, 8.000 rpm, 4° Celsius) wurde die gewünschte Menge Protein auf das Antikörper-Agarose-Pellet aufgetragen,

500 µl Lysepuffer hinzugefügt und für 1 Stunde oder über Nacht bei 4° Celsius schüttelnd inkubiert.

Bei beiden Methoden sollte nach der Inkubation das Protein einschließlich seiner Interaktionspartner an den Antikörper und der Antikörper über Protein G an die quervernetzte Agarose gebunden und präzipitiert sein. Das durch Zentrifugation für 2 Minuten bei 13.000 rpm und 4° Celsius entstandene Agarosepellet besteht folglich aus diesen Komponenten. Im Überstand, der als Flow-through bezeichnet wird, verbleiben Proteine, die nicht an den Antikörper oder das Antigen gebunden sind.

Durch mehrere Waschschrte wird das Agarosepellet gereinigt. Hierfür wurde das Agarosepellet fünfmal in je 500 µl Lysepuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert (1-2 Minuten, 13.000 rpm, 4° Celsius). Nach dem letzten Waschschrte wurde das Agarosepellet in Lysepuffer resuspendiert. Die entstandene Lösung wird als Eluat bezeichnet. Das Eluat und die anderen Proben (Lysat, Precleared, Flow-through) wurden im Verhältnis 5:1 mit dem Ladepuffer vermischt (z.B. 32 µl Probe und 8 µl Ladepuffer) und 5 Minuten auf 95° Celsius erhitzt. Durch das hoch konzentrierte SDS im Ladepuffer und das Erhitzen werden die im Eluat enthaltenen Proteine (Antikörper, Protein G, Protein-Interaktionspartner) denaturiert, d.h. sie gehen in ihre Primärstruktur über und lösen sich voneinander und von der Agarose. In der darauffolgenden Gelelektrophorese wurden die Proteine aus den Proben der Größe nach aufgetrennt und danach immunologisch detektiert.

Als Negativkontrollen wurden Immunpräzipitationen nach dem identischen Verfahren allerdings ohne Zugabe eines Antikörpers durchgeführt. Im Western Blot sollte im Eluat der Negativkontrolle weder das Antigen noch potentielle Interaktionspartner nachweisbar sein, da dies bedeuten würde, dass diese Proteine unspezifisch an Protein G oder Agarose binden.

Zudem wurde im Western Blot β -Actin als sogenanntes Housekeeper-Protein immunologisch detektiert. Als Bestandteil des Zytoskeletts ist β -Actin ubiquitär in Zellen enthalten. Im Zelllysat und im Precleared sollte β -Actin nachweisbar sein. Das β -Actin-Signal dient als Ladekontrolle. Auch im Flow-through kann noch eine geringe Menge β -Actin vorhanden sein. Im Eluat sollte kein β -Actin sondern nur das Antigen und sein Interaktionspartner nachzuweisen sein. Da β -Actin nicht spezifisch an die stationäre Phase gebunden wird, sollte es durch die wiederholten Waschschrte aus dem Agarosepellet entfernt werden.

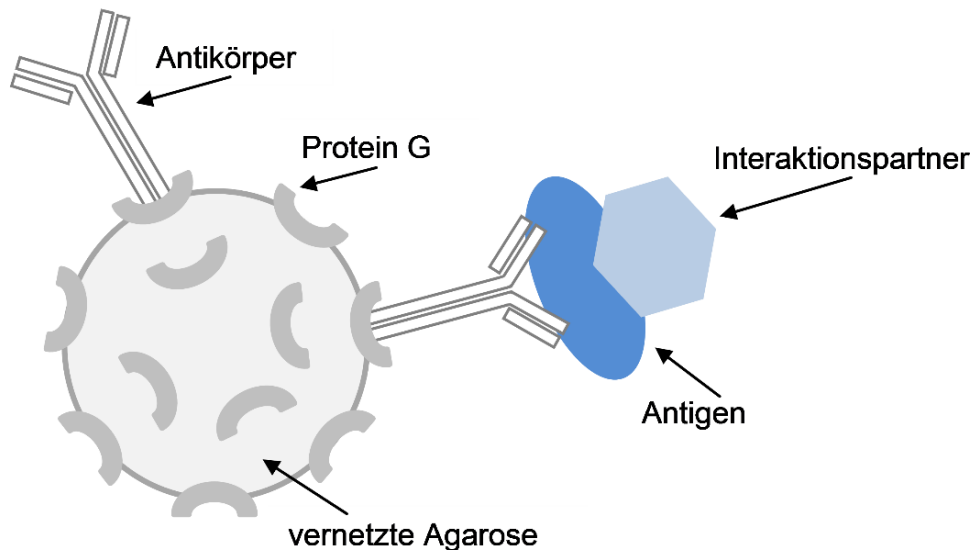


Abb. 4: Schema der Ko-Immünpräzipitation. Protein G ist an die quervernetzte Agarose in Form von kleinen Kugeln gebunden. Das Fc-Fragment des verwendeten Antikörpers bindet über Protein G an die Agarose. Gleichzeitig bindet das Fab-Fragment des Antikörpers an ein bestimmtes Antigen. Wenn das Antigen an einen Interaktionspartner gebunden ist, werden beide durch die stationäre Phase präzipitiert [eigene Darstellung].

2.2.5 Eindimensionale Gelelektrophorese

Bei der Elektrophorese werden geladene Moleküle (z.B. Proteine) einem elektrischen Feld ausgesetzt. Aufgrund ihrer Ladung und ihrer Größe haben alle Moleküle eine unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeit.

Es wurde eine eindimensionale vertikale SDS-PAGE nach Lämmli durchgeführt, die die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht ermöglicht. Dabei wird das anionische Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) verwendet, das zweifach negativ geladene Sulfatgruppen aufweist und Proteine denaturiert, d.h. ihre Sekundär- und Tertiärstruktur zerstört. Das in hoher Konzentration im Ladepuffer vorhandene SDS sättigt alle Proteine der Probe mit gleichmäßig verteilten negativen Ladungen ab und das enthaltene DTT führt zur Spaltung von Disulfidbrücken.

Vor dem Auftragen auf das Polyacrylamidgel werden die Proben zudem für fünf Minuten auf 95° Celsius erhitzt, wodurch Proteine ebenfalls denaturiert werden. Es entsteht ein SDS-Protein-Komplex, in der die Proteine in ihrer Primärstruktur und nach außen einheitlich negativ geladen vorliegen. Bei der Elektrophorese wird ein Spannungsfeld angelegt und die Proteine wandern entsprechend ihrer negativen Ladung von der Kathode (-) zur Anode (+). Die Laufgeschwindigkeit des Proteins während der Elektrophorese ist durch die Zugabe des SDS nur noch von der Größe des Proteins und nicht mehr von seiner Ladung abhängig.

Das polymerisierte Acrylamid des Elektrophoresegels bildet eine Matrix mit Poren. Je größer ein Protein ist, desto langsamer bewegt es sich durch die poröse Gelmatrix entlang des

Spannungsgradienten während der Elektrophorese. Proteine mit geringem Molekulargewicht bewegen sich dagegen schneller durch das Gel [32].

Da die hier untersuchten Proteine ein Molekulargewicht zwischen 30 und 120 kDa aufweisen, wurden 10%ige Polyacrylamidgels verwendet.

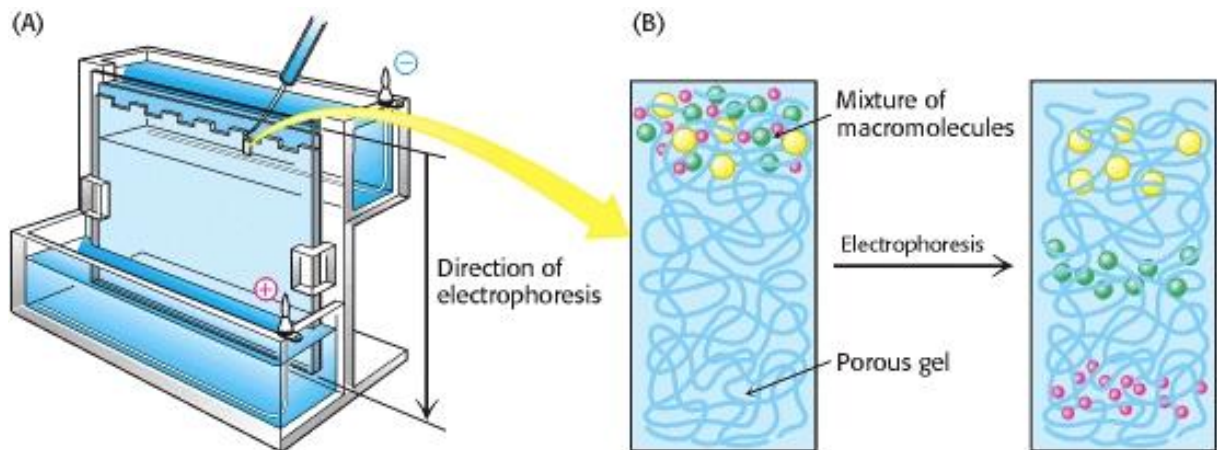


Abb. 5: Prinzip der SDS-PAGE. (A) Gelelektrophorese-Kammer mit Laufpuffer. Die Taschen des Polyacrylamidgels werden mit Hilfe einer Pipette mit den Proben gefüllt. Danach wird der Deckel der Gelkammer befestigt und eine Spannung angelegt. Die negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe bewegen sich dabei auf die Anode (+) im unteren Bereich des Gels zu. (B) Die in der Probe enthaltenen Proteine bewegen sich durch die poröse Gelmatrix in Richtung der Anode, wobei die kleinsten Proteine am schnellsten wandern [33, Figure 4.7].

Bei der Durchführung der SDS-PAGE erfolgte zuerst die Herstellung des SDS-haltigen Ladepuffers (5fach):

- 5 ml Glycerol
 - 2,5 ml 1M TRIS-HCl pH 6,8
 - 1 g SDS
 - 0,77 g DTT
- In einem Reaktionsgefäß vermischen und auf 10 ml mit H₂O auffüllen

Anschließend erfolgte die Zugabe von 20 mg Bromphenolblau. Die blaue Färbung der Proben erleichtert das Befüllen des Gels und dient der Kennzeichnung der Laufmittelfront während der Elektrophorese. Danach wurde der Ladepuffer in Reaktionsgefäßen zu je 1 ml aliquotiert.

Anschließend erfolgte die Herstellung des 10%igen Trenngels (pH 8,8):

4,2 ml H₂O

3,4 ml 30% Acrylamid

2,5 ml 1M TRIS-HCl pH 8,8

100 µl 10% APS



In einem Reaktionsgefäß unter dem Abzug
vermischen und schwenken

Danach wurden unter dem Abzug 10 µl TEMED, das die Polymerisation des Acrylamids in dem Gemisch initiiert, hinzugegeben und die Lösung durch Schwenken vermischt. Im Anschluss wurde die Lösung zügig mit einer Pipette zwischen zwei Mini-PROTEAN®-Glasplatten (Bio-Rad) gefüllt. Danach wurde das Trenngel mit einigen Millilitern 70%igem Isopropanol versiegelt, um einerseits einen ebenmäßigen Gelrand zu erzeugen, und andererseits das Austrocknen der Geloberfläche zu verhindern. Nach 20 Minuten ist das Trenngel vollständig polymerisiert, das Isopropanol wurde abgegossen und etwaige Rückstände des Isopropanols zwischen den Glasplatten wurden vorsichtig mit einem Zellstofftuch aufgenommen.

Nun erfolgte die Herstellung des 5%igen Sammelgels (pH 6,8):

3,45 ml H₂O

830 µl 30% Acrylamid

630 µl 1M TRIS-HCl pH 6,8

50 µl 10% APS



In einem Reaktionsgefäß unter dem Abzug
vermischen und schwenken

Zuletzt wurden unter dem Abzug 5 µl TEMED hinzugegeben, das Gemisch kurz geschwenkt und dann zügig mit einer Pipette oberhalb des Trenngels aufgetragen. Direkt im Anschluss wurde ein Probenkamm mit zehn Taschen für je 50-100 µl in das Sammelgel eingebracht und das Gel erneut für 20 Minuten polymerisiert.

Die hier aufgeführten Mengen wurden zur Herstellung von zwei Mini-Gelen, d.h. von jeweils zwei Tren- und Sammelgelen verwendet. Die fertigen Gele wurden in die dafür vorgesehene Befestigung der Mini-PROTEAN® Tetra Cell Elektrophoresekammer (Bio-Rad) eingespannt und das Behältnis bis knapp unterhalb des Sammelgels mit Laufpuffer gefüllt.

Die abgekühlten Proben (30-50 µl) wurden in die Taschen des Sammelgels pipettiert und zusätzlich 5 µl eines Protein-Markers als Größenstandard in eine separate Tasche auf das Sammelgel aufgetragen. Der hier verwendete Marker enthält zehn farbstoffgekoppelte Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 10 und 180 kDa. Er dient der Überwachung des Verlaufs der SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese, zur Beurteilung der Übertragung von Proteinen auf Membranen während des Western Blots und zur Abschätzung der ungefähren Größe von separierten Proteinen, die mit Nachweisreagenzien sichtbar gemacht wurden.

Schließlich wurde das Mini-PROTEAN® Tetra Cell-Behältnis vorsichtig vollständig mit Laufpuffer gefüllt. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei 80 Volt in den ersten 15 Minuten und anschließend für 35 bis 40 Minuten bei 200 Volt. Dabei wurde der Fortschritt der Proteinausbreitung anhand des farbigen Markers und der blauen Laufmittelfront überprüft und ggf. erfolgte eine längere oder kürzere Elektrophorese. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde der Laufpuffer abgegossen, die Glasplatten mit den Polyacrylamidgelen entnommen und die Gele vorsichtig mit Hilfe eines speziellen Spatels aus den Glasplatten herausgelöst. Dabei wurde das Sammelgel mit dem Spatel abgetrennt und das Trenngel zurechtgeschnitten.

2.2.6 Western Blot

Beim Western Blot erfolgt ein elektrophoretischer Transfer von Proteinen aus einem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran. Diese Membranen binden Proteine über hydrophobe Wechselwirkungen und verfügen über eine hohe Proteinbindungskapazität, so dass auch kleinste Peptide adsorbiert werden können. Die Übertragung der Proteine erfolgt senkrecht zum Gel auf die Membran und analog zur SDS-Page von der Kathode (-) zur Anode (+) [34].

Der Western Blot erfolgte entweder nach dem Semi-Dry Transfer-Verfahren oder nach dem Tank-Blot (Wet-Blot) -Verfahren. Die Übertragungseffizienz wurde durch Anfärbung der Polyacrylamidgele nach dem Western Blot in einer 0,2% Coomassie-Lösung überprüft. Bei beiden Verfahren konnten nach dem Blotten keine Proteine mehr im Gel nachgewiesen werden.

