

**Untersuchung der räumlichen Expression und
subzellulären Lokalisation von CtBP1/BARS50- und CtBP2-
Isoformen im adulten Nagerhirn**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)**

**genehmigt durch
die Fakultät für Naturwissenschaften der
Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg**

**von Diplom-Biologin Diana Hübler
geboren am 21. Dezember 1982 in Magdeburg**

**Gutachter: Prof. Dr. Eckart D. Gundelfinger
Leibniz Institut für Neurobiologie**

**Prof. Dr. med. Frank Schmitz
Universitätsklinikum des Saarlandes in Homburg/Saar**

Eingereicht am 18.06.2012

Verteidigung am 11.12.2012

Danksagung

Die Arbeit entstand in den Jahren 2007 bis 2011 in der Abteilung Neurochemie und Molekularbiologie des Leibniz-Instituts für Neurobiologie in Magdeburg.

Prof. Dr. Eckart D. Gundelfinger danke ich für seine Diskussionsbereitschaft und für die Möglichkeit, der Arbeit an einem so spannenden und vielseitigen Projekt.

Mein besonderer Dank geht an Dr. Anna Fejtova und Dr. Wilko D. Altrock für die Betreuung meiner Arbeit sowie für ihre Diskussionsbereitschaft und ihre Unterstützung.

Dr. Karin Richter danke ich für die Bereitstellung der immun-elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Dr. Karl-Heinz Smalla und Kathrin Pohlmann danke ich für die Unterstützung bei der 2D-Gelelektrophorese.

Allen Mitgliedern der Bassoon-Gruppe danke ich für die fruchtbaren Diskussionen, die Unterstützung und die nette Atmosphäre im Labor.

Ein herzliches Dankeschön gilt Bettina Kracht, Heidi Wickborn, Janina Juhle und Sabine Opitz für die vielen großen und kleinen Hilfen im Labor, bei den unterschiedlichsten Projekten.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Mitdoktoranden Marie Woldeit, Nora John, Nicole Reichenbach und Xenia Gorny für die tolle Atmosphäre im Büro, die vielen hilfreichen Diskussionen und die Aufmunterungen.

Zuletzt möchte ich meiner Familie für ihre immerwährende Unterstützung danken. Dabei danke ich vor allem meinem Mann André und meinem Sohn Jack für ihr Verständnis und die Kraft die sie mir gegeben haben.

Zusammenfassung

Die Proteine der **C-terminalen Bindungs-Protein-Familie** sind in Pflanzen und Tieren konserviert. Das Wirbeltier-Genom enthält dabei zwei CtBP-Gene, CtBP1 und CtBP2, deren Proteinprodukte unter anderem an der Regulation der embryonalen Entwicklung, der Apoptose, der Onkogenese und der aktivitäts-abhängigen Genexpression beteiligt sind. Das CtBP1-Gen codiert für zwei Haupt-Transkripte, CtBP1-L und CtBP1-S/BARS50. Die CtBP1-L-Isoform ist das Gründungsmitglied der CtBP-Proteinfamilie und ist hauptsächlich als Transkriptions-Ko-Repressor einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren bekannt. CtBP1-S/BARS50 wurde dagegen als cytosolisches Protein identifiziert, wo es an verschiedenen Abschnürungsprozessen vom Golgi-Apparat und der regulierten Golgi-Fragmentierung vor dem Eintritt in die Mitose beteiligt ist. Zudem konnte CtBP1/BARS50 als Bestandteil der CAZ konventioneller chemischer Synapsen identifiziert werden, wobei die exakte molekulare Natur des synaptischen CtBP1/BARS50 unklar ist.

Das CtBP2-Gen codiert für drei Transkripte. CtBP2, einem Zellkern-ständigen Transkriptions-Ko-Repressor, CtBP2-S, einem cytosolischem Protein mit noch unklarer Funktion, und RIBEYE, einem Hauptbestandteil in Bandsynapsen der Photorezeptor- und Bipolar-Zellen der Retina, in Pinealocyten der Epiphyse und in inneren Haarzellen der Cochlea. CtBP2 und CtBP2-S zeigen dabei eine sehr hohe Sequenz-Ähnlichkeit zu CtBP1/BARS50.

Unklar ist, wie die Mitglieder der CtBP-Proteinfamilie in den Hirnarealen des adulten Nagerhirns exprimiert werden, und ob CtBP1-L, CtBP1-S/BARS50, CtBP2 und CtBP2-S spezifisch in einem Zellkompartiment lokalisiert sind oder sowohl nukleäre als auch cytosolische Lokalisationen im Neuron zeigen.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit standen die Untersuchung des Expressionsmusters der Mitglieder der CtBP1/BARS50- und CtBP2-Proteinfamilie im adulten Gehirn und die Untersuchung des subzellulären Verteilungsmusters der CtBP-Proteine in Neuronen.

Die Untersuchung des Expressionsmusters der CtBP-Proteine im adulten Gehirn zeigte ein individuelles Expressionsmuster der CtBP1/BARS50- und CtBP2-Proteine. Dabei unterscheiden sich die Proteinprodukte beider Gene in ihren räumlichen Expressionen, dem Expressionsniveau in den einzelnen Hirnarealen und ihrer Zelltyp-spezifischen Expression.

Die Untersuchung der subzellulären Verteilung der CtBP1/BARS50-Proteine ergab, dass alle Isoformen sowohl im Zellkern als auch den Synapsen lokalisiert sind. Das CtBP1/BARS50 in der Synaptosomen-Fraktion, im Vergleich zur Zellkern-Fraktion, aber in größeren Mengen vorkommt.

Für die CtBP2-Proteine kann hier erstmals eine Lokalisation an konventionellen chemischen Synapsen beschrieben werden. Gleichzeitig zeigen immun-elektronenmikroskopische Aufnahmen, dass die synaptische CtBP2-Lokalisation auf den Bereich um die aktive Zone beschränkt ist. Grundsätzlich sind aber CtBP2-Proteine in der Zellkern-Fraktion, im Vergleich zur Synaptosomen-Fraktion, stärker angereichert. Zudem kann hier gezeigt werden, dass die beiden CtBP2-Isoformen, CtBP2 und CtBP2-S, unterschiedliche subzelluläre Verteilungen aufweisen. Wobei CtBP2 fast vollständig im Zellkern, CtBP2-S dagegen sowohl im Zellkern als auch in Synapsen lokalisiert ist.

Auch die durchgeführte 2D-gelelektrophoretische Analyse von CtBP1/BARS50 in den Zellkern- und Synaptosomen-Fraktionen bestätigt die synaptische Lokalisation der CtBP1-L- und CtBP1-S/BARS50-Isoformen und zeigt gleichzeitig, dass die CtBP1/BARS50-Isoformen in beiden Fraktionen unterschiedlich phosphoryliert sind.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass sich die CtBP1/BARS50- und CtBP2-Isoformen in ihren Hirnareal- und Zelltyp-spezifischen Expressionsmustern, ihrem Expressionsniveau und ihren subzellulären Verteilungen unterscheiden. Gleichzeitig kann für die Mitglieder der CtBP-Proteinfamilie, außer CtBP2 selbst, sowohl eine nukleäre als auch synaptische Lokalisation gezeigt werden. Dies wiederum stellt die Grundlage für weiterführende Untersuchungen der synaptischen Funktionen der Mitglieder der CtBP-Proteinfamilie dar.

Summary

The family of **C-terminal binding proteins** is uniquely found in plants and in animals. Vertebrates contain two genes, CtBP1 and CtBP2, whose protein products are involved in embryogenesis, apoptosis, oncogenesis and activity-dependent gene expression. The CtBP1 gene codes for two isoforms of CtBP1: CtBP1-L and CtBP1-S/BARS50. The founding member of the CtBP family, CtBP1-L, has been extensively studied as transcriptional co repressor of a large number of transcriptional factors. The short isoform, CtBP1-S/BARS50, was first identified as a cytosolic protein. Here it is necessary for several membrane fission steps at the Golgi apparatus and the fragmentation of the Golgi complex at the beginning of mitosis. Furthermore, a synaptic localization of CtBP1/BARS50 could be demonstrated, but the exact molecular nature of synaptically localized CtBP1/BARS50 is unknown.

The CtBP2 gene gives rise to three isoforms. The two isoforms CtBP2, a nuclear co repressor and CtBP2-S, a cytosolic protein with unknown function exhibit high homology to the isoforms of the CtBP1/BARS50 family proteins. A third isoform, RIBEYE, is a major constituent of ribbon synapses in retinal photoreceptors and bipolar cells, inner hair cells of the cochlea or pinealocytes of epiphysis.

After all, it remained unknown, how the members of the CtBP protein family are distributed in the adult brain and if CtBP1-L, CtBP1-S/BARS50, CtBP2 and CtBP2-S exhibit specific cellular localizations or if they localize both to the nucleus and the cytosol in neurons.

Therefore the main objective of this doctoral thesis was to analyze the protein expression patterns of CtBP1/BARS50 and CtBP2 proteins in the adult mouse brain and their subcellular distribution in neurons.

Analysis of the spatial expression pattern in the adult mouse brain demonstrated that CtBP1/BARS50 and CtBP2 proteins display individual expression patterns, differing in their spatial and cell-specific expression as well as their expression levels throughout different brain areas.

Analysis of the subcellular distribution of CtBP1/BARS50 demonstrated that all CtBP1/BARS50 isoforms show dual synapto-nuclear localization in neurons, with CtBP1/BARS50 more enriched in the synaptosomal as compared to the nuclear protein fraction.