Bei beiden Verfahren wurden zunächst zwei Filterpapiere und eine Nitrozellulosemembran auf die Größe des Gels zugeschnitten. Die Membran wurde zunächst für einige Minuten in destilliertem Wasser äquilibriert. Danach wurden Nitrozellulosemembran, Filterpapiere, Schwämme und das Polyacrylamidgel für zehn Minuten in Blotpuffer äquilibriert.

Beim Semi-Dry Verfahren erfolgte die Anordnung auf der Anodenplatte des Trans-Blot® SD Semi-Dry Cell (Bio-Rad) von unten nach oben wie folgt: Schwamm, Filterpapier,

Nitrozellulosemembran, Polyacrylamidgel, Filterpapier, Schwamm. Nachdem mit einem Handroller von innen nach außen überschüssiger Puffer und Luftblasen aus dem Blotsandwich entfernt wurden, wurde die Kathodenplatte auf die Anordnung gelegt und das Gerät verschlossen. Ein Trans-Blot® SD-Gerät wurde mit maximal vier Gelen beladen und die Übertragung erfolgte bei vier Gelen bzw. Membranen bei 400 Milliampere (zwei Gele bei 220 Milliampere/ein Gel bei 110 Milliampere) über 90 Minuten.

Beim Tank-Blot Verfahren wurden die Bestandteile in der obengenannten Reihenfolge und nach dem sorgfältigen Ausstreichen von Luftblasen in das Gitter des Criterion™ Blotters (Bio-Rad) eingespannt. Das Gitter wurde in den mit gekühltem Blotpuffer gefüllten Tank eingehängt und ein Rührfisch in den Tank gegeben. Der Tank-Blot wurde auf einem Magnetrührer auf niedriger Stufe und mit einem Kühlelement im Tank, um eine Erwärmung des Blotsandwiches zu vermeiden, bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Übertragung erfolgte bei 100 Volt über 90 Minuten.

2.2.7 Immundetektion

Zum Nachweis der Proteine auf der Nitrozellulosemembran wurde eine Immundetektion durchgeführt. Um ein unspezifisches Binden der verwendeten Antikörper zu vermeiden, muss die Membran zunächst geblockt werden, d.h. die unspezifischen Proteinbindungsstellen werden durch ein Blockmittel abgesättigt. Danach erfolgt die Inkubation mit dem Primärantikörper, d.h. mit dem gegen das spezifische Antigen z.B. PRG 2 gerichteten Antikörper. Nach mehrmaligem Waschen folgt die Zugabe des Sekundärantikörpers, der gegen den Fc -Teil (kristallisierbare Region des Immunglobulins, engl.: crystallizable) des Primärantikörpers gerichtet ist. Der Sekundärantikörper ist außerdem an eine Peroxidase, meistens an die Meerrettichperoxidase gekoppelt, die im letzten Schritt der Proteindetektion die Chemilumineszenzreaktion katalysiert. Bei der ECL (Enhanced Chemiluminescence)-Reaktion wird der Farbstoff Luminol durch ein Oxidationsmittel (z.B. Wasserstoffperoxid) oxidiert. Dabei wird Licht emittiert, welches mit einem Film gemessen wird [29, S. 27-9].

Nach dem Western Blot wurde die Membran schüttelnd in 10%iger Magermilch (gelöst in PBST) oder in 5%iger Gelatine (gelöst in PBST) für eine Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4° Celsius über Nacht geblockt. Danach wurde der Primärantikörper (gelöst in 1%igem BSA-PBST) über Nacht schüttelnd bei 4° Celsius inkubiert. Anschließend erfolgte ein Waschschrift über dreimal zehn Minuten in PBST. Die Inkubation des Sekundärantikörpers (gelöst in 1%igem BSA-PBST) erfolgte für 90 Minuten schüttelnd bei Raumtemperatur. Zuletzt wurde die Membran zuerst dreimal fünf Minuten in PBST und danach dreimal zehn Minuten in PBS gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Da bei Verwendung der oben genannten Blockmittel teils unspezifische Banden auftraten, wurde im Verlauf auf ROTI®-

Block Blockierungsreagenz (Carl Roth) auf Polymerbasis umgestellt. Das ROTI®-Block-Konzentrat wurde mit destilliertem Wasser 1:10 zur ROTI®-Block-Arbeitslösung verdünnt. Das Blocken erfolgte schüttelnd in der beschriebenen Arbeitslösung für eine Stunde oder über Nacht bei Raumtemperatur. Die Inkubation der Primär- und Sekundärantikörper erfolgte dann ebenfalls in der ROTI®-Block-Arbeitslösung und ansonsten analog zum oben beschriebenen Verfahren.

Im Anschluss an den letzten Waschschrift wurde die Membran zwischen zwei transparente Folien gelegt. Dann wurden jeweils 1 ml der Amersham ECL-Reagenzien A und B miteinander vermischt, gleichmäßig auf der Membran verteilt und Luftblasen zwischen Folie und Membran ausgestrichen. Die vorbereitete Membran wurde in einer Dunkelkammer zusammen mit einem Film in eine Entwicklungskassette eingespannt und inkubiert.

Nach der Inkubation wurde der Film in der Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine Agfa CP1000 entwickelt. Je nach Signalintensität der Chemilumineszenz wurden die Filme unterschiedlich lang inkubiert. Die Inkubation erfolgte dabei aufsteigend von wenigen Sekunden bis zu mehreren Minuten. Wenn das Signal auch nach längerer Inkubationszeit noch sehr schwach war, wurde die Membran nach dreimaligem Waschen für jeweils 5 Minuten in PBS auf dem Schüttler noch einmal mit SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific) inkubiert und entwickelt. Gelegentlich erfolgte die Detektion der ECL-Reaktion auch mit dem Fusion FX7™ AdvanceMulti-Imagingsystem (PEQLAB Biotechnologie).

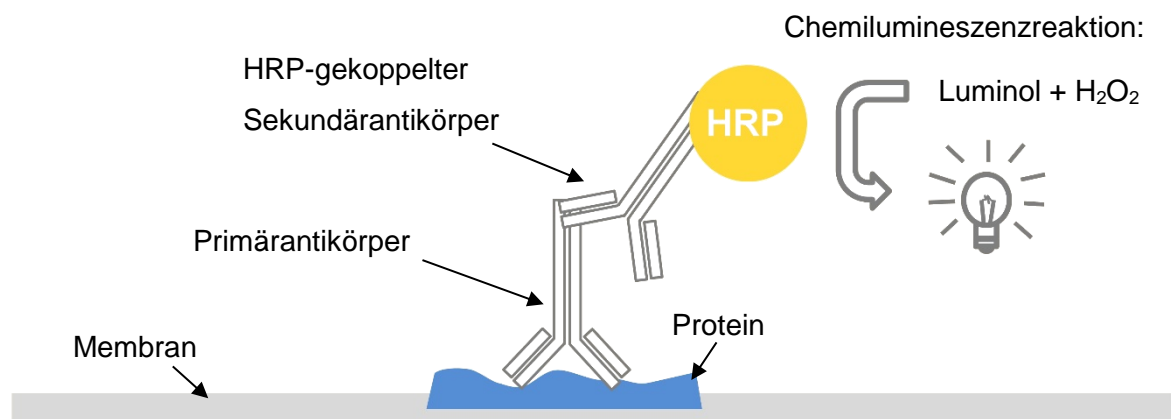


Abb. 6: Schema der Immundetektion. Zuerst erfolgt die Bindung des Primärantikörpers an ein Protein auf der Nitrozellulosemembran. Danach bindet ein HRP-gekoppelter Sekundärantikörper an das Fc-Fragment des Primärantikörpers. Die HRP katalysiert die Reaktion von Luminol und einem Oxidationsmittel, meist Wasserstoffperoxid, wobei Photonen emittiert werden [eigene Darstellung].

2.2.8 Immunhistochemie bzw. Immunfluoreszenz

Zur Beurteilung einer zellulären Kolo-kalisierung von PRG 2 und einem der potentiellen Protein-Interaktionspartner wurde eine immunhistochemische Färbung und anschließend eine

Fluoreszenzmikroskopie an einem konfokalen Mikroskop durchgeführt. Dabei wurden zunächst Gewebeschnitte von embryonalen Mäusegehirnen mit spezifischen Primärantikörpern gegen die nachzuweisenden Antigene inkubiert bspw. PRG 2 und Radixin. Danach wurden polyklonale Sekundärantikörper aufgetragen, die an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind. Um eine unspezifische Reaktion des Sekundärantikörpers mit Zellstrukturen zu verhindern, wurden die Schnitte zu Beginn mit einem Serum der Spezies, in der der Sekundärantikörper gewonnen wurde (z.B. Ziege) geblockt. Anschließend wurden die Gewebeschnitte unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Bei dieser speziellen Form der Lichtmikroskopie werden die Fluorochrome (Fluoreszenzfarbstoffe) durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt. Wenige Nanosekunden später emittieren sie Licht einer höheren Wellenlänge, das durch spezielle Filter aufgefangen wird.

Bei den durchgeführten Färbungen wurde PRG 2 mit einem grünen (Alexa 488) und der potentielle Interaktionspartner mit einem roten/orangefarbenen Fluoreszenzfarbstoff markiert (Alexa 568). Wenn eine Kolokalisierung der Proteine vorliegt, liegen das grüne und das rote/orangefarbene Fluoreszenzsignal so nah beieinander, dass ein gelbes Licht wahrgenommen wird.

Außerdem wurde die DNS mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes DAPI angefärbt. Dieses Fluorochrom lagert sich hauptsächlich an AT(Adenin/Thymin)-reiche Regionen doppelsträngiger DNS an. Bei Anregung mit ultraviolettem Licht emittiert DAPI blaues Licht mit einer Wellenlänge von 461 nm. Die Anfärbung der Zellkerne dient u.a. der Zuordnung von Fluoreszenzsignalen im Gehirn bspw. axonal (im Nervenfortsatz) oder somatisch (im Zellkörper).

Herstellung der Gewebeschnitte

Die Präparation der embryonalen Mäusegehirne erfolgte zwischen dem 14. und 17. Tag der Embryonalentwicklung analog zur Präparation für die Zelllysate (siehe 2.2.1). Das präparierte embryonale Gehirn wurde anschließend in einen Agarose-Block eingebettet. Dazu wurde zunächst eine 4%ige Agarose-Lösung angesetzt. Dafür wurden 4 g Agarose Low Melt in einem Reaktionsgefäß abgewogen, auf 100 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt und die Lösung auf 100° Celsius erhitzt bis sich das Agarosepulver vollständig gelöst hatte. Die Aufbewahrung der fertigen Agarose-Lösung erfolgte im Wasserbad bei 43° Celsius.

Zur Herstellung der Gewebeschnitte wurde die 4%ige Agarose-Lösung in ein würfelförmiges Einbetttschälchen gefüllt und das embryonale Gehirn in die leicht verfestigte Agarose eingebracht. Nach ca. 10 Minuten wurde der auspolymerisierte Agaroseblock aus der Form

herausgelöst und mit Histoacryl® (B. Braun) auf dem Stempel des Vibratoms (Microm HM 650 V von Thermo Scientific) befestigt.

Es wurden Gewebeschnitte von 70 µm Dicke angefertigt (Einstellungen des Vibratoms: Amplitude 0,7 mm, Frequenz 57 Hz). Während des Schneidevorgangs wurde das eingebettete Präparat auf 4° Celsius gekühlt und die fertigen Schnitte in eine 4° Celsius kalte PB-Lösung überführt. Die Gewebeschnitte wurden entweder in horizontaler oder koronarer Schnitfführung angefertigt.

Immunhistochemische Färbung

Von den fertigen Gewebeschnitten wurden zwei bis drei Schnitte in je einen Schacht einer 12-Well-Platte überführt. Wenn Sekundärantikörper aus der Ziege verwendet wurden, erfolgte zunächst das Blocken mit 5 %igem Normal Goat Serum gelöst in 0,5 %igem Triton-PB. Bei Verwendung von Sekundärantikörpern, die in Eseln gewonnen wurden, wurde mit 5 %igem Normal Horse Serum gelöst in 0,5 %igem Triton-PB geblockt. Pro Well wurde 1 ml Blockierungslösung verwendet und auf dem Schüttler für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Gewebeschnitte fünfmal zehn Minuten in PB gewaschen.

Anschließend erfolgte die gleichzeitige Inkubation beider Primärantikörper bei 4° Celsius schüttelnd über Nacht (Anti-PRG 2: 1:2500, Anti-Radixin: 1:500). Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die Schnitte fünfmal zehn Minuten in PB gewaschen.

Daraufhin erfolgte nacheinander die Inkubation der Sekundärantikörper (1:1000) für jeweils drei Stunden schüttelnd bei Raumtemperatur und abgedunkelt. Nach der Inkubation des ersten Sekundärantikörpers erfolgte ein Waschschrift über fünfmal zehn Minuten in PB. Nach der Inkubation des zweiten Sekundärantikörpers wurde dreimal zehn Minuten in PB gewaschen. Danach erfolgte die Färbung der Zellkerne mit DAPI (1:10.000) über 20 Minuten schüttelnd bei Raumtemperatur und abgedunkelt.

Abschließend wurden die Gewebeschnitte zweimal zehn Minuten in PB gewaschen und danach auf Objektträger aufgezogen. Nachdem die Schnitte leicht angetrocknet waren, wurde ein Tropfen ProLong® Gold Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific) aufgetragen, der die Präparate vor dem schnellen Ausbleichen schützt. Nach einer Einwirkzeit von ca. zehn Minuten wurden die Schnitte gedeckelt und die Ränder des Deckgläschen mit Klarlack bestrichen. Die Aufbewahrung der aufgezogenen Gewebeschnitte erfolgte bei 4° Celsius.

3 Ergebnisse

3.1 Testung der Antikörper im Western Blot

Zu Beginn wurden die Antikörper im Western Blot an Zelllysaten von Mäusegehirnen (Embryonaltag 17) getestet und die optimalen Verdünnungen bestimmt. Eine Auflistung der verwendeten Antikörper befindet sich im Abschnitt Material und Methoden in den Tabellen 1 und 2 (siehe 2.1.1). Die im Western Blot verwendeten Verdünnungen der Primärantikörper entsprachen 1:2000 für Anti-PRG 2-CT2 und Anti-Radixin, 1:2500 für Anti-DDX 5 und für Anti- β -Actin. Die Sekundärantikörper wurden stets in einer Verdünnung von 1:10.000 verwendet.

PRG 2 zeigt im WB eine Bande bei ca. 100 kDa, Radixin bei ca. 90 kDa, DDX 5 bei ca. 70 kDa und β -Actin bei ca. 42 kDa. Sowohl PRG 2 (MG: 77 kDa) als auch Radixin (MG: 69 kDa) liefen im Western Blot somit höher als ihr eigentliches Molekulargewicht erwarten ließe. Dies wird u.a. durch posttranslationale Modifizierungen der Proteine wie bspw. Glykosylierungen verursacht.

Der verwendete DCAF8-Antikörper war laut Herstellerangaben (Abcam, ab 80629) nur für die Ko-Immunpräzipitation geeignet. Er wurde daher im Western Blot nicht getestet.