This is the first study demonstrating that CtBP2 is localized at conventional chemical synapses. Furthermore, immune electron microscopy visualizations revealed that this synaptic localization of CtBP2 is restricted to the close vicinity of presynaptic active zones. Principally, CtBP2 is more strongly enriched in the nuclear fraction compared to the synaptosomal fraction. Moreover, the present work includes differential targeting of the two isoforms CtBP2 and CtBP2-S in neurons, showing predominant CtBP2 in cell nuclei and dual CtBP2-S synapto-nuclear localization.

Two-D-gel analysis of synaptosomal and nuclear fractions revealed that both CtBP1/BARS50 isoforms are synaptically localized and that CtBP1/BARS50 is highly phosphorylated in both fractions.

In summary, the present work shows that CtBP1/BARS50 and CtBP2 differ in their spatial and cell specific expression patterns, in their expression levels as well as in their subcellular distributions. In parallel it could be shown that all members of the CtBP protein family except for CtBP2, exhibit dual synaptic and nuclear localization. These findings represent the basis for further analysis of the synaptic function of members of the CtBP protein family.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 DIE CTBP-PROTEINFAMILIE	1
1.2 GENERELLE STRUKTUR DER MITGLIEDER DER CTBP-PROTEINFAMILIE.....	2
1.3 SUBZELLULÄRE LOKALISATIONEN DER CTBP-PROTEINE.....	5
1.3.1 Lokalisation im Zellkern.....	5
1.3.2 Lokalisation am Golgi-System.....	6
1.3.3 Lokalisation an chemischen Synapsen.....	7
1.4 POSTTRANSLATIONALE MODIFIKATIONEN UND BINDUNGSPARTNER VON CTBP-PROTEINEN, DIE EINEN EINFLUSS AUF DIE CTBP- LOKALISATIONEN UND -FUNKTIONEN HABEN	11
1.4.1 SUMOylierung und Bindung der neuronalen NO-Synthase.....	11
1.4.2 Phosphorylierungen	12
1.4.3 Weitere posttranslationale Modifikationen	13
1.5 ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNGEN DER ARBEIT.....	14
2. MATERIAL & METHODEN	15
2.1 CHEMIKALIEN	15
2.1.1 Bakterienmedien und Antibiotika.....	15
2.1.2 Bakterienstämme und Zelllinien	15
2.1.3 Kulturmedien und Medienzusätze für Hefen	16
2.1.4 Kits, Enzyme und spezielle Reagenzien	16
2.1.5 Pufferlösungen	16
2.1.6 Medien, Zusätze und Reagenzien für die Zellkultur.....	17
2.1.7 Molekulargewichtsmarker.....	17
2.1.8 Antikörper.....	18
2.1.9 Vektoren und Expressionskonstrukte.....	20
2.1.10 Primer.....	20
2.2 PROTEINBIOCHEMIE.....	21
2.2.1 Fraktionierungen.....	21
2.2.1.1 Isolation von Zellkernen.....	21
2.2.1.2 Isolation von Synaptosomen.....	22
2.2.1.3 Isolierung von kernfreien Membran-Pellets (P2) aus verschiedenen Hirnarealen des Maushirn..	23
2.2.2 Probenaufbereitung für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	24
2.2.2.1 Probenaufbereitung für die denaturierende SDS-PAGE mittels TCA-Fällung	24
2.2.2.2 Probenaufbereitung für die Zweidimensionale SDS-PAGE mittels Aceton-Fällung.....	25
2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration	25
2.2.3.1 Proteinquantifizierung mit der Bradford-Methode	25
2.2.3.2 Proteinquantifizierung mit der Amidoschwarz-Methode.....	25
2.2.4 Denaturierende SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen	26
2.2.4.1 Denaturierende SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen nach Laemmli	26
2.2.4.2 Denaturierende SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen nach dem Tris-Acetat-System ..	27
2.2.5 Proteinnachweis im SDS-Gel mittels Coomassie-Färbung.....	27
2.2.6 Western-Blot-Transfer und Ponceau S-Färbung.....	28
2.2.7 Immundetektion mittels ECL	28
2.2.8 Immundetektion mit Fluoreszenzfarbstoffen	29
2.2.9 Zweidimensionale Gel-Elektrophorese	29
2.2.10 Probenaufbereitung für die massenspektroskopische Analyse	30
2.3. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	30
2.3.1 Präparation und Transformation chemisch kompetenter Zellen E.coli XL10-Gold.....	30
2.3.2 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien	30
2.3.3 Restriktionsverdau.....	31
2.3.4 Nichtdenaturierende Agarosegelelektrophorese und Isolierung von DNA aus Agarose Gelen	31
2.3.5 Ligation eines Fragments mit dem entsprechenden Vektor.....	32
2.3.6 Hitzeschock Transformation von E.coli XL10-Gold-Zellen.....	32
2.3.7 Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Generierung von DNA-Fragmenten	32
2.4 ZELLKULTUR UND IMMUNCYTOCHEMIE	33
2.4.1 Zellkultur von HEK293T-Zellen	33

2.4.2	<i>Transfektion von HEK293T-Zellen mit Hilfe der Calciumphosphat-Methode und Herstellung von Lysaten</i>	33
2.4.3	<i>Präparation von Gliazellkulturen aus Ratten</i>	34
2.4.4	<i>Primäre hippocampale Neuronenkulturen von Ratten</i>	34
2.4.5	<i>Transfektion von hippocampalen Primärkulturneuronen mit Hilfe der Calciumphosphat-Methode</i>	34
2.4.6	<i>Immuncytochemie von hippocampalen Primärkulturneuronen aus Rattenhirn</i>	35
2.4.7	<i>Immun-Elektronenmikroskopie</i>	35
2.4.8	<i>Immunhistochemie adulter Maushirnschnitte</i>	36
3.	ERGEBNISSE	37
3.1.	UNTERSUCHUNG DER RÄUMLICHEN EXPRESSION UND SUBZELLULÄREN LOKALISATION VON CTBP1/BARS50- UND CTBP2-ISOFORMEN.....	37
3.1.1	<i>Herstellung eines Antikörpers gegen den spezifischen N-Terminus von CtBP1-L</i>	38
3.1.2	<i>CtBP1/BARS50 und CtBP2/RIBEYE sind in der gereinigten Synaptosomen-Fraktion angereichert</i>	40
3.1.3	<i>Untersuchung der CtBP1/BARS50- und CtBP2/RIBEYE-Antikörper auf Kreuzreaktivität</i> ..	42
3.1.3.1	Untersuchung der monoklonalen und polyklonalen CtBP1/BARS50-Antikörper.....	42
3.1.3.2	Untersuchung des monoklonalen, polyklonalen CtBP2/RIBEYE- und des RIBEYE A-Domänen-Antikörpers.....	44
3.1.4	<i>Untersuchung der räumlichen und Zelltyp-spezifischen Expressionsmuster von CtBP1/BARS50 und CtBP2 im adulten Maushirn</i>	46
3.1.4.1	Immunhistochemie von Maus-Hirnschnitten mit CtBP1/BARS50- und CtBP2/RIBEYE-Antikörpern.....	46
3.1.4.2	Biochemische Untersuchung der CtBP1/BARS50- und CtBP2-Expression im adulten Maushirn	52
3.1.4.3	Untersuchung der CtBP1/BARS50- und CtBP2-Expression in inhibitorischen und exzitatorischen Neuronen.....	56
3.1.5	<i>Biochemische Untersuchung des subzellulären Lokalisationsmusters bekannter CtBP1/BARS50- und CtBP2- Isoformen im adulten Maushirn</i>	58
3.1.5.1	Quantitative biochemische Untersuchung des Verteilungsmusters bekannter CtBP1/BARS50- und CtBP2/RIBEYE-Isoformen in Zellkernen und Synaptosomen.....	58
3.1.5.2	Quantitative biochemische Untersuchung der Synaptosomen- und Zellkern-Verteilung von CtBP2 in Cerebellum und Cortex.....	62
3.1.6	<i>Ultrastrukturelle und mikroskopische Untersuchungen der subzellulären Lokalisationsmuster bekannter CtBP1/BARS50- und CtBP2-Isoformen</i>	65
3.1.6.1	Ultrastrukturelle Untersuchung der synaptischen CtBP1/BARS50- und CtBP2-Lokalisation in der Molekularschicht des Kleinhirn-Cortexes.....	65
3.1.6.2	Mikroskopische Untersuchung der CtBP1/BARS50-Verteilung in hippocampalen Primärkulturneuronen.....	67
3.1.6.3	Mikroskopische Untersuchung der CtBP2-Lokalisation in hippocampalen Primärkulturneuronen	69
3.1.6.4	Mikroskopische Untersuchung der CtBP2-Lokalisation am trans-Golgi-Netzwerk hippocampaler Primärkulturneuronen.....	71
3.1.7	<i>Immuncytochemische Untersuchungen von hippocampalen Primärkultur-Neuronen, welche ein intern Myc-markiertes CtBP1-S/BARS50-Konstrukt oder am N-Terminus mit EGFP-markierte CtBP2-Konstrukte exprimieren</i>	72
3.1.7.1	CtBP1-S/BARS50-Konstrukt mit interner Myc-Markierung.....	72
3.1.7.2	CtBP2-Konstrukte mit N-terminaler EGFP-Markierung.....	74
3.1.8	<i>2D-gelelektrophoretische Analyse der CtBP1/BARS50-Isoformen in Synaptosomen und Zellkernen</i>	76
4.	DISKUSSION	79
4.1	DIE PROTEINE DER CTBP1/BARS50- UND CTBP2-FAMILIE UNTERSCHIEDEN SICH IM ADULTEN GEHIRN IN IHREN RÄUMLICHEN EXPRESSIONSMUSTERN, IHREN EXPRESSIONSNIVEAUS UND IHRER ZELLTYP-SPEZIFISCHEN EXPRESSION.....	79
4.2	SIND EINZELNE MITGLIEDER DER CTBP-PROTEINFAMILIE IN NEURONEN SPEZIFISCH FÜR EIN ZELLKOMPARTIMENT?.....	81
4.2.1	<i>Alle untersuchten CtBP1/BARS50- und CtBP2-Isoformen können im Zellkern vorkommen</i>	81
4.2.2	<i>Ist CtBP1-S/BARS50 an Golgi-Outposts und CtBP2-S am Golgi-Apparat lokalisiert?</i>	83
4.2.3	<i>CtBP1-L, CtBP1-S/BARS50 und CtBP2-S sind an konventionellen chemischen Synapsen lokalisiert</i>	85
4.2.3.1	Gibt es Hinweise zu Synapsen-spezifischen posttranslationalen Modifikationen und deren möglichen Regulation der synaptischen CtBP1/BARS50-Funktion?.....	85

4.2.3.2 CtBP2 ist ein synaptisches Protein, dass möglicherweise an der präsynaptischen Endocytose oder der Kommunikation von der Synapse zum Zellkern beteiligt ist	89
4.3 <i>Ausblick</i>	92
5. LITERATUR	93
6. ABKÜRZUNGEN	98
7. ERKLÄRUNG ZUR EIGENSTÄNDIGEN ABFASSUNG DER ARBEIT	100
8. LEBENS LAUF	101

1. Einleitung

1.1 Die CtBP-Proteinfamilie

Die Proteine der CtBP-Familie sind in höheren Eukaryonten konserviert. Dabei enthält das Genom wirbelloser Tiere und Pflanzen jeweils ein CtBP-Gen während das Wirbeltier-Genom zwei Gene für CtBP, CtBP1 und CtBP2, besitzt.

Aus dem CtBP1-Gen entstehen aufgrund unterschiedlicher RNA-Spleiß-Vorgänge zwei Haupt-CtBP1-Transkripte. Die von den beiden Transkripten codierten Isoformen, CtBP1-L und CtBP1-S/BARS50, sind bis auf ihre N-Termini identisch (siehe Abbildung 1). CtBP1-L wurde erstmals als Bindungspartner des C-Terminus von Adenovirus E1A, einem Onkoprotein, identifiziert (Boyd et al., 1993, Schaeper et al., 1995) und aus dieser ersten Identifikation des Proteins leitet sich auch der Name CtBP (C-terminales Bindungs-Protein) ab. Neben seiner Zellkern-ständigen Funktion als Korepressor verschiedener Transkriptionsfaktoren (Turner and Crossley, 2001, Chinnadurai, 2002), konnte für CtBP1/BARS50 auch eine Lokalisation an Band-Synapsen und konventionellen chemischen Synapsen (tom Dieck et al., 2005) gezeigt werden. Die exakte molekulare Natur des synaptischen CtBP1/BARS50 ist dagegen noch unklar. Die kürzere Isoform, CtBP1-S/BARS50, wurde zudem als Brefeldin A-abhängiges ADP-Ribosylierungs-Substrat von 50 kDa (BARS50) am Golgi-Apparat identifiziert (De Matteis et al., 1994, Di Girolamo et al., 1995, Spano et al., 1999). Für CtBP1-S/BARS50 ist zudem noch eine weitere Spleiß-Variante, CtBP1-SS, identifiziert worden (nicht publiziertes Material, (Knoll, 2007)). Dem Transkript dieser Isoform werden durch einen alternativen Spleiß-Vorgang am 3'-Ende mehrere Basen-Paare entfernt, sodass der Isoform 40 Aminosäuren (Positionen 387-427 in CtBP1-L und Positionen 376-416 in CtBP1-S/BARS50, beide aus *Rattus norvegicus*) am C-Terminus des Proteins fehlen (Abbildung 1). Die Funktion und das Verteilungsmuster dieser Isoform sind bis jetzt noch unbekannt. Zusätzlich dazu enthält ein Teil der CtBP1-cDNAs ein weiteres Codon für die Aminosäure Serin (an Position 380 in CtBP1-L, an Position 369 in CtBP1-S/BARS50 und CtBP1-SS), was ebenfalls das Resultat alternativer RNA-Prozessierung ist (Chinnadurai, 2007).

Das CtBP2-Gen codiert für drei funktionell sehr unterschiedliche Produkte, CtBP2 (Katsanis and Fisher, 1998), CtBP2-S (Verger et al., 2006) und RIBEYE (Schmitz et al., 2000) (Abbildung 1). CtBP2 ist ein Zellkern-ständiges Protein (Bergman et al., 2006, Verger et al., 2006, Zhao et al., 2006), dass sehr hohe Sequenz-Ähnlichkeit zu CtBP1 (80 % auf dem Aminosäuren-Level) aufweist. Dem Transkript für die CtBP2-S-Isoform werden durch alternative RNA-Prozessierung 75 Basen-Paare am 5'-Ende entfernt, was zu einem Verlust der ersten 25 N-terminalen Aminosäuren inklusive des *Nuclear Localization Signals* (NLS)

führt (Abbildung 1). Das Fehlen des NLS hat einen direkten Einfluss auf die Lokalisation dieser Isoform, sodass diese nur im Cytosol der Zelle lokalisiert ist (Verger et al., 2006). Das Transkript für die dritte Isoform RIBEYE wird von einem anderen Promoter, als dem der ersten beiden Isoformen, aus generiert. Dabei entsteht ein Protein mit einer einzigartigen A-Domäne und einer B-Domäne, die mit der CtBP2-Sequenz bis auf die fehlenden ersten 20 N-terminalen Aminosäuren identisch ist (Piatigorsky, 2001). RIBEYE ist exklusiv cytosolisch (Schmitz et al., 2000) und wird spezifisch nur in Bandsynapsen-enthaltenden Neuronen exprimiert (tom Dieck et al., 2005).

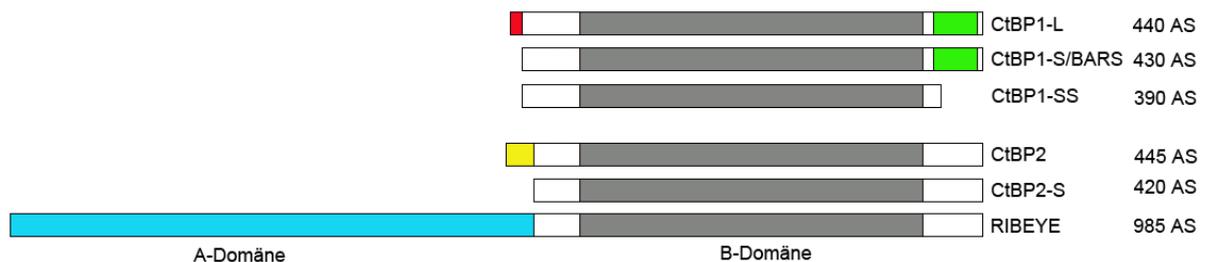


Abbildung 1: Schematische Darstellung der CtBP1/BARS50- und CtBP2/RIBEYE-Isoformen

Gezeigt sind alle bisher identifizierten CtBP1/BARS50- und CtBP2/RIBEYE-Isoformen. Der grau markierte Bereich der CtBP1/BARS50- und CtBP2/RIBEYE-Isoformen entspricht dem Bereich mit der höchsten Sequenz-Homologie zwischen den Proteinen beider CtBP-Gene. Die spezifischen N-Termini von CtBP1-L (rot) oder CtBP2 (gelb) sind ebenfalls markiert. Der grün markierte Bereich in den CtBP1/BARS50-Isoformen, CtBP1-L und CtBP1-S/BARS50 entspricht den, durch einen Spleiß-Vorgang entfernten, 40 C-terminalen Aminosäuren von CtBP1-SS. In Blau ist die A-Domäne von RIBEYE dargestellt.

1.2 Generelle Struktur der Mitglieder der CtBP-Proteinfamilie

Die Mitglieder der CtBP-Proteinfamilie in Wirbeltieren zeigen in ihrer Aminosäuren-Sequenz und Protein-Struktur eine große Ähnlichkeit zu NAD⁺/NADH-abhängigen Dehydrogenasen (D2-HDH) (Schaeper et al., 1995). So besteht ein CtBP-Monomer jeweils aus drei Domänen: einer Substrat-Bindungsdomäne (SBD), einer NAD⁺/NADH-Bindungsdomäne (NBD) und dem unstrukturierten C-Terminus des Proteins (Abbildung 2).

Die Substrat-Bindungsdomäne hat eine globuläre Form und ist aus Aminosäuren des N- und C-Terminus zusammengesetzt (Kumar et al., 2002). In der SBD ist die PXDLS (an Position X häufig Prolin oder Valin) Bindungs-Tasche enthalten, durch die die meisten der CtBP-Bindungspartner mit Hilfe ihres PXDLS-ähnlichen Bindungsmotivs an das Protein binden (Nardini et al., 2003). Die SBD-Domäne ist durch einen Spalt von der NBD-Domäne getrennt und durch diesen Spalt verläuft die flexible Verbindung die beide Domänen miteinander verknüpft (Kumar et al., 2002).

Die NAD⁺/NADH Bindungsdomäne wird durch die Aminosäuren 125-318 gebildet und ist aus parallelen β -Faltblattstrukturen, die von α -Helices an den Seiten flankiert werden, aufgebaut

(Kumar et al., 2002, Nardini et al., 2003). Die Konnektivität der NBD ist der vieler D2-HDH sehr ähnlich und stellt eine so genannte Rossmann-Falte dar. Mit Hilfe dieser Rossmann-Falte ist es CtBP-Proteinen möglich NAD^+/NADH oder Acyl-CoA zu binden, wobei beide Kofaktoren um die Bindung an die Rossmann-Falte kompetieren. Dabei hat die Bindung von NAD^+/NADH oder Acyl-CoA einen direkten Einfluss auf die Konformation des Proteins. Bei der Bindung von NAD^+/NADH bewegt sich die SBD auf den Spalt zu und verkleinert den Abstand zwischen beiden Domänen. Das CtBP-Protein befindet sich jetzt in der geschlossenen Konformation (Kumar et al., 2002). Nur in der geschlossenen Konformation ist es CtBP-Monomeren möglich zu dimerisieren. Die Dimerisierung wiederum ist eine wichtige Voraussetzung für die Bindung von Partner-Proteinen durch CtBP1/BARS50 und CtBP2 (Balasubramanian et al., 2003).