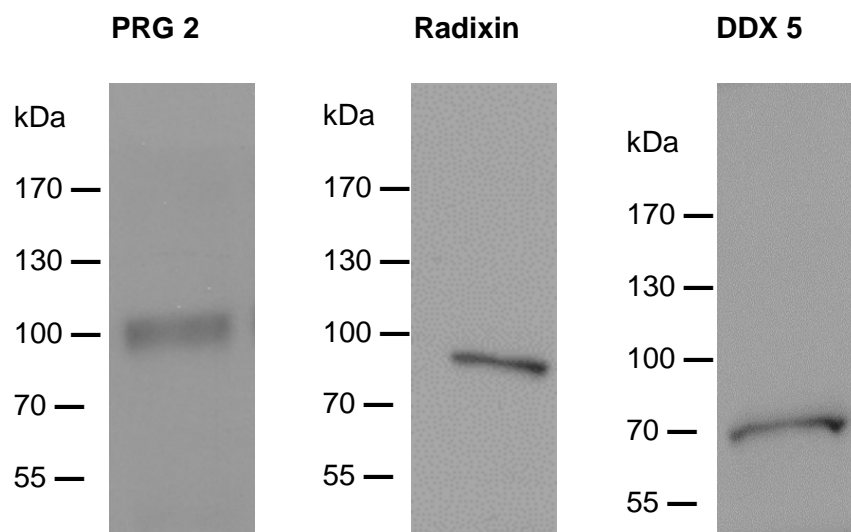


Abb. 7: Testung der Antikörper im Western Blot. PRG 2-Bande bei ca. 100 kDa, Radixin-Signal bei ca. 90 kDa und DDX 5 bei ca. 70 kDa.

3.2 Ko-Immünpräzipitation

3.2.1 PRG2/Radixin

Kontroll-IPs

Es wurde je eine Kontroll-IP mit PRG 2 und Radixin durchgeführt. Dabei wurde überprüft, ob das jeweilige Protein mit dem entsprechenden Antikörper von der stationären Phase präzipitiert werden kann.

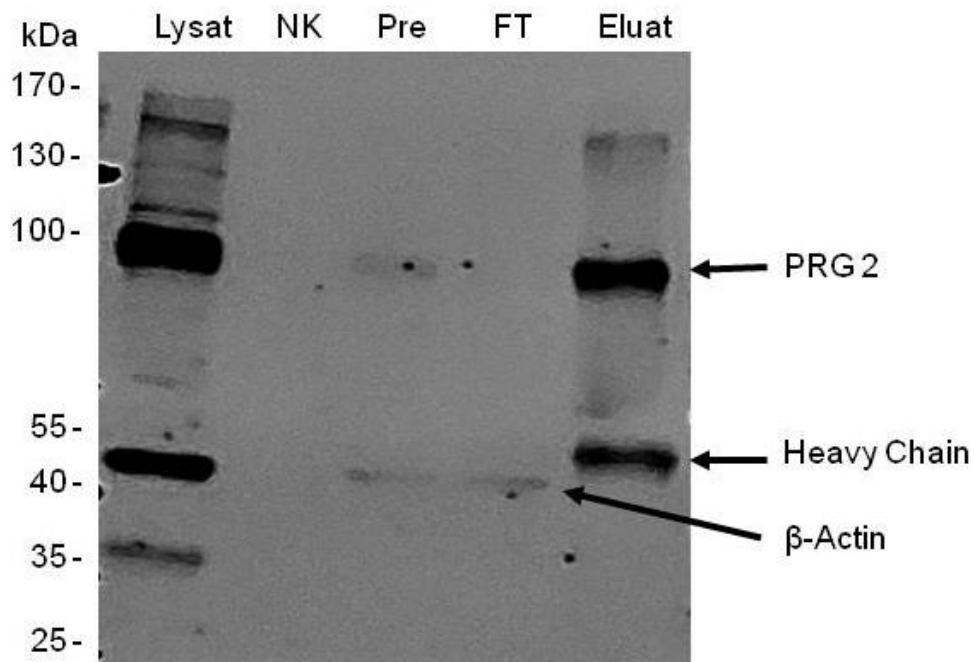


Abb. 8: Kontroll-IP Anti-PRG 2-CT 2 (Kaninchen, polyklonal), WB mit Anti-PRG 2-CT 2 (Kaninchen, polyklonal) und Anti- β -Actin (Maus, monoklonal), RIPA-Puffer; NK: Negativkontrolle, Pre: Precleared, FT: Flow-through.

Bei dem in Abb. 8 dargestellten Blot wurde eine IP mit Anti-PRG 2-CT 2 (ca. 5 μ g Antikörper) und anschließend ein Western Blot mit Anti-PRG 2-CT2 und Anti- β -Actin durchgeführt. Dafür wurden 100 μ l (ca. 1 mg Protein) Zelllysate (Gesamthirn, E16) mit 25 μ l Protein G (50 μ l der 50%igen Pierce™ Protein G Agarose Lösung) und 500 μ l RIPA-Puffer vermischt. Der Precleared ist im Verhältnis zum Lysat somit um 1:6 verdünnt worden.

Nach dem Preclearing mit Protein G Agarose wurde der Überstand (Precleared) in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Präzipitation erfolgte nach der indirekten Methode.

Im WB ist bei ca. 100 kDa das PRG 2-Signal und bei ca. 42 kDa die β -Actin-Bande zu erkennen. Im Eluat sieht man bei ca. 50 kDa das Signal der schweren Kette des PRG 2-

Antikörpers, der in der IP verwendet wurde. Die schwere Kette des denaturierten Antikörpers aus der IP, der in Kaninchen gewonnen wurde, wird im Western Blot vom Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen) gebunden und es entsteht ein Signal. Im Lysat zeigt sich sowohl ein starkes PRG 2 als auch ein starkes β -Actin-Signal.

Weiterhin wurde eine Negativkontrolle d.h. eine IP ohne die Zugabe von Anti-PRG 2-Antikörper durchgeführt. Im Western Blot wurde unter NK das Eluat dieser ansonsten identisch abgelaufenen IP ohne Antikörper aufgetragen. Hier lassen sich weder PRG 2 noch β -Actin nachweisen d.h. PRG 2 hat wie erwartet nicht unspezifisch an Protein G oder Agarose gebunden. β -Actin bindet in seiner Funktion als "Housekeeper-Protein" zwar unspezifisch an Protein G bzw. Agarose und ist daher in Lysat, Precleared und Flow-through nachweisbar. Durch die multiplen Waschschriffe im Verlauf der IP wurde β -Actin ohne spezifische Bindung an die stationäre Phase aus dem Eluat sowohl der IP mit Anti-PRG 2-CT 2 als auch der Negativkontrolle entfernt und ist daher nicht mehr nachweisbar.

Die Signalstärke von PRG 2 und β -Actin nimmt aufgrund der 1:6 Verdünnung vom Lysat zum Precleared hin ab.

Dahingegen findet sich kein PRG 2-Signal im Flow-through während es im Eluat wieder deutlich angereichert wurde d.h. die Immunpräzipitation von PRG 2 mittels Anti-PRG 2-CT 2 (Kaninchen, polyklonal) war erfolgreich.

Nach dem gleichen Schema (s.o.) erfolgte eine Kontroll-IP mit Anti-Radixin (ca. 0,8 μ g Antikörper) und anschließend ein WB mit Anti-Radixin und Anti- β -Actin (s. Abb. 9).

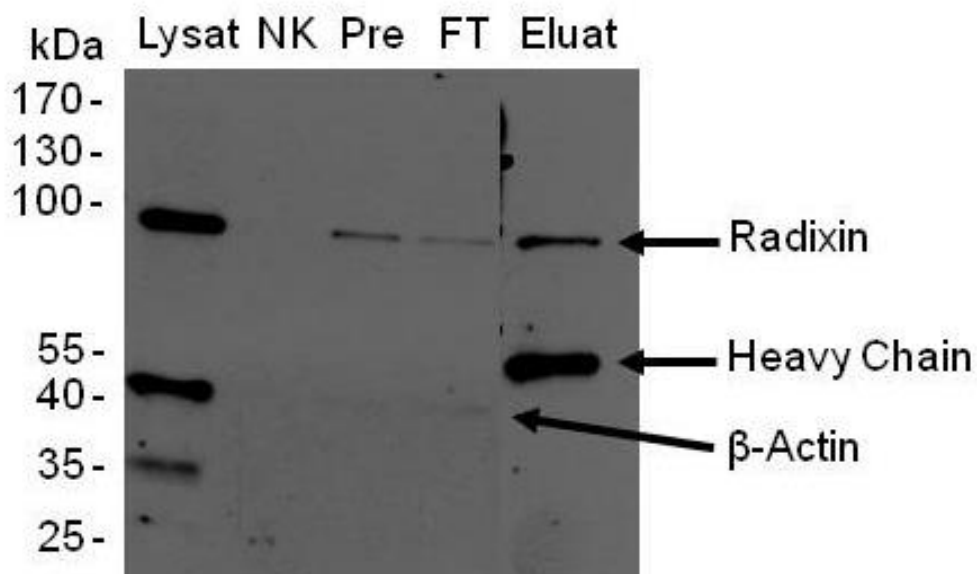


Abb. 9: Kontroll-IP Anti-Radixin (Kaninchen, monoklonal), WB mit Anti-Radixin (Kaninchen, monoklonal) und Anti- β -Actin (Maus, monoklonal); NK: Negativkontrolle, Pre: Precleared, FT: Flow-through.

Auf diesem Blot erkennt man bei ca. 90 kDa ist das Radixin-Signal, bei ca. 42 kDa die β -Actin-Bande und im Eluat bei ca. 50 kDa die schwere Kette des Anti-Radixin-IgGs.

Die Negativkontrolle enthält weder Radixin noch β -Actin. Im Flow-through findet sich ein schwaches Radixin-Signal d.h. nicht das gesamte Radixin konnte über den Radixin-Antikörper an die stationäre Phase gebunden werden. Dies kann u.a. an der geringen Menge verwendeten Antikörpers liegen. Da die Konzentration des von Abcam gelieferten Antikörpers sehr gering ist wurde aus ökonomischen Gründen vergleichsweise wenig Antikörper verwendet. Allerdings wurde Radixin vom Precleared zum Eluat deutlich angereichert und somit erfolgreich präzipitiert.

Das Ergebnis dieser Kontroll-IP mit Anti-Radixin ist analog zu der vorherigen Kontroll-IP mit Anti-PRG 2 (s. Abb. 8) positiv.

Ko-Immünpräzipitation

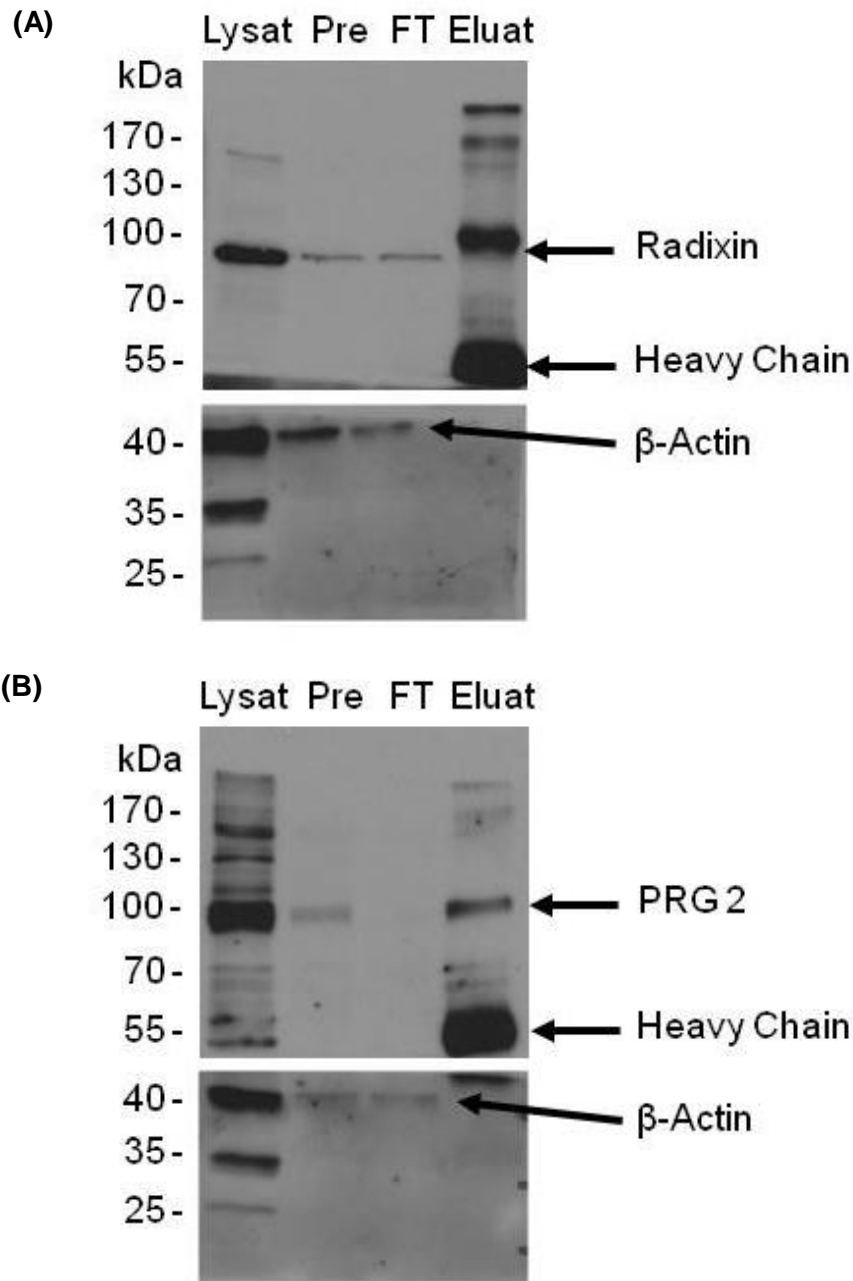


Abb. 10: Ko-IP PRG 2/Radixin. IP mit Anti-PRG 2-CT2 (Kaninchen, polyklonal). **(A)** WB mit Anti-Radixin (Kaninchen, monoklonal) und Anti- β -Actin (Maus, monoklonal) **(B)** WB mit Anti-PRG 2-CT 2 (Kaninchen, polyklonal) und Anti- β -Actin (Maus, monoklonal), RIPA-Puffer; Pre: Precleared, FT: Flow-through.

Der Blot in Abb. 10 zeigt eine Ko-IP mit Anti-PRG 2-CT 2.

Es wurde Zelllysat aus Cortex und Hippocampus eines murinen Gehirns vom 16. Embryonaltag verwendet. Für das Preclearing wurden 100 μ l Lysat (ca. 200 μ g Protein) mit 25 μ l Protein G (50 μ l der 50%igen Pierce™ Protein G Agarose Lösung) vermischt und auf ein Reaktionsvolumen von 600 μ l mit RIPA-Puffer aufgefüllt. Der Precleared wurde somit um 1:6

verdünnt. Die Präzipitation erfolgte nach der direkten Methode und es wurden ca. 5 µg Antikörper für die Ko-IP verwendet. Für die Elektrophorese wurden Lysat, Precleared, Flow-through und Eluat jeweils zweimal auf das Gel aufgetragen um im Western Blot sowohl Radixin als auch PRG 2 in allen Proben detektieren zu können.