Die reduzierte Form des Koenzyms NADH wird zudem mit viel höherer Affinität als die oxidierte Form NAD^+ durch CtBP-Proteinen gebunden (Zhang et al., 2002, Fjeld et al., 2003). Dieser Unterschied in der Bindungs-Affinität deutet auf eine Funktion der CtBP-Proteine als Redox-Sensor hin, welcher den Energie-Status der Zelle mit der Regulierung der Gen-Expression verknüpft. Da zudem der NADH-Pool der Zelle um das siebenhundertfache kleiner ist als der NAD^+ -Pool (Zhang et al., 2002), haben selbst kleine Veränderungen des Energie-Status der Zelle einen größeren Einfluss auf den NADH- als auf den NAD^+ -Pool. Ein NADH-sensitives CtBP-Protein wäre somit ein besserer Redox-Sensor als ein NAD^+ -sensitives CtBP-Protein (Fjeld et al., 2003).

Bei der Bindung eines Acyl-CoA wird angenommen, dass das CtBP-Monomer eine offener Konformation einnimmt, da die dreidimensionale Struktur eines CtBP-Dimers keine Bindung eines Acyl-CoA zulässt (Kumar et al., 2002, Nardini et al., 2003).

Zusätzlich zu der Rossmann-Falte enthält die NBD noch ein katalytisches Zentrum (Aminosäuren Histidin 315, Glutamat 295 und Arginin 266 in CtBP1-L), welches für die Dehydrogenase-Aktivität von entscheidender Bedeutung ist. Obwohl für CtBP1/BARS50 eine schwache Dehydrogenase-Aktivität *in vitro* gezeigt werden konnte (Kumar et al., 2002, Balasubramanian et al., 2003, Achouri et al., 2007), ist die Rolle dieser Aktivität bei der Ausübung der CtBP-Funktionen noch unbekannt.

Neben dem PxDLS-Bindungsmotiv enthalten mehrere CtBP-Bindungspartner noch ein weiteres Motiv, das RRT-Motiv, mit dem sie an CtBP-Proteine binden können. Die Bindungs-Domäne dieses Motivs liegt dabei in der NBD der CtBP-Proteine (Quinlan et al., 2006a, Quinlan et al., 2006b) (Abbildung 2).

Die letzten 90 Aminosäuren des Proteins bilden den unstrukturierten, hoch flexiblen C-Terminus des Proteins. Üblicherweise spielen unstrukturierte Protein-Bereiche eine große Rolle bei der Modulation der Lokalisation und Funktion von Proteinen, was diesen Proteinen die Ausführung verschiedener Funktionen innerhalb der Zelle ermöglicht (Nardini et al.,

2006). Dies trifft auch im Fall der CtBP-Proteine zu, wo der C-Terminus Angriffspunkt für verschiedene, die Lokalisation des Proteins verändernde, posttranslationale Modifikationen ist.

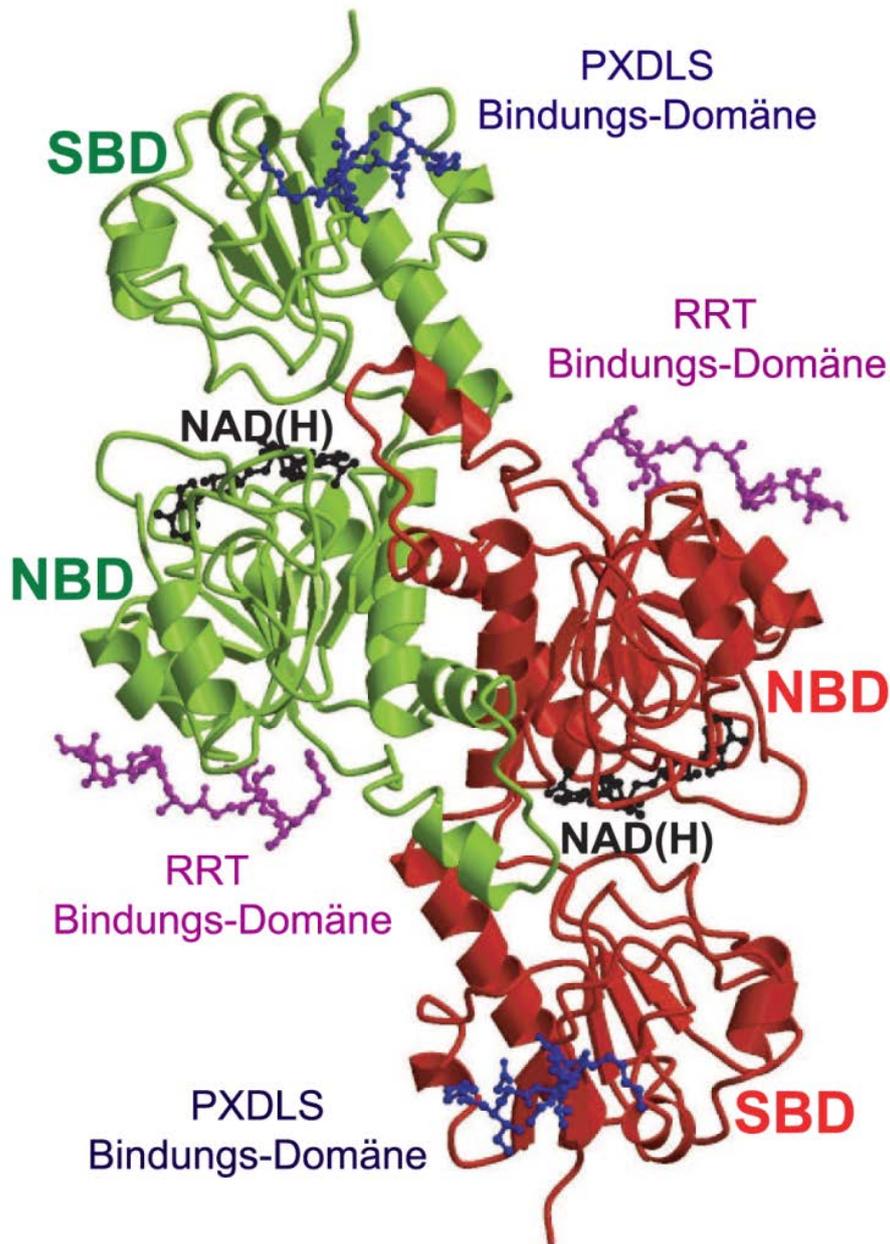


Abbildung 2: Die dreidimensionale Struktur eines CtBP-Dimers
Zu sehen ist hier die dreidimensionale Faltung der CtBP-Proteinkette in einem CtBP-Dimer. Dabei sind die den Dimer zusammensetzenden Monomere in grün und rot gezeigt. In beiden Monomeren kann jeweils eine Substrat-Bindungsdomäne (SBD) und eine NAD⁺/NADH-Bindungsdomäne (NBD) unterschieden werden, wobei die NBD das größte Dimerisierungs-Interface stellt. Das gebundene NAD(H) ist in schwarz, das gebundene RRTGAPPAL-Peptid in Magenta und das gebundene PIDLSKK-Peptid in blau als Ball-und-Stab-Konformation dargestellt. (Abbildung modifiziert nach Quinlan et al., 2006a).

1.3 Subzelluläre Lokalisationen der CtBP-Proteine

1.3.1 Lokalisation im Zellkern

In Wirbeltieren sind bis heute mehr als 30 verschiedene Sequenz-spezifische DNA-bindende Transkriptions-Repressoren bekannt, deren Aktivität durch die Bindung an CtBP-Proteine reguliert wird (Turner and Crossley, 2001, Chinnadurai, 2002). Diese Transkriptions-Repressoren sind unter anderem in Signalkaskaden der Embryogenese, der Apoptose und der Onkogenese (Chinnadurai, 2007) beteiligt. In der embryonalen Wirbeltier-Entwicklung sind die Produkte der beiden CtBP-Gene dabei entscheidend für eine korrekte Zelldifferenzierung (Hildebrand and Soriano, 2002). So ist die CtBP1 defiziente Maus zwar lebensfähig, dennoch zeigt sie eine höhere Sterblichkeitsrate und ist 30% kleiner als ihre Artgenossen. Die CtBP2 defiziente Maus führt dagegen, aufgrund massiver Defekte bei der embryonalen Entwicklung, zum Tod des Embryos an Embryonaltag E 10,5. Gleichzeitig zeigen die CtBP1/BARS50- und CtBP2-Proteine eine größtenteils überlappende ubiquitäre embryonale Expression, welche für die Proteinprodukte beider CtBP-Gene im Nervensystem besonders hoch ist und auf teilweise überlappende Funktionen bei der Embryogenese hindeutet.

Weitere Studien deuten zudem auch auf eine Beteiligung der CtBP-Proteine an der aktivitäts-abhängigen Regulation der Genexpression hin. Diese Regulation hat einen entscheidenden Einfluss auf höhere Hirnfunktionen, inklusive Gedächtnis- und Lern-Funktionen. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass CtBP-Proteine die Genexpression während der Epileptogenese regulieren (Garriga-Canut et al., 2006). Die Fähigkeit der CtBP-Proteine mehr als einen Bindungspartner zu binden ist die Grundlage für ihre Funktion als Ko-Repressor, da sie hier einen Multiprotein-Komplex mit weiteren an der Transkriptions-Regulation beteiligten Proteinen bilden. In diesem Protein-Komplex sind unter anderem Histon-modifizierende Enzyme, DNA-bindende Proteine und verschiedene Ko-Repressoren enthalten (Shi et al., 2003). Zu den Histon-modifizierenden Enzymen gehören die Klasse 1 Histon-Deacytelasen (HDACs1/2), der heterodimere Histon-Lysin-Methyltransferasen-Komplex (HMTasen) und eine Histon-Lysin-spezifische Methylase (LSD1). Zu den DNA-bindenden Proteinen gehören unter anderem ZEB1/2, RREB-1 und Znf217, welche direkt mit Hilfe ihres PXDLS-ähnlichen Motivs (ZEB1/2 und RREB-1) oder PXDLS- und RRT-ähnlichen Motiven (Znf 217) an das CtBP-Dimer binden (Chinnadurai, 2007). Zu den CtBP-bindenden Ko-Repressoren gehören unter anderem CoREST (*corepressor for element-1-silencing transcription factor*) und CDYL (*Chromo Domain Y-like*) (Chinnadurai, 2007). Weiterhin dient der Multiprotein-Komplex der Rekrutierung von SUMOylierung-katalysierenden Proteinen wie Ubc 9 (Quinlan et al., 2006b), HPC 2 (Shi et

al., 2003), PIASx β (Lin et al., 2003) und PIASx α (Kagey et al., 2005), die die SUMOylierung der CtBP-Proteine katalysieren. Vorstellbar ist aber auch, dass das CtBP-Dimer als Plattform für die SUMOylierung der gebundenen Partner-Proteine dient und dass diese SUMOylierung die Repressions-Aktivität des Multiprotein-Komplexes beeinflusst. Weiterhin ist bekannt, dass die Wirbeltier-CtBPs abhängig vom Promotor die Transkription HDAC-abhängig (Crique-Filipe et al., 1999, Shi et al., 2003) oder HDAC-unabhängig (Meloni et al., 1999, Koipally and Georgopoulos, 2000, Dahiya et al., 2001) unterdrücken können.

1.3.2 Lokalisation am Golgi-System

Die zweite CtBP1-Isoform, CtBP1-S/BARS50, wurde erstmals durch die Zugabe von Brefeldin A (BFA) als Bestandteil des Golgi-Komplexes identifiziert. Bei BFA-Zugabe erfolgt unter anderem eine ADP-Ribosylierung von CtBP1-S/BARS50, welche dessen Inaktivierung zur Folge hat. Diese Inaktivierung führt in Verbindung mit weiteren Prozessen zu einer vollständigen Fragmentierung des Golgi-Apparates (De Matteis et al., 1994; Di Girolamo et al., 1995; Spano et al., 1999). Auch ist CtBP1-S/BARS50 für die regulierte Dispersion des Golgi-Apparates während der Mitose verantwortlich. Da die Fragmentierung des Golgi-Apparates nötig für den Eintritt in die Mitose ist, verharret der Zellzyklus bei Inhibierung der CtBP1-S/BARS50-Aktivität im Zell-Stadium G2 (Hidalgo Carcedo et al., 2004, Colanzi et al., 2007). Zudem konnten Bonazzi et al. (2005) zeigen, dass CtBP1-S/BARS50 den basolateralen Transport vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran und die dynamin-unabhängige Fluid-Phase-Endocytose kontrolliert. Weiterhin ist CtBP1-S/BARS50 an der Abschnürung der retrograd transportierten COPI-Vesikel beteiligt (Yang et al., 2005). Trotz dieser wichtigen Funktionen von CtBP1-S/BARS50 zeigen Mausembryo Fibroblasten (MEFs), die aus CtBP1- und CtBP2-doppelmutanten Mäusen hergestellt wurden, keine Veränderungen in der Funktion des Golgi-Apparates (Hildebrand and Soriano, 2002). Dies deutet darauf hin, dass andere Mechanismen den Verlust der CtBP-Proteine ausgleichen können. So konnten Colanzi et al. (2007) zeigen, dass der für die Mitose notwendige CtBP1-S/BARS50-abhängige Golgi-Fragmentierungsschritt durch eine leicht veränderte Ultrastruktur des Golgi-Apparates in MEFs von CtBP1- und CtBP2-doppelmutanten Mäusen umgangen werden kann. Auch ist die Dynamin-abhängige Fluid-Phase-Endocytose in CtBP-mutanten MEFs hochreguliert (Bonnazzi et al., 2005). Bei akuter Deprivation von CtBP1-S/BARS50 ist die Zelle dagegen nicht in der Lage den Verlust von CtBP1-S/BARS50 durch andere Adaptionsmechanismen auszugleichen (Corda et al., 2006). Welcher Mechanismus der CtBP1-S/BARS50-Funktion am Golgi-Apparat zugrunde liegt, ist derzeit noch umstritten. Es wurde vermutet, dass CtBP1-S/BARS50 als eine Lysophosphatidsäuren-Acyltransferase (LPAAT) wirkt und Lysophosphatidsäure (LPA) durch Anhängen einer Acyl-Kette in Phosphatidsäure (PA) umwandelt. Dies hätte wiederum einen

direkten Einfluss auf die Membranlipid-Komposition und würde somit die Energiebarriere zur Abschnürung von Vesikeln verringern (Weigert et al., 1999, Drecktrah et al., 2003). Für eine LPAAT-Aktivität von CtBP1-S/BARS50 spricht, dass NAD^+/NADH und Acyl-CoA um die Bindung an CtBP1-S/BARS50 konkurrieren und das abhängig vom jeweilig gebundenen Kofaktor CtBP1-S/BARS50 eine andere Konformation einnimmt, was wiederum einen direkten Einfluss auf seine Funktion hat. So inhibieren steigende NAD^+/NADH -Konzentrationen die Funktion von CtBP1-S/BARS50 am Golgi-Apparat, da die Bindung von NAD^+/NADH eine geschlossene Konformation und Dimerisierung des Proteins zur Folge hat. Dies ist möglicherweise die Grundlage für andere Lokalisationen und Funktionen der CtBP1-S/BARS50-Isoform. Dagegen hat die Bindung von Acyl-CoA eine offene Konformation zur Folge, was wiederum die Grundlage der CtBP1-S/BARS50-Funktion am Golgi-Apparat ist. Trotzdem scheint die LPAAT-Aktivität von CtBP1-S/BARS50 nicht essentiell für dessen Funktionen am Golgi-Apparat zu sein, sondern eher unterstützenden Charakter zu haben. So konnten mehrere Gruppen zeigen, dass bei Verlust der LPAAT-Aktivität von CtBP1-S/BARS50 dieses trotzdem in der Lage ist seine verschiedenen Funktionen am Golgi-Apparat auszuüben (Hidalgo Carcedo et al., 2004; Bonazzi et al., 2005; Yang et al., 2005). Zudem geht eine weitere Arbeitsgruppe davon aus, dass es sich bei der in vorangegangenen Artikeln gemessenen LPAAT-Aktivität von CtBP1-S/BARS50 (Weigert et al., 1999) um ein Artefakt der Präparation handelt (Gallop et al., 2005). Unklar ist auch, ob die CtBP1-L-Isoform oder CtBP2-S am Golgi-Apparat lokalisiert sind und dort ähnliche Aufgaben wie CtBP1-S/BARS50 ausführen können.

1.3.3 Lokalisation an chemischen Synapsen

Chemische Synapsen sind hoch spezialisierte asymmetrische Strukturen, die die schnelle und gerichtete Signalweiterleitung zwischen Neuronen und ihren Zielzellen erlauben. Dabei erfolgt die Signalweiterleitung durch die Fusion synaptischer Vesikel mit der präsynaptischen Membran und der Freisetzung der Neurotransmitter in den synaptischen Spalt. Die Neurotransmitter diffundieren dann durch den synaptischen Spalt und aktivieren spezielle Rezeptoren in der postsynaptischen Endigung einer Zielzelle. Prinzipiell kann Neurotransmission exzitatorisch oder inhibitorisch sein, was jeweils von dem freigesetzten Neurotransmitter und dem Neurotransmitter detektierenden Rezeptor abhängig ist. Die Funktion und Verankerung der Rezeptoren und Ionenkanäle in der postsynaptischen Membran wird durch die Proteine der postsynaptische Dichte (PSD) organisiert und reguliert. Neben den Rezeptoren und Ionenkanälen sind die Hauptbestandteile der PSD exzitatorischer Synapsen: Signalmoleküle wie Calmodulin und CaMKII, Proteine des

Zytoskeletts wie Aktin und Tubulin und Netzwerkproteine wie Homer, PSD-95, Shank/ProSAPs, GKAP/SAPAP etc. (Okabe, 2007).