Im Western Blot wurden Radixin (bei ca. 90 kDa), PRG 2 (bei ca. 100 kDa), β -Actin (bei ca. 42 kDa) und die schwere Kette des Anti-PRG 2-Immunglobulins aus der Ko-IP (bei ca. 50 kDa) detektiert. Im Lysat erkennt man ein deutliches PRG 2, Radixin und β -Actin-Signal. Durch die Verdünnung verlieren die Banden im Precleared an Intensität. Im Flow-through erkennt man sowohl eine β -Actin- als auch eine Radixin-Bande aber kein PRG 2-Signal. D.h. PRG 2 konnte vollständig von der stationären Phase präzipitiert werden (s. PRG 2-Bande im Eluat auf der rechten Seite des Blots) während nicht das gesamte Radixin über PRG 2 gebunden werden konnte (s. Radixin-Bande im Flow-through auf der linken Seite des Blots).

Im Eluat findet sich auf beiden Seiten kein β -Actin-Signal aber eine deutliche Bande der schweren Kette des in der Ko-IP verwendeten Immunglobulins (Anti-PRG 2-CT2). Im Eluat, in dem Radixin immunologisch detektiert wurde, sieht man eine starke Bande bei ca. 110 kDa und darunter eine schwache Bande bei ca. 100 kDa. Das Signal bei 110 kDa ist ein Dimer, d.h. ein Molekül aus zwei Untereinheiten, der schweren Kette des Anti-PRG 2-Immunglobulins aus der Ko-IP.

Darunter zeigt sich im Eluat bei 100 kDa ein schwächeres Radixin-Signal d.h. ein Teil des Radixins konnte über PRG 2 und die stationäre Phase präzipitiert werden.

In dieser Ko-Immunpräzipitation scheint das Verhältnis zwischen Protein und Antikörper demnach deutlich in Richtung Antikörper verschoben zu sein.

Eine Interaktion von PRG 2 und Radixin konnte auch in der umgekehrten Versuchsanordnung bestätigt werden. In der Ko-IP mit Anti-Radixin aus Zelllysat vom 17. Tag der Embryonalentwicklung ließ sich im Western Blot PRG 2 im Eluat nachweisen. Das Ergebnis dieser Ko-IP wurde bereits in der Publikation von Cheng et al. [35] aufgeführt.

3.2.2 PRG 2/DCAF 8

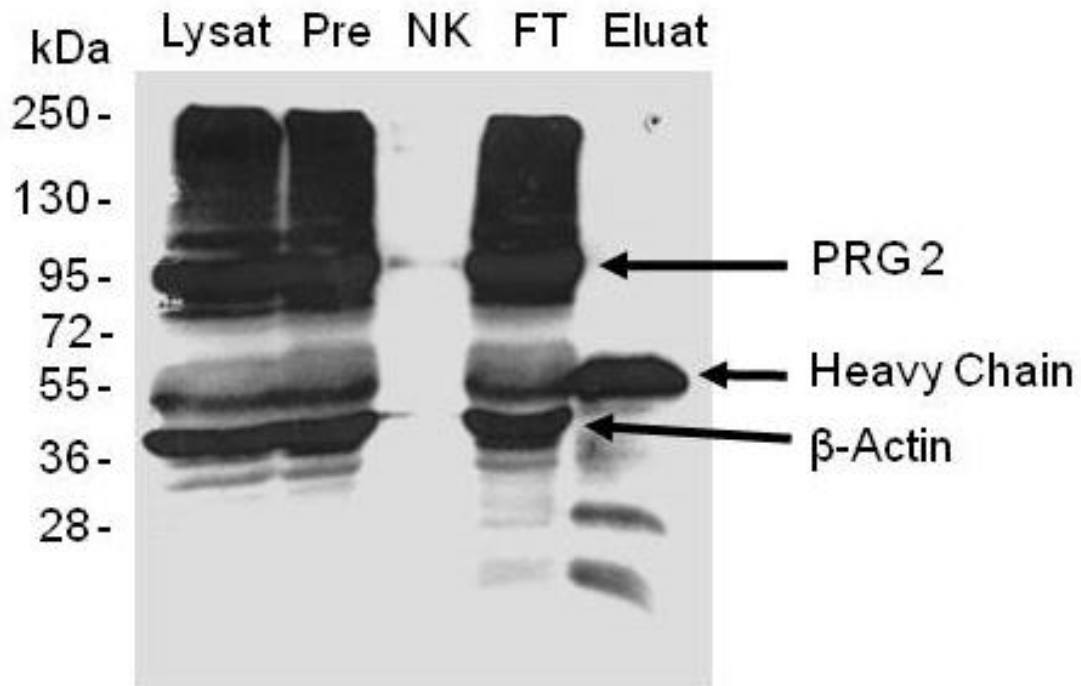


Abb. 11: Ko-IP DCAF 8/PRG 2. IP mit Anti-DCAF 8 (Kaninchen, polyklonal), WB mit Anti-PRG 2 (Kaninchen, polyklonal) und Anti- β -Actin (Maus, monoklonal), RIPA-Puffer; Pre: Precleared, NK: Negativkontrolle, FT: Flow-through.

In dieser Ko-IP (Abb. 11) konnte keine Interaktion zwischen PRG 2 und DCAF 8 nachgewiesen werden.

Es wurde eine Ko-IP mit Anti-DCAF 8 (ca. 7,5 μ g Antikörper) und RIPA-Puffer aus Lysat eines Gesamthirn von Embryonaltag 17 durchgeführt. Zunächst wurden 500 μ l Zelllysat (ca. 2 mg Protein) mit 75 μ l Protein G (150 μ l der 50%igen Pierce™ Protein G Agarose Lösung) zum Preclearing vermischt. Danach wurde die Proteinkonzentration des gewonnenen Precleared bestimmt und 150 μ l (ca. 1 mg Protein) für die eigentliche Ko-IP verwendet. Die Präzipitation erfolgte nach der indirekten Methode. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle in Form einer Ko-IP nach identischem Verfahren allerdings ohne DCAF 8-Antikörper durchgeführt.

Im Western Blot zeigt sich bei ca. 100 kDa die PRG 2-Bande und bei ca. 42 kDa das β -Actin-Signal. Beide Banden fehlen sowohl in der Negativkontrolle als auch im Eluat. Das heißt einerseits, dass PRG 2 nicht unspezifisch von der stationären Phase präzipitiert wurde (Negativkontrolle). Andererseits bestand zwischen DCAF 8 und PRG 2 keine Bindung, so dass PRG 2 im Eluat nicht nachweisbar war. Desweiteren sieht man im Eluat die schwere Kette des denaturierten DCAF-8-Antikörpers aus der Ko-IP bei ungefähr 50 kDa.

Um ein eventuelles schwaches PRG 2 Signal im Eluat noch detektieren zu können wurde der Film über einen längeren Zeitraum entwickelt. Dadurch sind die Signale der übrigen Banden in Lysat, Precleared und Flow-through sehr ausgeprägt.

3.2.3 PRG 2/DDX 5

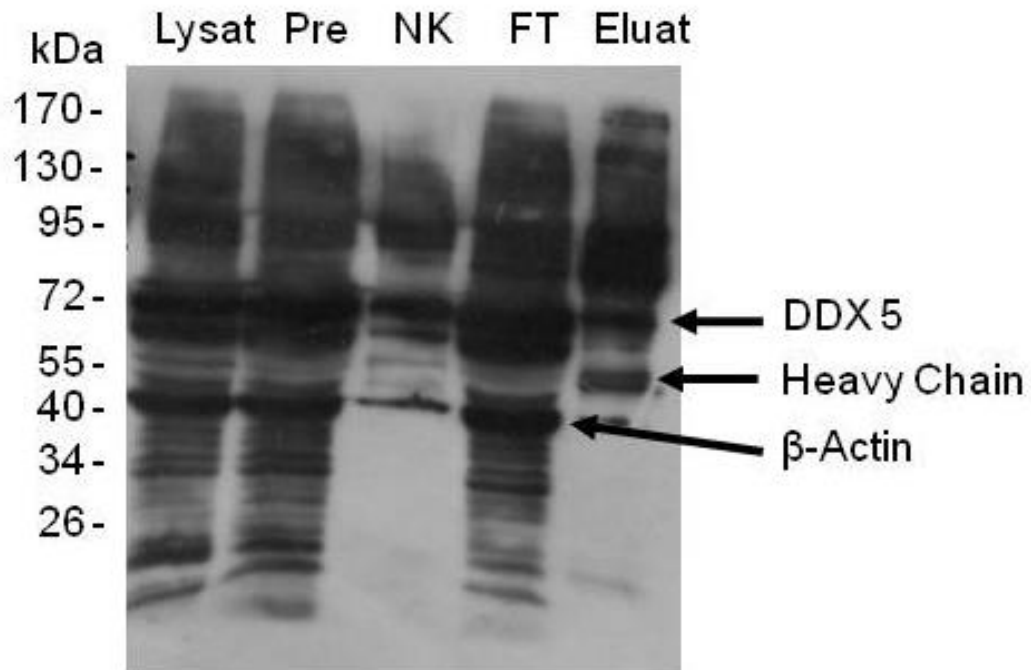


Abb. 12: Ko-IP PRG 2/DDX 5. IP mit Anti-PRG 2-CT2 (Kaninchen, polyklonal), WB mit Anti-DDX 5 (Maus, monoklonal) und Anti- β -Actin (Maus, monoklonal), RIPA-Puffer; Pre: Precleared, NK: Negativkontrolle, FT: Flow-through.

In der hier abgebildeten Ko-IP (Abb. 12) ließ sich keine Protein-Interaktion zwischen PRG 2 und DDX 5 nachweisen.

Es wurde eine Ko-IP mit Anti-PRG 2-CT 2 (ca. 10 μ g Antikörper) und eine Negativkontrolle aus Zelllysat vom 18. Embryonaltag durchgeführt. 400 μ l Zelllysat (ca. 1 mg Protein) wurden mit 30 μ l Protein G (60 μ l der 50%igen Pierce™ Protein G Agarose Lösung) zum Precleared vermischt. Die Präzipitation erfolgte nach der indirekten Methode. Die Negativkontrolle erfolgte nach dem gleichen Verfahren jedoch wurde kein PRG 2-CT 2-Antikörper verwendet.

Im Western Blot erkennt man bei ca. 70 kDa das DDX 5-Signal und bei ca. 42 kDa die β -Actin-Bande. Das DDX 5-Signal ist zwar im Eluat vorhanden allerdings hat es eine geringere Intensität als im Flow-through und ist zudem auch in der Negativkontrollen zu finden, d.h., dass DDX 5 unspezifisch präzipitiert wurde. Dies könnte sowohl durch den verwendeten Anti-PRG 2-IgG-Antikörper als auch von Protein G oder Agarose als Teil der stationären Phase

verursacht worden sein. Außerdem sind bei dieser IP auch geringe Mengen β -Actin in der Negativkontrolle und im Eluat vorhanden, was bspw. durch eine sehr hohe Proteinmenge im initial verwendeten Lysat

Auch bei diesem Blot befindet sich im Eluat das Signal der schweren Kette des in der Ko-IP verwendeten Immunglobulins, obwohl die im WB verwendeten Sekundärantikörper keine Anti-Kaninchen, sondern Anti-Maus-Immunglobuline gewesen sind. Dies lässt sich durch endogene Maus-Immunglobuline aus dem Lysat erklären, die wie das hinzugefügte Anti-PRG 2-CT2 der Ko-IP an Protein G binden. Durch die Verwendung von HRP-gekoppeltem Anti-Maus-IgG als Sekundärantikörper im WB wurden die schweren Ketten der endogenen Antikörper aus dem Mäusegehirn detektiert.

3.3 Immunhistochemie

3.3.1 PRG 2/Radixin

Die erfolgreiche Ko-Immünpräzipitation von PRG 2 und Radixin legt eine Interaktion dieser beiden Proteine nahe. Im nächsten Schritt wurde daher die zelluläre Expression und eine mögliche Kolokalisierung der beiden Proteine im embryonalen Entwicklungsstadium durch Fluoreszenzmikroskopie näher untersucht.

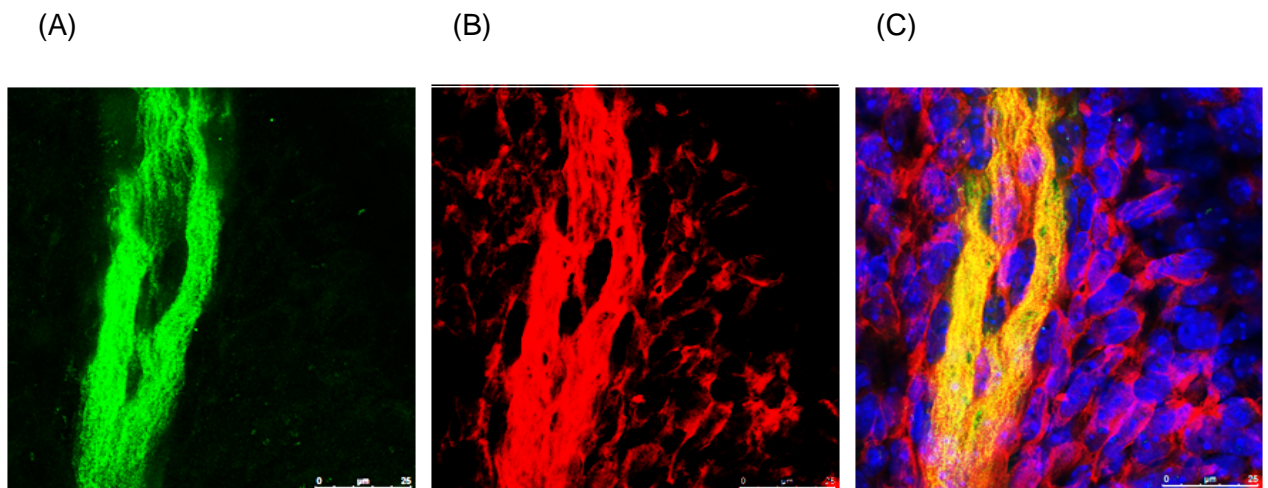


Abb. 13: Axonale Ko-Lokalisierung von PRG 2 und Radixin E14. Capsula interna. 40-fache Vergrößerung. (A) PRG2-Signal. Färbung mit Anti-PRG 2-CT 2 (Kaninchen, monoklonal) (1:2500) und Esel-Anti-Kaninchen Alexa Fluor® 488 (1:1000). (B) Radixin-Signal. Färbung mit Anti-Radixin (Ziege, polyklonal) (1:500) und Esel-Anti-Ziege Alexa Fluor® 568 (1:1000). (C) Merge PRG 2 und Radixin-Signal und DAPI (1:10.000)