Der spezialisierte Bereich der präsynaptischen Endigung an dem die Fusion der synaptischen Vesikel stattfindet heißt aktive Zone. Auch diese zeichnet sich durch ein elektronendichtes Proteinnetzwerk aus, welches als die Cytomatrix der aktiven Zone (CAZ) bezeichnet wird. Die komplette Protein-Zusammensetzung der CAZ ist im Detail noch nicht geklärt. Trotzdem konnten bis heute fünf Proteinfamilien identifiziert werden, deren Mitglieder spezifisch an der CAZ angereichert sind: RIMs (*Rab3A interacting molecules*) (Wang et al., 1997, Wang et al., 2000), Munc-13s (*mammalian homolog of Unc-13*) (Brose et al., 2000), CAST/ERCs (*CAZ associated structural protein/ELKS/Rab-6-interacting protein2/CAST*) (Ohtsuka et al., 2002, Wang et al., 2002), Piccolo/Aczonin und Bassoon (Cases-Langhoff et al., 1996, tom Dieck et al., 1998, Wang et al., 1999) und α -Liprin (Serra-Page et al., 1998, Dunah et al., 2005). Es wird vermutet, dass diese Multi-Domänen-Proteine eine entscheidende Rolle bei der regulierten Neurotransmission, als auch bei der Synaptogenese und Synapsen-Reifung spielen. Neben diesen spezifisch nur an der CAZ angereicherten Proteinen gibt es noch eine große Anzahl von Proteinen, die zwar mit der CAZ assoziieren, die aber nicht nur spezifisch für die CAZ sind. Dazu gehören Proteine des Zytoskeletts (Aktin, Tubulin und Myosin), synaptische Vesikel-Proteine und Proteine die an der Fusion synaptischer Vesikel beteiligt sind (SNARE-Proteine, Syntaxin, Munc18; Synaptotagmin etc.), präsynaptische Netzwerkproteine (Synapsin, CASK etc.), spannungsabhängige Calcium-Kanäle und Zelladhäsionsmoleküle wie Integrin, Cadherin und Neurexin (Schoch and Gundelfinger, 2006) (Abbildung 3).

Zu diesen Proteinen gehört auch CtBP1/BARS50, da es als ein Bindungspartner von Bassoon und Piccolo in chemischen Synapsen nachgewiesen worden ist (Smigielski, 2005, tom Dieck et al., 2005).

Bassoon und Piccolo sind strukturell miteinander verwandt und stellen die größten Proteine der CAZ dar (Bassoon mit ~420 kDa; Piccolo mit ~530 kDa). Sowohl Bassoon als auch Piccolo sind sowohl in exzitatorischen, als auch inhibitorischen Neuronen lokalisiert (Richter et al., 1999) und besitzen jeweils 10 homologe Sequenzbereiche, die sogenannten Piccolo-Bassoon-Homologie-Domänen (PBH). Die exakten Funktionen von Bassoon und Piccolo sind noch nicht völlig verstanden. Da sie mit Hilfe ihrer multiplen Bindungsdomänen mit unterschiedlichen Partner-Proteinen assoziieren können, wird aber angenommen, dass sie mit Hilfe ihrer Bindungspartner an der Organisation der aktiven Zone und der regulierten Exo- und Endozytose beteiligt sind. Zudem ist bekannt, dass Bassoon und Piccolo während der Synaptogenese mit Hilfe der Piccolo-Bassoon-Transport-Vesikel (PTVs) schon sehr früh in der Entwicklung zur entstehenden Synapse transportiert werden (Zhai et al., 2001). Dies deutet auf eine Rolle von Bassoon und Piccolo beim Aufbau der aktiven Zone während der

Synaptogenese hin. Neben vielen weiteren Proteinen ist auch CtBP1/BARS50 ein Bestandteil der PTVs und erste Ergebnisse deuten an, dass CtBP1/BARS50 möglicherweise an der Abschnürung der PTVs vom Golgi-Apparat beteiligt ist (unveröffentlichtes Material). Die exakte molekulare Natur des synaptischen CtBP1/BARS50 und die Funktion, die CtBP1/BARS50 in Synapsen ausführt, sind noch nicht vollständig geklärt. Aufgrund der verschiedenen Funktionen der CtBP1/BARS50-Isoformen sind aber drei mögliche Szenarien vorstellbar. Zum einen könnten synaptische CtBP1/BARS50-Isoformen, genau wie CtBP1-S/BARS50 am Golgi-Komplex, im synaptischen Vesikel-Zyklus bei der Abschnürung der Vesikel vom Endosomen oder bei der Vesikel-Endozytose beteiligt sein. Zum anderen ist eine Funktion von CtBP1/BARS50 als synaptisches Signalmolekül vorstellbar. Welches nach bestimmten Stimuli, zum Beispiel einer veränderten synaptische Aktivität, retrograd von der Synapse in Richtung Zellkern transportiert wird und dort als Transkriptions-Ko-Repressor wirkt. Damit wäre es in der Lage, die synaptische Aktivität mit der Genexpression der Zelle zu verknüpfen. Als drittes mögliches Szenario ist eine Funktion von CtBP1/BARS50 als synaptischer Redoxsensor denkbar. So hätte der metabolische Status der Synapse einen direkten Einfluss auf die Bindung von CtBP1/BARS50 an Bassoon oder andere noch unbekannte Bindungspartner.

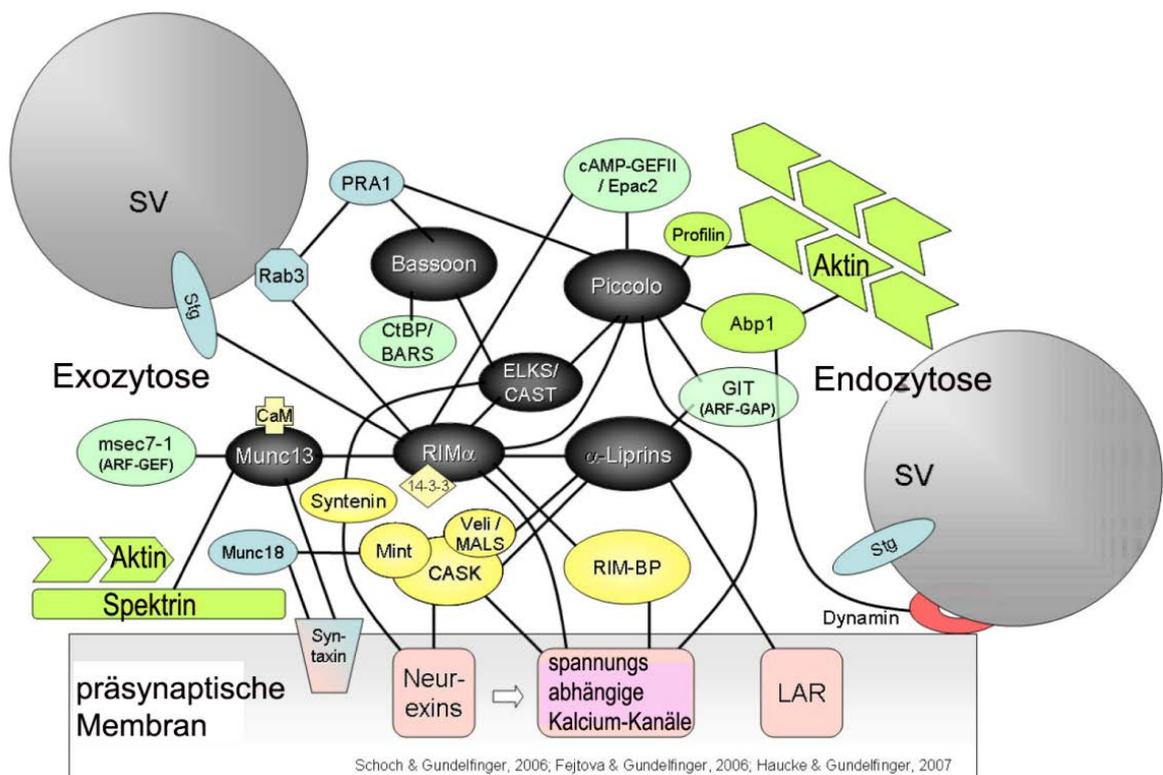


Abbildung 3: Schematische Darstellung der molekularen Zusammensetzung der CAZ (verändert nach der Doktorarbeit von (Lazarevic, 2009), modifiziert nach Schoch und Gundelfinger, 2006).

Die chemischen Synapsen der Photorezeptor- und Bipolar-Zellen in der Retina und der inneren Haarzellen der Cochlea stellen eine Besonderheit unter den chemischen Synapsen dar. Diese sind hochspezialisierte Synapsen, die in der Lage sind, Neurotransmitter tonisch oder sehr schnell und langanhaltend zu exozytieren. Die Ultrastruktur dieser Synapsen ist durch eine elektronendichte Struktur, dem sogenannten Band (engl. *ribbon*), charakterisiert. Dieses ist mit der aktiven Zone verbunden und ragt in das Photorezeptor-Terminal hinein. Es wird angenommen, dass es sich bei diesem Band um eine besondere Form der CAZ handelt (Garner et al., 2000, Zhai and Bellen, 2004) und so spricht man bei dieser Art der Synapsen von Bandsynapsen. Auch hier wird das Band, die CAZ, durch eine Reihe großer Netzwerk-Proteinen organisiert, die bis jetzt nur zum Teil identifiziert wurden. Eines dieser Proteine ist RIBEYE, welches ein Hauptbestandteil des Bandes in Photorezeptor- und Bipolar-Zellen der Retina, der inneren Haarzellen der Cochlea und der Pinealocyten der Epiphyse ist (Schmitz et al., 2000). Zusätzlich dazu enthalten Bandsynapsen trotz kleinerer Unterschiede, grundsätzlich die gleichen CAZ-Proteine die auch in konventionellen chemischen Synapsen zu finden sind (Schmitz et al., 2000; tom Dieck et al., 2005). Aufgrund der ultrastrukturellen Besonderheit werden diese CAZ-Proteine hier allerdings in zwei Gruppen unterteilt. Zum einen die Proteine des Bandsynapsen-Kompartiments, zu denen RIBEYE; KIF3A (*Kinesin motor protein 3A*), RIM1, Piccolo und auch CtBP1/BARS50 gehören. Zum anderen die CAZ-Proteine, die an der aktiven Zone der Bandsynapse angereichert sind, nämlich Munc13-1, RIM2, ERC2/CAST1 und Bassoon. Dabei ist Bassoon für die Verankerung des Bandsynapsen-Komplexes an die aktive Zone verantwortlich. So konnte in homozygoten Bassoon-mutanten Mäusen gezeigt werden, dass nach Verlust der zentralen Region von Bassoon die Bandsynapsen nicht mehr mit der aktiven Zone verankert sind und diffus in der gesamten Photorezeptor-Endigung verteilt sind (Dick et al., 2003, tom Dieck et al., 2005). Welche Funktionen die CtBP1/BARS50-Isoformen an der Bandsynapse spielen ist noch unklar, aber möglicherweise sind sie auch hier an der Abschnürung der synaptischen Vesikel von der Bandsynapsen-Membran beteiligt.

1.4 Posttranslationale Modifikationen und Bindungspartner von CtBP-Proteinen, die einen Einfluss auf die CtBP-Lokalisationen und -Funktionen haben

1.4.1 SUMOylierung und Bindung der neuronalen NO-Synthase

Wie schon in Abschnitt 1.2 beschrieben, zeichnet sich der C-Terminus der CtBP-Proteine durch seine hohe Flexibilität und seine fehlende Struktur aus. Dieser Bereich des Proteins wird von vielen Partner-Proteinen genutzt, um CtBPs posttranslational zu modifizieren und so Einfluss auf die Lokalisation und Funktion der CtBP-Proteine zu nehmen.

So führt die Bindung der neuronalen Stickoxid (NO)-Synthase (nNOS) mit Hilfe seiner PDZ-Domäne an die letzten drei Aminosäuren DX(Q)L von CtBP1/BARS50 zu dessen Anreicherung im Cytosol (Riefler and Firestein, 2001). Dabei sind zwei mögliche Mechanismen vorstellbar. Zum einen kann die nNOS, die hauptsächlich im Cytosol der Zelle angereichert ist, ihr Ziel-Protein cytosolisch binden und so dessen Kern-Import verhindern. So ist nNOS auch am Golgi-Apparat lokalisiert und dort möglicherweise an der Aufrechterhaltung der cytosolischen Lokalisation der CtBP1/BARS50-Proteine beteiligt (Corda et al., 2006). Ein zweiter möglicher Mechanismus ist das aktive Ausschleusen der CtBP1/BARS50-Proteine aus dem Zellkern. So konnten Riefler und Firestein (2001) nachweisen, dass auch im Zellkern ein geringer nNOS-Pool angereichert ist und dort möglicherweise direkt an CtBP1/BARS50 bindet. Nach der Bindung erfolgt der Kernexport von CtBP1/BARS50 dann mit Hilfe des, in der nNOS Aminosäuren-Sequenz enthaltenden, Nuclear Export Signal (NES) Crm1-unabhängig. Dieses Ausschleusen hätte dabei einen direkten Einfluss auf die Genexpression der Zelle, da die CtBP1/BARS50-Isoformen, aufgrund der veränderten Lokalisation, nicht mehr in der Lage sind ihre Ko-Repressor-Funktion auszuüben. Im Gegensatz zu CtBP1/BARS50 ist die nNOS-Bindungsdomäne in den Isoformen der CtBP2-Familie nicht konserviert.

Neben dieser den Kernexport begünstigenden posttranslationalen Modifikation, führt die SUMOylierung durch den Small Ubiquitin-like modifier 1 (SUMO1) zu einer verstärkten Anreicherung von CtBP1/BARS50-Proteinen im Zellkern. Die SUMOylierungs-Sequenz (ψ KxE, wobei ψ eine hydrophobe Aminosäure ist) liegt im CtBP1/BARS50-Protein nur wenige Aminosäuren vor der PDZ-Bindungsdomäne der nNOS um Lysin-428 in CtBP1-L (Lysin-417 in CtBP1-S/BARS50) (Lin et al., 2003). Aufgrund der Nähe beider Bindungsdomänen können die SUMOylierung und die nNOS-PDZ-Bindung miteinander um die Modifikation von CtBP1/BARS50 konkurrieren, was eine dynamische Kontrolle der CtBP1/BARS50-Lokalisation und -Funktion erlaubt. So ist nach SUMOylierung des Proteins

keine Bindung von nNOS durch seine PDZ-Domäne möglich und andersherum (Lin et al., 2003). Das SUMOylierungs-Motiv ist in den Proteinen der CtBP2-Familie nicht konserviert. Trotzdem findet sich wenige Aminosäuren weiter ein Lysin-Rest (Aminosäure 434 in CtBP2), der möglicherweise als SUMO-Bindungsstelle dienen kann. So gibt es bezüglich der SUMOylierung von CtBP2 unterschiedliche Studien. Die Studie von Lin et al. (2003) konnte keine SUMOylierung von CtBP2, bei Zugabe der SUMO-E3-Ligase PIAS1, beobachten. Dagegen war die E3-Ligase HPC2 in der Lage, eine SUMOylierung von CtBP2 durch SUMO1 zu katalysieren (Kagey et al., 2005). Dies deutet möglicherweise auf eine regulierte SUMOylierung von CtBP2 hin, die stark von dem gebundenen Protein-Partner des Ko-Repressor-Komplexes im Zellkern abhängig ist. Neben der SUMOylierung im Zellkern besteht auch die Möglichkeit einer cytosolischen SUMOylierung der CtBP-Proteine und dem damit verbundenen Kernimport dieser Isoformen (Corda et al., 2006).

1.4.2 Phosphorylierungen

Bei der ersten Identifikation von CtBP1/BARS50 als Bindungspartner des Adenovirus-Protein E1A wurde CtBP1 als Phospho-Protein nachgewiesen, dessen Phosphorylierungs-Grad mit dem Eintritt in die Mitose ansteigt (Boyd et al., 1993). Trotzdem war lange Zeit unklar, welche Kinasen an der Phosphorylierung beteiligt sind und welchen Einfluss diese auf die Funktion und/oder Lokalisation der CtBP-Proteine haben. In den letzten Jahren wurden hier große Fortschritte gemacht und eine Reihe von Protein-Kinasen identifiziert.

So führt die Phosphorylierung eines Serins im unstrukturierten C-Terminus der CtBP-Proteine (Serin-422 in CtBP1-L, Serin-411 in CtBP1-S/BARS50; Serin-428 in CtBP2 und Serin-403 in CtBP2-S) durch die *Homeodomain Interacting Protein Kinase 2* (HIPK2) nach Einwirkung von UV-Strahlen zur Ubiquitinierung von CtBP und somit zum Abbau des Proteins (Zhang et al., 2003, Zhang et al., 2005).

Dagegen führt die Aktivierung der p21-activated Kinase 1 (PAK1) z. B. durch den EGF- (*epidermal growth factor*-) *Rezeptor* zu einer Phosphorylierung eines, in der CtBP-Familie konservierten, Serin-Restes (Serin-158 in CtBP1-L) (Barnes et al., 2003). Dabei erfolgt die Phosphorylierung durch PAK1 bevorzugt in der NADH-gebundenen CtBP-Form und hat einen Verlust der Transkriptions-Ko-Repressor- und Dehydrogenase-Funktion der CtBP-Proteine zur Folge. Gleichzeitig wird das CtBP-Protein aus dem Zellkern exportiert und einer cytosolischen Funktion zugeführt.

Nach Stimulierung der Protein-Kinase A (PKA) durch das Adrenocorticotrope Hormon (ACTH) phosphoryliert dieses die Proteine der CtBP-Familie in einem PKA-Konsensus-Motiv um Threonin-144 in CtBP1-L (Threonin-150 in CtBP2). Gleichzeitig erfolgt die Aktivierung von PAK6, welche die Serin-Reste-100 (CtBP2 Serin-106) und -158 (Serin-164 in CtBP2) phosphoryliert. Diese Phosphorylierungen und der Anstieg der NADH-Konzentration im

Zellkern haben einen Partner-Tausch der CtBP-Proteine zur Folge, sodass vermehrt CtBP1/CtBP2-Heterodimere gebildet werden, die in der Folge aus dem Zellkern exportiert werden. Dieser Export erlaubt dann die Expression der Gene, die unter der Kontrolle des CYP17-Promoters stehen (Dammer and Sewer, 2008).

Die Aktivierung der Akt1-Kinase an der Plasmamembran der Zelle, verursacht einen Zellkernimport dieser Kinase. Innerhalb des Zellkerns wird Akt1 dann durch Pc2 (*polycomb protein*, SUMO-E3-Ligase von CtBP1/BARS50) rekrutiert und diese Rekrutierung ist die Voraussetzung der Phosphorylierung von CtBP1/BARS50 in dem Akt1-Konsensus-Motiv um Threonin-176. Diese Phosphorylierung markiert CtBP1/BARS50 für eine Poly-Ubiquitinierung und dem folgenden Abbau des Proteins, was wiederum zu einem Anstieg der Genexpression führt (Merrill et al., 2010).

1.4.3 Weitere posttranslationale Modifikationen

Für die CtBP2-Proteinfamilie ist zudem bekannt, dass die Acetylierung von zwei N-terminalen Lysin-Resten (Lys-6 und Lys-10) durch die kernständigen Acetylase p300 zu einem Zurückhalten von CtBP2 im Zellkern führt (Zhao et al., 2006).

Wie bereits in Abschnitt 1.3.2 beschrieben, erfolgt nach BFA-Zugabe eine ADP-Ribosylierung von CtBP1-S/BARS50, wodurch dieses nicht mehr in der Lage ist seine Funktionen am Golgi-Apparat auszuüben. Eine mögliche Ursache hierfür ist, die durch die ADP-Ribosylierung verursachte Konformations-Änderung, welche eine Homo- oder Heterodimerisierung des Proteins induziert (Spano et al., 1999). Als Dimer wird das CtBP1-S/BARS50-Protein somit möglicherweise abgebaut oder in den Zellkern transportiert und steht dem Golgi-Apparat nicht mehr zur Verfügung. So verursacht die posttranslationale Modifikation der ADP-Ribosylierung, eine Veränderung in der Funktion und möglicherweise auch Lokalisation des CtBP1-S/BARS50-Proteins.