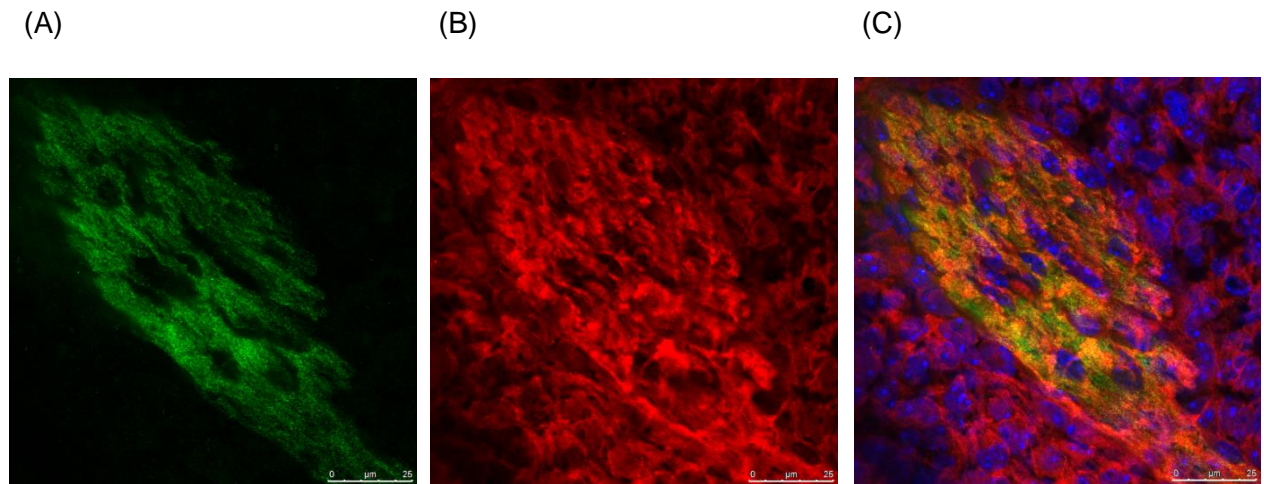


Abb. 14: Axonale Kolokalisierung von PRG 2 und Radixin E14. Capsula interna. 40-fache Vergrößerung. (A) PRG2-Signal. Färbung mit Anti-PRG 2-CT 2 (Kaninchen, monoklonal) (1:2500) und Esel-Anti-Kaninchen Alexa Fluor® 488 (1:1000). (B) Radixin-Signal. Färbung mit Anti-Radixin (Ziege, polyklonal) (1:500) und Esel-Anti-Ziege Alexa Fluor® 568 (1:1000). (C) Merge PRG 2 und Radixin-Signal und DAPI (1:10.000)

In den Abbildungen 13 und 14 erkennt man ein axonales Bündel innerhalb der Capsula interna. Dabei handelt es sich um eine große Ansammlung von Nervenfasern, die die Nervenzellen der Großhirnrinde mit darunterliegenden Neuronen im Hirnstamm oder im Rückenmark verbinden. Die Capsula interna liegt unterhalb der Großhirnrinde von Säugetieren und wird anatomisch innen durch den Nucleus caudatus und den Thalamus sowie außen durch das Putamen und das Pallidum begrenzt.

Die vorliegenden Schnitte wurden aus embryonalen Mäusegehirnen vom 14. Entwicklungstag (E14) angefertigt. Zunächst erfolgte das Blockieren von unspezifischen Bindungen mittels Inkubation mit einem fünfprozentigem Pferde-Serum (engl. Normal-Horse-Serum, NHS) für eine Stunde. Dieser Schritt verhindert unspezifische Signal durch die später verwendeten Sekundärantikörper, die aus Eseln gewonnen wurden. Ein von Eseln synthetisierter Antikörper würde das murine Gewebe generell als fremd erkennen und an verschiedenste Strukturen unspezifisch binden. Durch das Pferde-Serum werden solche potentiellen unspezifischen Bindungsstellen für den Sekundärantikörper blockiert. Durch die enge biologische Verwandtschaft von Pferden und Eseln wird hier standardmäßig ein Pferde-Serum und kein Esel-Serum verwendet. Vor der Verwendung des Primärantikörpers wurden die Schnitte fünfmal in Pufferlösung gewaschen.

Danach erfolgte die Inkubation mit den beiden Primärantikörpern Anti-PRG 2-CT2 (Kaninchen, 1:2500) und Anti-Radixin (Ziege, 1:500) über Nacht bei 4° und abgedunkelt. Nach fünf Waschschritten in Pufferlösung wurden die Sekundärantikörper inkubiert. Für die oben abgebildeten Schnitte wurde Esel-Anti-Kaninchen Alexa Fluor® 488 und Esel-Anti-Ziege Alexa Fluor® 568 verwendet jeweils in einer Verdünnung von 1:1000.

Folglich sind PRG 2 und Radixin nun über ihre Primärantikörper an einen fluoreszierenden Sekundärantikörper gebunden. D.h. nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 495 nm strahlt PRG 2 (Alexa Fluor® 488) Licht mit einer Wellenlänge von 519 nm aus, was in einem grünen Fluoreszenzsignal resultiert (vergleiche A in Abbildung 13 und 14). Durch die Anregung mit einer Wellenlänge von 578 nm emittiert Radixin (Alexa Fluor® 568) Licht mit einer Wellenlänge von 603 nm und erscheint unter dem Fluoreszenzmikroskop orange bzw. rot (vergleiche B in Abbildung 13 und 14).

Liegen die angefärbten Proteine sehr nah beieinander, sprich sie kolokalisieren, erscheinen sie gelb als Folge der Überlagerung (Merge) von rotem und grünem Signal (vergleiche C in Abbildung 13 und 14).

Im letzten Schritt wurde die DNS in den Zellkernen mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes DAPI (1:10.000) angefärbt. Dieser emittiert nach Anregung mit ultraviolettem Licht ein blaues Fluoreszenzsignal mit einer Wellenlänge von 461 nm. Durch die Anfärbung der Zellkerne sind die übrigen Signale leichter einer Lokalisation zuzuordnen. In den Abbildungen 13 und 14 kann man durch die geringe Dichte der blau-gefärbten Zellkerne erkennen, dass Radixin und PRG 2 hier axonal kolokalisieren.

4 Diskussion

4.1 PRGs - eine neue Protein-Familie

PRG 2 gehört zu einer neuen Protein-Familie, den plasticity-related genes, kurz PRGs, mit bisher fünf identifizierten Mitgliedern. PRGs sind integrale Membranproteine und werden spezifisch in den Gehirnen von Wirbeltieren exprimiert. Sie lassen sich der Superfamilie der Lipidphosphatasen bzw. Lipidphosphotransferasen zuordnen. Das zuerst entdeckte Mitglied der PRGs war PRG 1 in 2003 [2]. Seitdem konnte gezeigt werden, dass PRGs extrazellulär mit bioaktiven Phospholipiden wie bspw. Lysophosphatidsäure interagieren [36]. PRG 1 und PRG 2 verfügen zudem über einen C-terminalen intrazellulären Anteil von ca. 400 Aminosäuren Länge. Es wird angenommen, dass dieser Teil des Proteins für die Signaltransduktion bzw. Interaktion mit intrazellulären Proteinen verantwortlich ist. D.h. durch die Bindung von extrazellulären Substanzen an PRG 1 oder PRG 2 wird ein Signal an zytoplasmatische Proteine bzw. Proteinkomplexe weitergeleitet.

Während die Expression von PRG 1 erst perinatal beginnt und vor allem im Hippocampus lokalisiert ist [37], wird PRG 2 überwiegend in embryonalen Stadien gebildet beginnend ab dem 12. Tag der Embryonalperiode. PRG 2 ist dann vor allem in der ventrikulären Zone, dem Hauptort der Bildung von Nervenzellen (Neurogenese) der Hirnrinde (Kortex), lokalisiert. Postnatal nimmt die PRG 2-Expression stufenweise ab, sodass es dann nur noch in Regionen der postnatalen Neurogenese (Gyrus dentatus und Ventrikelwand) detektierbar ist [unpublizierte Daten, AG Nitsch].

Das Wissen über diese neue Protein-Familie und ihre Funktionen ist noch begrenzt und auch bezüglich PRG 2 stehen die Nachforschungen aktuell noch am Anfang.

4.2 Y2H - Potentielle Kandidaten einer Protein-Protein-Interaktion

4.2.1 Verfahren und Weiterentwicklung

Die Grundlage für die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen bildete das Hefe-Zwei-Hybrid-System (Y2H), ein genetisches Verfahren, das insbesondere zur groß-angelegten Suche nach Protein-Protein-Interaktionen (PPI) verwendet wird. Dieses Verfahren wurde erstmalig von Fields und Song 1989 [12] beschrieben und in den folgenden Jahren weiterentwickelt und optimiert.

Beim Y2H nutzt man das GAL 4-Protein des Hefepilzes *Saccharomyces cerevisiae*, welcher einen zu Mäusen und Menschen vergleichbaren Zellkern besitzt. GAL 4 ist ein Transkriptionsfaktor für ein Gen der Verwertung des Monosaccharids Galaktose.

In GAL 4 gibt es zwei unterschiedliche Domänen, die GAL 4-DNA-bindende Domäne (GAL 4-DBD) und die GAL 4-Aktivierende Domäne (GAL 4-AD). Fields und Song stellten für ihr Verfahren zwei Fusionsproteine her. Dabei wurde ein Protein A mit der GAL 4-DBD zum sogenannten Köderprotein fusioniert, während Protein B gebunden an die GAL 4-AD das sogenannte Beuteprotein bildete. Durch eine nicht-kovalente Bindung sprich Interaktion zwischen dem Köder- und Beuteprotein konnte eine Aktivierung der Transkription ausgelöst werden.

Zum Nachweis der Interaktion von Köder- und Beuteprotein verwendet man sogenannte Reportergene, die bspw. eine blaue Farbreaktion erzeugen können, weshalb man diesen Vorgang auch Blau-Weiß-Selektion nennt [12, 13].

Heutzutage ermöglicht ein weiterentwickelter Versuchsaufbau des Y2H die Testung von tausenden potentiellen Protein-Protein-Interaktionen innerhalb eines Genoms, d.h. innerhalb des Erbguts eines Lebewesens, in relativ kurzer Zeit.

So konnten Stelz et al. 3186 überwiegend neue potentielle PPI nachweisen durch einen automatisierten Y2H mit einer Matrix aus 4456 Köderproteinen und 5632 Beuteproteinen [14].

4.2.2 Einschränkungen und Fehlerquellen des Y2H

Das Verfahren des Y2H bringt allerdings auch einige Einschränkungen mit sich, die im Folgenden weiter ausgeführt werden.

a) Das für den Y2H verwendete GAL 4-Protein ist ein Transkriptionsfaktor folglich muss die Interaktion der Fusionsproteine im Zellkern des Hefepilzes stattfinden. Dadurch sind die meisten extrazellulären Proteine und Membranproteine für dieses Verfahren nicht geeignet [38]. Zur Lösung dieses Problems wurde in dem Y2H mit PRG 2 nur der intrazelluläre Anteil von PRG 2 als Köderprotein verwendet, wodurch der Transport des Fusionsproteins in den Zellkern des Hefepilzes ermöglicht wird. Folglich ergab der durchgeführte Y2H auch nur potentielle intrazelluläre Protein-Interaktionspartner von PRG 2.

b) Bei einem Y2H sind falsch-positive Ergebnisse nicht selten. Einerseits können durch die künstlich hergestellte Ko-Expression und Kolo-kalisation im Zellkern der Hefezelle Proteine miteinander reagieren, die unter physiologischen Umständen nicht im gleichen Zellkompartiment oder zur gleichen Zeit vorliegen würden. Solche Proteine sind ggf. tatsächlich in der Lage zu interagieren allerdings ohne eine biologische Relevanz.

Andererseits können manche Proteine das Reporteragen direkt aktivieren ohne vorherige Protein-Protein-Interaktion.

c) Ebenso kann es zu falsch-negativen Ergebnissen kommen, da *Saccharomyces cerevisiae* nicht über die gleiche enzymatische Ausstattung wie bspw. Wirbeltiere verfügt. Dadurch liegt ein Protein nach der Translation im Hefepilz ggf. unvollständig oder in einer anderen räumlichen Anordnung vor.

Folglich bringt ein Y2H potentielle Kandidaten einer Protein-Protein-Interaktion hervor, die durch zusätzliche biochemische oder biophysikalische Verfahren verifiziert und spezifiziert werden müssen [38]. Die AG Nitsch ließ in einem externen Labor in Heidelberg einen Y2H mit dem intrazellulären Anteil von PRG 2 als Köderprotein analog zu dem von Stelz et al. [14] vorgestellten Verfahren durchführen. Bei diesem Y2H ergaben sich sechs potentielle Protein-Interaktionspartner von PRG 2: Radixin (murin), BAT 3, DDX 5, DCAF 8, Striatin 4 und ANKS1B (human). Die potentiellen Interaktionen zwischen PRG 2 mit BAT 3, Striatin 4 und ANKS1B wurden nicht weiterverfolgt.

4.3 Überprüfung der potentiellen Interaktionspartner

Zur Bestätigung der potentiellen Protein-Interaktionspartner von PRG 2 wurde ein biochemisches Verfahren, die Ko-Immünpräzipitation und ein immunhistochemisches Verfahren, die Fluoreszenzmikroskopie angewendet.

4.3.1 Einfluss von Detergenzien auf Solubilisierung und PPI

Um ein Transmembranprotein wie PRG 2 einer biochemischen Interaktionsprüfung z.B. durch Ko-Immünpräzipitation unterziehen zu können, muss es zunächst aus der Zellmembran herausgelöst werden. Hierzu verwendet man Detergenzien, das sind bipolare Substanzen mit einem hydrophilen und einem hydrophoben Anteil. Das Detergenz lagert sich anstatt der Phospholipide, die die Zellmembran bilden an das Transmembranprotein an und lösen es so aus seiner Verankerung in der Zellmembran heraus. Diesen Prozess nennt man Solubilisierung. Essentiell für die weiteren Experimente ist, dass das gelöste Membranprotein in seinem funktionellen und gefalteten Zustand verbleibt. Eine Denaturierung d.h. Verlust von Tertiär- und Sekundärstruktur sowie eine Aggregation d.h. eine Verklumpung von Proteinen durch das Detergenz sollte vermieden werden.

4.3.2 PRG 2 und DDX 5

Die potentielle Protein-Protein-Interaktion zwischen PRG 2 und DDX 5 konnte in der durchgeführten Ko-Immünpräzipitation nicht bestätigt werden (s. Abb. 12).

Es wurde eine Ko-IP mit Anti-PRG 2-CT 2 als Antikörper für die stationäre Phase und anschließend Anti-DDX 5 im Western Blot verwendet. Im Western Blot erkennt man bei ca. 70 kDa das DDX 5-Signal und bei ca. 42 kDa die β -Actin-Bande. Das DDX 5-Signal ist hier in allen Taschen des Western Blots nachzuweisen u.a. auch in der Negativkontrolle, was bedeutet, dass DDX 5 unspezifisch von der stationären Phase präzipitiert wurde. Der Nachweis von DDX 5 im Eluat kann folglich nicht als eine Interaktion mit PRG 2 gewertet werden.

Um eine PPI von PRG 2 und DDX 5 zu beweisen, müsste demnach ein anderes Verfahren herangezogen werden.

Aufgrund ihrer subzellulären Lokalisation und Funktion ist eine Wechselwirkung der beiden Proteine biologisch allerdings eher unwahrscheinlich. DDX 5 ist eine RNA Helikase, die folglich innerhalb des Zellkerns lokalisiert ist und am Spleißen, d.h. der Umwandlung von prä-mRNA zu mRNA beteiligt ist [27]. Zudem wird DDX 5 vor allem in mesenchymalen Vorläuferzellen exprimiert, die sich u.a. in Skelettmuskulatur und Osteoblasten entwickeln [39, 40]. Im Gegensatz dazu ist PRG 2 ein Transmembranprotein, das vorwiegend pränatal und ausschließlich in Gehirnzellen von Vertebraten vorkommt [unpublizierte Daten, AG Nitsch].

An diesem Beispiel zeigt sich eine der möglichen Fehlerquellen des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems, in dem eine potentielle PPI von DDX 5 und PRG 2 nachgewiesen wurde. Durch den Ablauf dieses Verfahrens wurden zwei Proteine im Zellkern zusammengebracht, die unter physiologischen Bedingungen intrazellulär wahrscheinlich nicht aufeinandertreffen würden. Eine Interaktion der Proteine ist biochemisch demnach durchaus möglich, bleibt jedoch ohne physiologische Relevanz.

4.3.3 PRG 2 und DCAF 8

Durch die Ko-Immünpräzipitation konnte eine Protein-Interaktion zwischen PRG 2 und DCAF 8 nicht bestätigt werden (s. Abb. 11).

Bei der Ko-IP wurde Anti-DCAF 8 als Antikörper für die stationäre Phase verwendet und anschließend PRG 2 im Western Blot nachgewiesen. In Input, Precleared und Flow-through zeigen sich bei ca. 100 kDa eine kräftige PRG 2-Bande sowie auch das Housekeeper-Protein β -Actin bei ca. 42 kDa. Im Eluat hingegen ist nur die schwere Kette des für die Ko-IP verwendeten DCAF 8-Antikörpers bei ca. 50 kDa nachweisbar, ein PRG 2-Signal zeigt sich nicht. Es war dementsprechend nicht möglich PRG 2 über eine Protein-Interaktion mit DCAF 8 zu präzipitieren. Gleichzeitig ließ sich auch in der Negativkontrolle kein PRG 2 nachweisen, d.h. PRG 2 hat nicht unspezifisch an die stationäre Phase gebunden. Um auch ein mögliches schwaches Banden-Signal im Eluat detektieren zu können, wurde der WB über längere Zeit

mit der Chemilumineszenz inkubiert, was zu einem starken Signal in den übrigen Taschen des WB geführt hat. Auf eine Ko-IP unter Verwendung von Anti-PRG 2-CT2 und den Nachweis von DCAF 8 im WB wurde verzichtet, da der benutzte DCAF 8-Antikörper vom Hersteller nicht für diesen Anwendungsbereich empfohlen wurde.

Eine Interaktion von PRG 2 und DCAF 8 war aus physiologischer Sicht nicht unwahrscheinlich. DCAF 8 ist ein ubiquitär vorkommendes Protein in Eukaryoten, das nach aktueller Datenlage sowohl zytoplasmatische als auch intranukleäre Funktionen übernimmt. So konnten sowohl in Hefe- als auch in humanen Zellen bereits viele Interaktionen des für DCAF 8 typischen WD40-Motivs mit anderen Proteinen nachgewiesen werden. Das WD40-Motiv ist ein Proteinbereich von ca. 40 Aminosäuren Länge, der üblicherweise mit einem Dipeptid bestehend aus Tryptophan (Abkürzung: W) und Aspartat (Abkürzung: D) endet. Bei den WD40-repeat-Proteinen finden sich meist sieben Wiederholungen dieses namengebenden Motivs, für welches selbst bisher keine katalytische Aktivität nachgewiesen werden konnte. Es wird allerdings angenommen, dass WD40-Proteine wie DCAF 8 als Gerüstprotein für die reversible Anordnung von Proteinkomplexen dienen und somit an einer Vielzahl von zellulären Prozessen wie Signaltransduktion, Organisation des Zytoskeletts und RNA-Prozessierung beteiligt sind [20, 22, 23].

Durch diese hohe funktionelle Variabilität von DCAF 8 und durch seine Rolle als Gerüstprotein kann es im Y2H zu einer unspezifischen Interaktion mit dem anderen Fusionsprotein oder auch direkt mit dem Reporter gen gekommen sein. Dadurch ließe sich erklären, warum eine PPI mit PRG 2 in der Ko-Immunpräzipitation nicht bestätigt werden konnte.

4.3.4 PRG 2 und Radixin

Durch die Ko-Immunpräzipitation konnte eine Interaktion von PRG 2 und Radixin bestätigt werden (s. Abb. 10).

Bei der Ko-IP mit Zelllysat aus Cortex und Hippocampus eines murinen Gehirns vom 16. Embryonaltag wurde Anti-PRG 2-CT 2 als Antikörper für die stationäre Phase verwendet. Im Western Blot wurden dann getrennt voneinander sowohl Radixin als auch PRG 2 jeweils in Lysat, Precleared, Flow-through und Eluat nachgewiesen.

Im Lysat kann man sowohl PRG 2 bei ca. 100 kDa als auch Radixin bei ca. 90 kDa und β -Actin bei ca. 42 kDa erkennen. Durch die Verdünnung im Rahmen des Versuchablaufs verlieren die Banden im Precleared an Intensität. Im Flow-through zeigt sich sowohl eine β -Actin- als auch eine Radixin-Bande aber kein PRG 2-Signal. Folglich konnte PRG 2 vollständig durch den verwendeten Anti-PRG 2-CT2-Antikörper präzipitiert werden wohingegen nicht das

gesamte in der Probe enthaltene Radixin über PRG 2 an die stationäre Phase gebunden wurde.

Dies ist u.a. dadurch begründet, dass nicht alle Radixinmoleküle zum Untersuchungszeitpunkt mit PRG2 interagieren. Zudem können Protein-Protein-Interaktionen durch den teils denaturierenden Charakter der Detergenzien, die notwendig sind um Membranproteine aus der Zellmembran zu lösen, gestört werden. Dies kann den Nachweis der Interaktionen von Membranproteinen zusätzlich erschweren.

Im Eluat der Ko-Immunpräzipitation von PRG2 und Radixin lässt sich kein β -Actin jedoch eine deutliche Bande der schweren Kette des verwendeten Immunglobulins (Anti-PRG 2-CT2) bei ca. 55 kDa nachweisen. Im Western Blot, in dem Radixin immunologisch detektiert wurde, kann man im Eluat eine starke Bande bei ca. 110 kDa und darunter eine schwächere Bande bei ca. 100 kDa erkennen. Das Signal bei 110 kDa ist ein Dimer der schweren Kette des Anti-PRG 2-Immunglobulins, dem in der Ko-IP verwendeten Antikörper. Darunter zeigt sich bei 100 kDa das Radixin-Signal d.h. ein Teil des Radixins konnte über PRG 2 und die stationäre Phase präzipitiert werden.

Die starke Präsenz des Signals des Immunglobulins kann durch ein in Richtung Antikörper verschobenes Verhältnis zwischen Protein und Antikörper in dieser Ko-Immunpräzipitation verursacht sein.

PRG2 konnte mittels Western Blot ebenfalls im Eluat nachgewiesen werden, wo es im Verhältnis zum Precleared ein stärkeres Signal zeigt. Dies lässt sich durch die Aufkonzentration im Rahmen der selektiven Immunpräzipitation erklären.

Eine unspezifische Bindung von Radixin oder PRG 2 an die stationäre Phase konnte durch die Negativkontrollen in den Kontroll-Immunpräzipitationen zuvor bereits ausgeschlossen werden (s. Abb. 8 und 9).

Eine Interaktion von PRG 2 und Radixin konnte auch in der umgekehrten Versuchsanordnung bestätigt werden. In der Ko-IP mit Anti-Radixin aus Zelllysate vom 17. Tag der Embryonalentwicklung ließ sich PRG 2 immunologisch im Eluat nachweisen. Das Ergebnis dieser Ko-IP wurde bereits in der Publikation von Cheng et al. [35] aufgeführt.

Folglich lässt sich sagen, dass der Nachweis einer Interaktion von PRG2 und Radixin mittels Ko-Immunpräzipitation in Zellen des embryonalen Mäusegehirns (E17) gelungen ist. Diese Interaktion ist spezifisch für PRG 2, da nur PRG 1 und PRG 2 die untersuchte intrazelluläre C-terminale Domäne aufweisen und PRG 1 embryonal nicht exprimiert wird.

Bestärkt wird dieses Ergebnis durch den immunhistochemischen Nachweis einer axonalen Kolo-kalisation von PRG 2 und Radixin in der Capsula interna am 14. Tag der Embryonalentwicklung (s. Abb. 14 und 15 unter 3.3.1).

In Folgeuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass PRG 2 und Radixin auch in den Axonen der thalamokortikalen Bahn (E16) kolo-kalisieren. Zudem weisen die beiden Proteine ein ähnliches Expressionsmuster auf mit einer signifikanten Zunahme der Expression ab dem 11. Tag der Embryonalentwicklung [35].

Um die Funktion und Konsequenzen der Interaktion zwischen PRG 2 und Radixin zu verstehen, müssen weitere Nachforschungen folgen wie geschehen durch Cheng et al. (s. 4.5) [35].

4.4 Ein genauerer Blick auf Radixin

4.4.1 Aufbau und Regulation der ERMs

Die ERMs sind eine Proteinfamilie bestehend aus Radixin, Ezrin und Moesin. Es handelt sich um eukaryotische Proteine des Zytoplasmas, die dafür bekannt sind Phospholipide und Proteine der Zellmembran mit dem Aktinkortex des Zytoskeletts zu verbinden [15]. Aktin ist ein filamentäres Strukturprotein, das gemeinsam mit Intermediärfilamenten und Mikrotubuli das Zytoskelett bildet. Das Zytoskelett ist ein komplexes bewegliches Gerüst, das sich vom Zellkern bis zur Zellmembran erstreckt und der Organisation von Zellkompartimenten sowie der Anpassung der Zellform dient. Im Zytoplasma entlang der Innenseite der Zellmembran finden sich besonders viele Elemente des Zytoskeletts, weshalb man diese Schicht auch Zellkortex (Zellrinde) nennt.

Strukturell bestehen die ERMs aus drei konservierten Domänen: Die FERM-Domäne (engl. four-point-one, ezrin, radixin, moesin) gefolgt von einer zentralen α -helikalen Region und abschließend das C-terminale Ende, auch C-ERMAD (engl. C-terminal ERM-association domain) genannt.

Die C-ERMAD ist besonders relevant, da sie einerseits mit der FERM-Domäne in Form einer intramolekularen Bindung als auch mit Aktinfilamenten über die sogenannte ABD (engl. actin-binding domain) interagiert. Die intramolekulare Bindung der FERM-Domäne an die C-ERMAD definiert den ruhenden Konformationszustand der ERMs, da hierdurch die Bindungsstellen für Proteine der Zellmembran und Aktin blockiert werden. Wenn die FERM-Domäne an Membranbereiche bindet, die reich an einem bestimmten Phospholipid, dem Phosphatidyl-Inositol 4,5-bisphosphat, sind wird die Aktivierung des Proteins eingeleitet. Zusätzlich wird durch weitere Enzyme eine Phosphatgruppe an die Aminosäure Threonin im C-ERMAD

angehängt (Phosphorylierung), wobei die genaue Position der Phosphorylierungsstelle zwischen den ERMs variiert.

Durch diese beiden Schritte lösen sich die FERM-Domäne und die C-ERMAD voneinander und Bindungsstellen für Aktinfilamente und Membranproteine werden freigegeben, man spricht nun von aktivierten oder phosphoERMs [16, 17].

4.4.2 ERMs in Mitose und Zellteilung

Das Zytoskelett ist auch in der Zellteilung nach der Mitose (Kernteilung) in Zellen von Eukaryoten von großer Bedeutung. Während der Interphase, d.h. der Phase zwischen der letzten und der nächsten Zellteilung, liegen die Aktinfilamente ohne spezifische Ausrichtung unterhalb der Zellmembran vor. Während der Mitose ordnen sich die Aktinfasern parallel zur Zellmembran an und bilden eine kontinuierliche submembranäre Schicht, wodurch sie die Zelle steifer machen und ihr eine für die Mitose charakteristische runde Form verleihen. Später während der Zellteilung führen Aktinfilamente gemeinsam mit dem Protein Myosin II durch eine Einschnürung der Zellmembran zur Ausbildung der Teilungsfurche, die die beiden Tochterzellen voneinander absetzt.

Kunda et al. konnten zeigen, dass Moesin in *Drosophila melanogaster*, einer Taufliegenart, wesentlich an diesem Prozess beteiligt ist. Diese Fliegenart exprimiert von den ERMs ausschließlich Moesin, welches dort aber in gleicher Weise aktiviert wird wie in Zellen von Säugetieren. Phosphoryliertes Moesin, also das aktivierte Protein, wird zu Beginn der Mitose insbesondere an den Zellrändern angereichert und findet sich im weiteren Verlauf in hoher Konzentration im Bereich der Teilungsfurche. Zellen der Taufliege, in denen das Gen für Moesin ausgeschaltet wurde, zeigten in der Interphase keine relevanten Veränderungen. Während der Mitose wurden durch die Blockade von Moesin jedoch Störungen bei der Anordnung der Aktinfilamente und die fehlende Zunahme der Steifigkeit des Zellkortex beobachtet. Des Weiteren kam es bei ausgeschaltetem Moesin zu Fehlfunktionen des Spindelapparates, dessen Aufgabe die Aufteilung der Chromosomen während der Mitose ist [41].

Diese Ergebnisse legen nahe, dass aktivierte ERMs über ihre Interaktion mit dem Zytoskelett eine wesentliche Rolle im Ablauf der Mitose bzw. Zellteilung spielen. Eine Beteiligung an der Zellteilung von Nervenzellen lässt sich auch für PRG 2 vermuten, da es während der Embryonalperiode von Mäusen in der ventrikulären Zone, dem Hauptort der Entstehung von Nervenzellen der Hirnrinde, exprimiert wird. Im adulten Organismus nimmt die PRG 2-Expression zwar ab ist aber noch in Bereichen der postnatalen Neurogenese (Gyrus dentatus und Ventrikelwand) und in sich hauptsächlich postnatal entwickelnden Strukturen wie dem Kleinhirn nachweisbar [unpublizierte Daten, AG Nitsch].

4.4.3 Bekannte Interaktionen der FERM-Domäne

Für die aktivierte FERM-Domäne der ERMs konnten bereits Interaktionen mit den C-terminalen zytoplasmatischen Anteilen verschiedener Transmembranproteine nachgewiesen werden. Dazu gehören u.a. die Membranproteine CD 43 (engl.: **C**luster of **D**ifferentiation), CD 44 und ICAM2 (engl.: intercellular adhesion molecule 2), die zu den sogenannten Zelladhäsionsmolekülen gehören und die Interaktion sowie Kommunikation zwischen Zellen eines Organismus ermöglichen. Diese Proteine kommen jedoch vorwiegend in Zellen des Immunsystems und des Endothels (Innenschicht von Blut- und Lymphgefäßen) vor, wo sie bspw. die Immunantwort vermitteln.

Des Weiteren kann die aktivierte FERM-Domäne der ERMs an sogenannte Gerüstproteine wie bspw. EBP50 (engl.: ERM-binding phosphoprotein 50, Synonym: NHERF1) und E3KARP (engl.: NHE3 kinase A regulatory protein, Synonym: NHERF2). Über Gerüstproteine findet die Organisation von Proteinkomplexen aus mehreren Polypeptiden statt. EBP50 und E3KARP selbst können wiederum verschiedene andere Transmembranproteine binden, was die Möglichkeiten einer direkten oder indirekten Interaktion von ERMs mit anderen Proteinen zusätzlich erweitert [16].

In dieser Arbeit konnte nun eine Interaktion von Radixin als Bestandteil der ERMs mit PRG 2 in embryonalen Nervenzellen des Mäusegehirns nachgewiesen werden (s. 3.2.1 und 3.3.1). Vor dem Hintergrund der bekannten Funktionen und Interaktionen der ERMs und PRG 2 ist eine Bindung des zytoplasmatischen C-terminalen Teils von PRG 2 mit der FERM-Domäne des Radixins anzunehmen.

4.4.4 ERMs in der neuronalen Embryonalentwicklung von Ratten

Während der Entwicklung des zerebralen Kortex, sprich der Großhirnrinde, werden Nervenzellen bzw. ihre Vorstufen, die Neuroblasten, überwiegend in der sogenannten ventrikulären Zone gebildet. Die Ventrikulärzone, die ihren Namen durch das Angrenzen an das spätere Ventrikelsystem erhalten hat, ist auch der Hauptort der Expression von Plasticity related gene 2 ab dem 12. Tag der Embryonalentwicklung [unpublizierte Daten, AG Nitsch].

Im weiteren Verlauf bewegen sich die neuronalen Vorläuferzellen durch die sogenannte Intermediärzone zur kortikalen Platte, aus der sich später die Hirnrinde bildet. Diesen Prozess nennt man auch radiäre Zellwanderung. Die Intermediärzone enthält außerdem neuronale Fortsätze, die sowohl von der Kortikalplatte in Richtung Ventrikulärzone verlaufen als auch umgekehrt [42].

Mintz et al. zeigten, dass Ezrin, Radixin und Moesin ab dem 15. Tag der Embryonalentwicklung der Ratte im Bereich der kortikalen Neurogenese exprimiert werden mit einem Höhepunkt an

E17 in aussprossenden neuronalen Fortsätzen in der Intermediärzone. Postnatal nehmen sowohl die Expression der ERMs als auch die Expression von PRG 2 drastisch ab [18] [unpublizierte Daten, AG Nitsch].

Weiterhin konnte eine Kolo-kalisation von ERMs mit dem L1, einem neuronales Zelladhäsionsmolekül, in axonalen Bündeln in der Intermediärzone nachgewiesen werden [18]. L1 ist neuronales Transmembranprotein aus der Superfamilie der Immunglobuline. Seine essentielle Rolle in der Zellwanderung von Neuronen und der Lenkung von aussprossenden Axonen ist bereits länger bekannt. Hierzu interagiert es intrazellulär u.a. mit Ankyrin, das Verbindungen zwischen Membranproteinen und dem Aktinkortex des Zytoskeletts herstellt [43].

Die Expression von Ankyrin beginnt überwiegend jedoch erst postnatal. In kortikalen Gewebeschnitten der Ratte in der embryonalen Phase, insbesondere am 17. und 19. Entwicklungstag, zeigt sich daher eine prozentual deutlich höhere Kolo-kalisation von ERMs mit L1 als von Ankyrin mit L1 in der Intermediärzone. Daraus leiteten die Autoren ab, dass in pränatalen Stadien ERMs für die Verbindung von L1 und Aktin verantwortlich sind und im adulten Organismus durch Ankyrin abgelöst werden [18].

L1 zeigt ebenfalls eine Kolo-kalisation mit PRG 2 in der Intermediärzone bzw. in der thalamokortikalen Projektion am 16. Tag der Embryonalentwicklung in Mäusen. Die thalamokortikale Projektion enthält axonale Verbindungen zwischen Zellen des Thalamus, ein Teil des Diencephalons (Zwischenhirn), und dem somatosensorischen Kortex von Nagetieren. Durch diese Projektion werden Wahrnehmungen der Vibrissen (Schnurrhaare) der Tiere über den Thalamus an die Großhirnrinde weitergeleitet [35].

Diese Erkenntnisse weisen darauf hin, dass ERMs bzw. Radixin als Verbindungsstrukturen zwischen stationären Transmembranproteinen wie PRG 2 oder L1 und den darunterliegenden Aktinfilamenten des Zytoskeletts dient und hierdurch eine Veränderung der Zellform bzw. die Motilität eines Neurons oder seiner Fortsätze koordiniert wird (s. auch 4.5.).

4.4.5 Homozygoter Radixin-Knockout verursacht Taubheit bei Mäusen

Haarzellen sind spezialisierte Sinneszellen, deren filamentäre Fortsätze, gebildet aus Aktinfilamenten, Stereozilien genannt werden. Durch sie werden Signale wie Schall in der Hörmuschel (Cochlea) oder Lageveränderungen im Vestibularorgan in elektrische Signale umgewandelt [44].

Insbesondere Radixin wird stark in den cochleären und vestibulären Stereozilien der Haarzellen im Innenohr von Mäusen exprimiert, während Ezrin nur diffus und Moesin ausschließlich in Blutgefäßen nachgewiesen werden konnte. Ein homozygoter Radixin Knock-

out (Rdx-KO), d.h. das Ausschalten der Genfunktion von Radixin, verursacht bei Mäusen einen tauben Phänotyp während die Vestibularfunktion uneingeschränkt bleibt.

Kitajiri et al. konnten jedoch beobachten, dass sich die cochleären Stereozilien auch in Mäusen mit Rdx-KO zunächst problemlos entwickelten. In den Fortsätzen der Haarzellen kam es zu einer deutlichen Hochregulierung der Ezrin-Expression in den Bereichen, in denen bei Wildtyp-Mäusen Radixin vermehrt nachzuweisen ist. Folglich kann Ezrin die Funktion von Radixin zumindest für einen gewissen Zeitraum übernehmen. Ab dem 14. Tag postnatal, dem Beginn der Hörfähigkeit von Mäusen, kam es bei den Rdx-KO-Mäusen allerdings zu einer Deformierung der zuvor intakten Stereozilien. Durch diese Deformierung konnten akustische Signale anscheinend nicht mehr in elektrische Erregung umgewandelt werden und es resultierte die Taubheit der Rdx-KO-Maus. Ezrin scheint demnach die Entwicklung der cochleären Stereozilien anstelle von Radixin gewährleisten zu können jedoch nicht ihre Aufrechterhaltung bzw. Funktionalität im adulten Organismus.

Im Gegensatz dazu zeigte sich in adulten Rdx-KO-Mäusen eine unveränderte Morphologie und Dichte der Stereozilien im Vestibularorgan sowie eine erhaltene Funktion des Gleichgewichtssinns. Ezrin kann das Fehlen von Radixin in vestibulären Stereozilien folglich vollständig kompensieren.

Diese Erkenntnisse legen eine funktionelle Redundanz der ERMs nahe [19].

4.5 Neue Erkenntnisse zur Interaktion zwischen Radixin und PRG 2

Nachdem eine Protein-Protein-Interaktion von PRG 2 und Radixin durch Ko-Immunpräzipitation belegt werden konnte, stellt sich die Frage nach dem Ablauf und der Funktion dieser Interaktion. Hierzu wurden von der AG Nitsch weitere Untersuchungen durchgeführt.

4.5.1 Abweichungen der thalamokortikalen Projektion durch homozygoten PRG 2-Knockout

Ein homozygoter PRG 2 Knock-out (PRG 2-KO) verursachte eine Fehlleitung von axonalen Fasern in der Entwicklung der thalamokortikalen Projektion (s.o.). Physiologischerweise ordnen sich die thalamokortikalen Axone in einem bestimmten Zeitraum der Embryonalentwicklung unterhalb der kortikalen Platte an. In den homozygoten PRG 2-KO-Mäusen ragten die Axone an E17 jedoch über die Intermediärzone hinaus und in die Kortikalplatte hinein.

Diese Beobachtung konnte sowohl für Tiere gemacht werden, bei denen PRG 2 in allen Zellen ausgeschaltet worden war, als auch bei Thalamus-spezifischen PRG 2-Knock-out-Mäusen.

Anschließend wurde das PRG 2-Gen über ein Plasmid (s.o.) und Elektroporation in PRG 2-KO-Schnittkulturen des 15. Embryonalentwicklungstags wieder eingefügt. Bereits 48 Stunden nachdem PRG 2 in diesen Schnitten erneut exprimiert wurde, normalisierte sich die Anordnung der Axone, deren Wachstum sich nun wieder auf die Intermediärzone beschränkte. PRG 2 scheint demnach eine essentielle Rolle in der Entwicklung der thalamokortikalen Bahnen zu spielen.

Der gleiche Phänotyp mit fehlgeleiteten thalamokortikalen Axonen in der kortikalen Platte zeigte sich ebenfalls beim homozygoten Radixin-KO, was die Bedeutung beider Proteine in der Lenkung von axonalem Wachstum unterstreicht [35].

4.5.2 Kolokalisation von PRG 2 und Radixin in Wachstumskegeln

Um detailliertere Erkenntnisse bezüglich der Lokalisation der beiden Proteine zu erhalten wurde eine Immunfluoreszenz analog zu dem in 2.2.8 vorgestellten Verfahren mit höherer Auflösung durchgeführt. Dabei konnte auch eine subzelluläre Kolokalisation in bzw. an der Membran von neuronalen Wachstumskegeln nachgewiesen werden [35]. Ein Wachstumskegel ist das aussprossende Ende eines Dendriten oder Axons einer Nervenzelle auf der Suche nach einer synaptischen Verknüpfung. Gebildet wird der Wachstumskegel u.a. von filamentärem Aktin [45], einem Bestandteil des Zytoskeletts, an den Radixin mit seinem C-Terminus bekanntermaßen direkt binden kann [16].

4.5.3 Auswirkungen von PRG 2 auf die Phosphorylierung von ERMs

Die Proteine der ERM-Familie, Ezrin, Moesin und Radixin kommen in zwei Funktionszuständen vor. Um vom ruhenden in den aktiven Zustand übergehen zu können ist die Phosphorylierung eines bestimmten C-terminalen Threonin-Restes notwendig. Die Position dieses Threonin-Restes variiert zwischen den einzelnen Proteinen der ERM-Familie um einige Aminosäuren, in Radixin handelt es sich um das Threonin an Stelle 564 (T564). Nach der Phosphorylierung ist Radixin in der Lage über seine C-terminale Domäne filamentäres Aktin zu binden und so bspw. eine Verbindung zwischen Transmembranproteinen und dem Aktin-Zytoskelett herzustellen [17]. Cheng et al. konnten erst kürzlich zeigen, dass sich in Neuronen von PRG 2-Knockout-Mäusen, d.h. in Nervenzellen, die kein PRG 2 exprimieren können, signifikant niedrigere Spiegel von phosphorylierten ERMs befinden [35]. Dieses Erkenntnis weist daraufhin, dass PRG 2 eine Rolle in der Phosphorylierung bzw. Aktivierung von ERMs spielt und eine Abwesenheit von PRG 2 in einer insgesamt reduzierten Aktivität der ERMs resultiert.

4.5.4 Die Rolle von extrazellulärem LPA in der Phosphorylierung von ERMs

Lyso-phosphatidsäure (LPA) ist ein bioaktives Phospholipid, das in der neuronalen Entwicklung eine wichtige Rolle in der kortikalen Migration und Apoptose von Nervenzellen spielt [4, 46]. Synthetisiert wird LPA aus Bestandteilen der Zellmembran von dem Enzym Autotaxin (ATX) während es durch eine De-Phosphorylierung über sogenannte Lipidphosphat-Phosphatasen (LPPs) inaktiviert wird. PRG 2 gehört zu einer neuen Klasse von Proteinen, den Plasticity-related genes, die mit LPA interagieren können und in ihrer Struktur Ähnlichkeiten zu den LPPs aufweisen [2].

Um eine Beteiligung von LPA an der Aktivierung der ERMs zu belegen, wurden die Auswirkungen von verschiedenen LPA-Konzentrationen auf die Aktivität der ERMs untersucht. Dabei zeigte sich bei höheren LPA-Konzentrationen (insbesondere bei einer Konzentration von 1 μ M LPA) eine signifikante Steigerung der Spiegel von phosphorylierten sprich aktivierten ERMs. Ebenso konnte in Experimenten mit HEK-Zellen, eine humane Zelllinie mit vielfacher Verwendung in der Biotechnologie, eine Zunahme der Interaktion von Radixin und PRG 2 nach Stimulation mit 1 μ M LPA für 15 Minuten im Vergleich zu LPA-freien Bedingungen nachgewiesen werden. Dieser stimulierende Effekt von LPA auf die Phosphorylierung von Radixin ließ sich ferner nur in Nervenzellen vom Wild-Typ jedoch nicht in Neuronen von PRG 2-Knockout-Mäusen nachweisen. Folglich spielt PRG 2 eine entscheidende Rolle in der durch LPA induzierten Phosphorylierung bzw. Aktivierung von Radixin, wobei die genauen Mechanismen bisher noch unbekannt sind [35].

5 Zusammenfassung

PRG 2 gehört zu einer neuen Proteinfamilie, den Plasticity related genes (PRGs). Es handelt sich um Transmembranproteine, die vorwiegend in Gehirnen von Wirbeltieren vorkommen. PRG1 und PRG 2 verfügen über eine C-terminale intrazelluläre Domäne von ca. 400 Aminosäuren Länge zur Interaktion mit intrazellulären Interaktionspartnern [2, 3, 47]. Die Suche nach intrazellulären Protein-Interaktionspartnern von PRG 2 war zentraler Bestandteil dieser Arbeit.

PRG 2 wird vor allem in der embryonalen Phase in Regionen der Neurogenese gebildet, postnatal nimmt die Expression von PRG 2 stufenweise ab (vgl. Abb. 1) [unpublizierte Daten, AG Nitsch]. In einem modifizierten Y2H-Verfahren wurden zunächst potenzielle intrazelluläre Protein-Interaktionspartner von PRG 2 identifiziert [14]. Es ergaben sich insgesamt sechs potentielle Protein-Interaktionspartner von PRG 2: Radixin (murin), DDX 5, DCAF 8, BAT3 und Striatin 4 und ANKS1B (human). Die potenziellen Interaktionen mit ANKS1B, BAT 3 und Striatin 4 wurden nicht weiterverfolgt.

Die Ergebnisse des Y2H galt es nun mit weiterführenden Untersuchungen zu verifizieren. Hierfür wurden für diese Arbeit Ko-Immünpräzipitationen (Ko-IPs) mit den betreffenden Proteinen durchgeführt.

Dafür wurde zunächst ein Zelllysats aus den Gehirnen von Mäuseembryonen von E16 bis E18, dem Höhepunkt der PRG 2-Expression, hergestellt. Zum Zellaufschluss wurden die Detergenzien Triton X-100 und SDS verwendet. Die im Anschluss durchgeführte Ko-IP ist ein molekularbiologisches Verfahren, bei dem versucht wird, zwei interagierende Proteine über einen spezifischen Antikörper, Protein G und Sepharose von den restlichen gelösten Bestandteilen des Zelllysats zu separieren [38]. Im letzten Schritt wurden die beiden Protein-Interaktionspartner mittels Gelelektrophorese, Western Blot und Immundetektion nachgewiesen [32, 34].

Bei den durchgeführten Versuchen konnte eine Interaktion von PRG 2 mit DDX 5 und DCAF 8 mittels Ko-IP nicht bestätigt werden (s. Abb. 11 und 12). Da es sich bei DDX 5 um ein intranukleäres Protein mit überwiegend mesenchymaler Expression handelt [27, 39, 40], ist eine Interaktion mit dem neuronalen Transmembranprotein PRG 2 ohnehin eher unwahrscheinlich. DCAF 8 ist ein ubiquitär vorkommendes Protein in Eukaryoten mit vielfältigen intrazellulären Funktionen, eine Interaktion von PRG 2 und DCAF 8 war aus physiologischer Sicht demnach nicht unwahrscheinlich [21-23].

Für PRG 2 und Radixin ließ sich eine Interaktion in beide Richtungen erfolgreich nachweisen (s. Abb. 10). Die Ko-IP unter der Verwendung von Anti-Radixin als Primärantikörper und dem

darauffolgenden Nachweis von PRG 2 im Eluat wurde bereits publiziert [35]. Dieses Ergebnis konnte auch immunhistochemisch durch den Nachweis einer zellulären Kolo­kalisierung von PRG 2 und Radixin in axonalen Fasern der Capsula interna von Mäusen an E14 bestätigt werden (s. Abb. 14).

Radixin gehört mit Ezrin und Moesin zu einer Proteinfamilie, den ERMs. Die ERMs kommen im Zytoplasma von Eukaryoten vor und sind bekannt für ihre Verbindungsfunktion zwischen Membranproteinen und dem Aktinkortex des Zytoskeletts [16, 17].

Mintz et al. konnten zeigen, dass die ERMs in Nagetieren vor allem an E17 in aussprossenden neuronalen Fortsätzen exprimiert werden, ebenso wie PRG 2. Postnatal nehmen sowohl die Expression der ERMs als auch die Expression von PRG 2 drastisch ab [18] [unpublizierte Daten, AG Nitsch]. Weiterhin kolo­kalisieren die ERMs in Axonen der Intermediärzone mit L1, einem neuronalen Zelladhäsionsmolekül [18]. L1 ist bekannt für seine essentielle Rolle in der neuronalen Migration und der Lenkung von aussprossenden Axonen, sogenannten Wachstumskegeln [43]. Durch weitere Untersuchungen schlussfolgerten Mintz et al., dass die ERMs pränatal für die Verbindung von L1 mit den Aktinfilamenten des Zytoskeletts verantwortlich sind [18].

In der Publikation von Cheng et al. wurde die PPI zwischen Radixin und PRG 2 aufgegriffen und vertiefende funktionelle Untersuchungen durchgeführt. Hierbei konnten sie bspw. zeigen, dass L1 in der thalamokortikalen Projektion von Mäusen an E16 auch mit PRG 2 kolo­kalisiert. Ein homozygoter Knockout von PRG 2 führte zu empfindlichen Abweichungen des axonalen Verlaufs in eben dieser Projektion, die Nervenzellen des Thalamus mit der Hirnrinde verbindet. Ein homozygoter Radixin-Knockout führte interessanterweise zum selben Phänotyp. Die Wiederherstellung der Genfunktion von PRG 2 resultierte wiederum in einer Regeneration der thalamokortikalen Projektion. Im Rahmen einer histochemischen Untersuchung mit stärkerer Vergrößerung kolo­kalisieren PRG 2 und Radixin auch in den durch Aktin gebildeten Wachstumskegeln der Axone bzw. Dendriten [35].

In Zusammenschau der Daten kann angenommen werden, dass PRG2 durch einen äußeren Stimulus direkt oder über weitere Zwischenschritte an Radixin bindet und dieses aktiviert. Nun kann Radixin z.B. über L1 mit Aktinfilamenten interagieren und Einfluss auf die Motilität eines neuronalen Zellfortsatzes nehmen. PRG 2 und Radixin scheinen embryonal eine wichtige Rolle in der anatomischen Entwicklung des zentralen Nervensystems zu haben.

6 Literaturverzeichnis

1. Brindley, D.N. and D.W. Waggoner, *Mammalian lipid phosphate phosphohydrolases*. J Biol Chem, 1998. **273**(38): p. 24281-4.
2. Brauer, A.U., et al., *A new phospholipid phosphatase, PRG-1, is involved in axon growth and regenerative sprouting*. Nat Neurosci, 2003. **6**(6): p. 572-8.
3. Brindley, D.N., *Lipid phosphate phosphatases and related proteins: signaling functions in development, cell division, and cancer*. J Cell Biochem, 2004. **92**(5): p. 900-12.
4. Kingsbury, M.A., et al., *Non-proliferative effects of lysophosphatidic acid enhance cortical growth and folding*. Nat Neurosci, 2003. **6**(12): p. 1292-9.
5. Moolenaar, W.H., L.A. van Meeteren, and B.N. Giepmans, *The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling*. Bioessays, 2004. **26**(8): p. 870-81.
6. Benesch, M.G., et al., *Autotaxin in the crosshairs: taking aim at cancer and other inflammatory conditions*. FEBS Lett, 2014. **588**(16): p. 2712-27.
7. Brindley, D.N., F.T. Lin, and G.J. Tigyi, *Role of the autotaxin-lysophosphatidate axis in cancer resistance to chemotherapy and radiotherapy*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1831**(1): p. 74-85.
8. Umezū-Goto, M., et al., *Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production*. J Cell Biol, 2002. **158**(2): p. 227-33.
9. Koike, S., et al., *Autotaxin is required for the cranial neural tube closure and establishment of the midbrain-hindbrain boundary during mouse development*. Dev Dyn, 2011. **240**(2): p. 413-21.
10. Koike, S., K. Keino-Masu, and M. Masu, *Deficiency of autotaxin/lysophospholipase D results in head cavity formation in mouse embryos through the LPA receptor-Rho-ROCK pathway*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **400**(1): p. 66-71.
11. van Meeteren, L.A., et al., *Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(13): p. 5015-22.
12. Fields, S. and O. Song, *A novel genetic system to detect protein-protein interactions*. Nature, 1989. **340**(6230): p. 245-6.
13. Horwitz, J.P., et al., *SUBSTRATES FOR CYTOCHEMICAL DEMONSTRATION OF ENZYME ACTIVITY. I. SOME SUBSTITUTED 3-INDOLYL-BETA-D-GLYCOPYRANOSIDES*. J Med Chem, 1964. **7**: p. 574-5.
14. Stelzl, U., et al., *A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome*. Cell, 2005. **122**(6): p. 957-68.
15. McClatchey, A.I., *ERM proteins at a glance*. J Cell Sci, 2014. **127**(Pt 15): p. 3199-204.
16. Fehon, R.G., A.I. McClatchey, and A. Bretscher, *Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(4): p. 276-87.
17. Hamada, K., et al., *Structural basis of the membrane-targeting and unmasking mechanisms of the radixin FERM domain*. EMBO J, 2000. **19**(17): p. 4449-62.
18. Mintz, C.D., et al., *ERMs colocalize transiently with L1 during neocortical axon outgrowth*. J Comp Neurol, 2003. **464**(4): p. 438-48.
19. Kitajiri, S., et al., *Radixin deficiency causes deafness associated with progressive degeneration of cochlear stereocilia*. J Cell Biol, 2004. **166**(4): p. 559-70.
20. Xu, C. and J. Min, *Structure and function of WD40 domain proteins*. Protein Cell, 2011. **2**(3): p. 202-14.
21. Li, D. and R. Roberts, *WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases*. Cell Mol Life Sci, 2001. **58**(14): p. 2085-97.
22. Stirnimann, C.U., et al., *WD40 proteins propel cellular networks*. Trends Biochem Sci, 2010. **35**(10): p. 565-74.
23. Smith, T.F., *Diversity of WD-repeat proteins*. Subcell Biochem, 2008. **48**: p. 20-30.

24. Wu, F., et al., *Characterization of nuclear import and export signals determining the subcellular localization of WD repeat-containing protein 42A (WDR42A)*. FEBS Lett, 2012. **586**(8): p. 1079-85.
25. Lee, J. and P. Zhou, *DCAFs, the Missing Link of the CUL4-DDB1 Ubiquitin Ligase*. Molecular Cell, 2007. **26**(6): p. 775-780.
26. Pickart, C.M. and M.J. Eddins, *Ubiquitin: structures, functions, mechanisms*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1695**(1-3): p. 55-72.
27. Fuller-Pace, F.V., *The DEAD box proteins DDX5 (p68) and DDX17 (p72): multi-tasking transcriptional regulators*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1829**(8): p. 756-63.
28. Rumpf, H., *Die Einzelkornzerkleinerung als Grundlage einer technischen Zerkleinerungswissenschaft*. Chemie Ingenieur Technik, 1965. **37**(3): p. 187-202.
29. Rehm, H. and T. Letzel, *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*, in *Experimentator*. 2016, Imprint: Springer Spektrum: Berlin, Heidelberg.
30. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
31. Gornall, A.G., C.J. Bardawill, and M.M. David, *Determination of serum proteins by means of the biuret reaction*. J Biol Chem, 1949. **177**(2): p. 751-66.
32. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
33. Berg, J.M., J.L. Tymoczko, and L. Stryer, *Biochemistry*. 5th ed. 2002, New York: W. H. Freeman and Company.
34. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
35. Cheng, J., et al., *Precise Somatotopic Thalamocortical Axon Guidance Depends on LPA-Mediated PRG-2/Radixin Signaling*. Neuron, 2016. **92**(1): p. 126-142.
36. Trimbuch, T., et al., *Synaptic PRG-1 modulates excitatory transmission via lipid phosphate-mediated signaling*. Cell, 2009. **138**(6): p. 1222-35.
37. Brauer, A.U. and R. Nitsch, *Plasticity-related genes (PRGs/LRPs): a brain-specific class of lysophospholipid-modifying proteins*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1781**(9): p. 595-600.
38. Stynen, B., et al., *Diversity in Genetic *In Vivo* Methods for Protein-Protein Interaction Studies: from the Yeast Two-Hybrid System to the Mammalian Split-Luciferase System*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2012. **76**(2): p. 331-382.
39. Jensen, E.D., et al., *p68 (Ddx5) interacts with Runx2 and regulates osteoblast differentiation*. J Cell Biochem, 2008. **103**(5): p. 1438-51.
40. Caretti, G., et al., *The RNA helicases p68/p72 and the noncoding RNA SRA are coregulators of MyoD and skeletal muscle differentiation*. Dev Cell, 2006. **11**(4): p. 547-60.
41. Kunda, P., et al., *Moesin controls cortical rigidity, cell rounding, and spindle morphogenesis during mitosis*. Curr Biol, 2008. **18**(2): p. 91-101.
42. Stoffel, M.H., *7 Embryonalentwicklung und definitive Gestalt des Zentralnervensystems (I)*, in *Funktionelle Neuroanatomie für die Tiermedizin*, M.H. Stoffel, Editor. 2011, Enke Verlag: Stuttgart.
43. Schmid, R.S. and P.F. Maness, *L1 and NCAM adhesion molecules as signaling coreceptors in neuronal migration and process outgrowth*. Curr Opin Neurobiol, 2008. **18**(3): p. 245-50.
44. Pickles, J.O., *An introduction to the physiology of hearing*. 2012.
45. Kandel, E.R., *Principles of neural science*. 5th ed. 2013, New York: McGraw-Hill.
46. Fukushima, N., J.A. Weiner, and J. Chun, *Lysophosphatidic acid (LPA) is a novel extracellular regulator of cortical neuroblast morphology*. Dev Biol, 2000. **228**(1): p. 6-18.
47. Sigal, Y.J., M.I. McDermott, and A.J. Morris, *Integral membrane lipid phosphatases/phosphotransferases: common structure and diverse functions*. Biochem J, 2005. **387**(Pt 2): p. 281-93.

48. Tokumitsu, H., et al., *Identification and characterization of PRG-1 as a neuronal calmodulin-binding protein*. *Biochem J*, 2010. **431**(1): p. 81-91.

7 Anhang

Einhaltung der ethischen Vorgaben zu Tierversuchen:

Für diese Arbeit wurde mit Tieren bzw. Mäusen gearbeitet. Die Vorgaben der Ethik-Kommission, gemäß Tierschutzgesetz und gemäß Gentechnikgesetz in ihrer jeweils geltenden Fassung wurden zur Kenntnis genommen und ihre Grundsätze bei der wissenschaftlichen Arbeit eingehalten.

8 Danksagung

Ich bedanke mich bei xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx, xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx und xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx für die Betreuung und Unterstützung im Rahmen dieser Dissertation.

Außerdem möchte ich speziell xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx für die Ermöglichung meines Stipendiums bei der Studienstiftung des deutschen Volkes sowie des Promotionsstipendiums danken.

Weiterhin bedanke ich mich bei den wissenschaftlichen Mitarbeitern der ehemaligen AG xxxxx an der Uniklinik Mainz für ihre tatkräftige und moralische Mithilfe.

Großer Dank gilt auch xxxxxxxxxxx für seine Unterstützung, Geduld und stoische Ruhe.

Ich danke meinen Eltern für die Freiheiten und Möglichkeiten während meines Lebensweges.

Abschließend bedanke ich mich bei meinen Großeltern xxxxxxx und xxxxxxxxxxx und xxxxxxx xxxxxx für ihre Weisheit, Liebe und Verlässlichkeit.

9 Tabellarischer Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen gelöscht.

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen gelöscht.