1.5 Zielsetzung und Fragestellungen der Arbeit

Im adulten Nervensystem deutet Vieles auf eine Beteiligung der CtBP-Proteinfamilie an der Regulation der aktivitäts-abhängigen Genexpression hin. Gleichzeitig konnte CtBP1/BARS50 als Bestandteil der CAZ konventioneller chemischer Synapsen identifiziert werden. Dies könnte möglicherweise bedeuten, dass die Mitglieder der CtBP-Proteinfamilie, neben der Transkriptions-Repression, noch mit weiteren Funktionen an der Regulation höherer Hirnfunktionen beteiligt sind.

Da das Expressionsmuster der CtBP1/BARS50- und CtBP2-Proteine im adulten Gehirn noch weitgehend unbekannt ist, sollte dieses mit Hilfe von immunhistochemischen und biochemischen Analysen untersucht werden. Gleichzeitig sollten Immunfluoreszenz-Analysen hippocampaler Primärkulturneuronen einen Hinweis auf Zelltyp-spezifische Expressionsmuster der CtBP1/BARS50- und CtBP2-Proteine geben.

Trotz der Identifizierung einer synaptischen Lokalisation von CtBP1/BARS50 ist die exakte molekulare Natur des synaptischen CtBP1/BARS50 unklar. Auch stellt sich die Frage, ob die CtBP-Isoformen CtBP1-L, CtBP1-S/BARS50, CtBP2 und CtBP2-S im Neuron spezifisch für ein Zellkompartiment sind oder sowohl nukleär als auch cytosolisch lokalisiert werden. Die Untersuchung des subzellulären Verteilungsmuster mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Färbungen und biochemischen Analysen sollte hier einen ersten Einblick geben. Hierfür wurden neben den kommerziell erhältlichen CtBP1/BARS50- und CtBP2/RIBEYE-Antikörpern ein, im Rahmen meiner Diplomarbeit hergestellter, N-Terminus spezifischer CtBP1-L-Antikörper verwendet.

Da die Unterscheidung zwischen der kurzen und langen Isoformen von CtBP1 und CtBP2 mit den kommerziell erhältlichen Antikörpern nicht möglich ist, wurden die subzellulären Lokalisationen der CtBP1-S/BARS50-, CtBP2- und CtBP2-S-Isoformen mit Hilfe eines intern mit Myc markierten CtBP1-S/BARS50-Konstrukts und N-Terminus mit EGFP markierten CtBP2-Konstrukten immunocytochemisch untersucht.

Gleichzeitig wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Karin Richter immun-elektronenmikroskopische Aufnahmen von CtBP1/BARS50 und CtBP2/RIBEYE gefärbten Synapsen der Molekularschicht des Kleinhirn-Cortexes angefertigt.

Zudem sollte mit Hilfe von 2D-gelelektrophoretischen Untersuchungen von Zellkern- und Synaptosomen-Fractionen ein erster Hinweis auf Synapsen-spezifische CtBP1/BARS50-Isoformen und posttranslationale Modifikationen der CtBP1/BARS50-Isoformen gewonnen werden.

2. Material & Methoden

2.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden in *pro analysis* (p.A.) Qualität von den Firmen Millipore, Carl Roth, Fermentas, Pierce, Calbiochem, Invitrogen, Merck, Roche und Sigma-Aldrich bezogen. Chemikalien und Lösungen die von anderen Firmen bezogen wurden, werden bei den einzelnen Methodenbeschreibungen erwähnt. Alle wässrigen Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser des Reinstwasser-Anlagensystems GenPure UV-TOC/UF der Firma TKA hergestellt.

2.1.1 Bakterienmedien und Antibiotika

Tabelle 1 **Verwendete Bakterienmedien und Antibiotika**

Name	Zusammensetzung (Hersteller)
LB-Medium	20 g LB Broth (Invitrogen) auf 1l Wasser
LB-Agar	15 g select Agar (Invitrogen) auf 1l LB-Medium
SOC-Medium	20 g/L Pepton 140 (Invitrogen), 5 g/l Hefeextrakt (Invitrogen), 10 mM NaCl, 2,5 mM KCL, 10 mM MgCL ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glucose
2-YT-Medium	31 g 2-YT Broth (Invitrogen) auf 1l Wasser
Ampicillin	Stammlösung: 50 mg/ml Ampicillinnatriumsalz in Wasser, finale Konzentration 100 µg/ml in LB- oder 2-YT-Medium
Kanamycin	Stammlösung: 25 mg/ml Kanamycindisulfat in Wasser, finale Konzentration 25 µg/ml in LB- oder 2-YT-Medium
Tetracyclin-Stammlösung	12,5 mg/ml Tetracyclin-Hydrochlorid in 50% Ethanol; 1ml auf 1l LB-Medium final 12,5 µg/ml
Chloramphenicol-Stammlösung	10 mg/ml Chloramphenicol in Ethanol; 3ml auf 1l LB-Medium, final 30µg/ml

2.1.2 Bakterienstämme und Zelllinien

Tabelle 2 **Verwendete Bakterienstämme und Zelllinien**

Bakterien	E.coli XL 10 gold
Zelllinien	Human embryonal kidney cells clone 293 (HEK293T)

2.1.3 Kulturmedien und Medienzusätze für Hefen

Tabelle 3 **Verwendete Medien und Zusätze für Hefen**

Name	Zusammensetzung (Hersteller)
Minimal SD-Medium	20g Glucose, 1,7 g Yeast-Nitrogen Base (Gibco), 5 g (NH ₄) ₂ SO ₄ auf 1l H ₂ O
YPDA-Medium	50 g YPD-Broth (Roth) auf 1l H ₂ O; Zugabe von 0,3% Adeninhemisulfat nach dem autoklavieren zu final 30 mg/l
-L-Medium	0,69 g -Leu DO Supplement (Clontech) pro 1l Minimal SD-Medium
-W-Medium	0,74 g -Trp DO Supplement (Clontech) pro 1l Minimal SD-Medium
-LW-Medium	0,64 g -Leu/-Trp DO Supplement (Clontech) pro 1l Minimal SD-Medium
-ALWH-Medium	0,60 g -Ade/-His/-Leu/-Trp DO Supplement (Clontech) pro 1l Minimal SD-Medium
Hefe-Agarmedium	17,5 g Select Agar (Invitrogen) auf 1l Minimal SD-Medium mit DO Supplement
3' AT-Stammlösung	1M 3-Amino-1,2,4-triazol in H ₂ O; 2,5 ml auf 1l -LWHA-Medium; final 2,5 mM

Die Sterilisation aller Medien erfolgte durch autoklavieren bei 121°C für 15 min. Die Medienzusätze wurden nach der Herstellung alle steril filtriert und bei -20°C gelagert.

2.1.4 Kits, Enzyme und spezielle Reagenzien

Tabelle 4 **Verwendete Kits, Enzyme und Reagenzien in der Molekularbiologie**

Kits, Enzyme und Reagenzien	Hersteller
Nucleo Spin Gel extraction Kit II	Macherey-Nagel
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Fermentas
Phusion DNA-Polymerase	New England Biolabs
Antarctic Phosphatase	New England Biolabs
Alkaline Phosphatase from calf intestine	Fermentas
Klenow Fragment	Fermentas
T4 DNA Ligase	Fermentas
Deoxynucleosidtriphosphate (dNTPs)	Fermentas

2.1.5 Pufferlösungen

Tabelle 5 **Häufig verwendete Pufferlösungen**

Puffer	Zusammensetzung
PBS	2,7 mM KCl, 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , 137 mM NaCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,4
PBS-T	0,1% Tween®20 in PBS, pH7,4
TAE	40 mM Tris, 0,2 mM Essigsäure, 1 mM MgCl ₂ , pH 7,6

2.1.6 Medien, Zusätze und Reagenzien für die Zellkultur

Alle Medien und Zusätze für die Zellkultur wurden von Invitrogen bezogen. Poly-D-Lysin war von Sigma-Aldrich und 1- β -D-Arabinofuranosylcytosin (Ara-C) von Calbiochem. Für die Kultivierung von primären neuronalen Zellen wurde Neurobasal™ Medium, welches mit B-27, 2 mM L-Glutamin und Antibiotika/Antimykotika versetzt wurde, verwendet. Die stabilen Zelllinien und Gliazellen wurden in D-MEM mit 10% Serum (FBS), 2 mM L-Glutamin und Antibiotika/Antimykotika versetzt.

Tabelle 6 **Verwendete Medien, Reagenzien und Zusätze**

Name	Beschreibung
D-MEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
FBS	Fetal Bovine Serum
100x L-Glutamin	200 mM L-Glutamin
100x Antibiotika /Antimykotika	10,000 U Penicillin, 10,000 μ g Streptomycin, 25 μ g Amphotericin B pro ml
HBSS -	Hanks balanced salt solution ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}
HBSS +	Hanks balanced salt solution mit Ca^{2+} und Mg^{2+}
Neurobasal™	Neurobasal™ Medium
50x B-27	B-27 Supplement
10x Trysin-EDTA	5% Trypsin, 5,3 mM EDTA*4Na
10x Trypsin	2,5% Trypsin
5x DNase	1 mg/ml DNase
Poly-D-Lysin	100 mg/l Poly-D-Lysin in 100 mM Borsäure, pH 8,5, sterilfiltriert
Poly-L-Lysin	500 mg/l Poly-D-Lysin in 150 mM Borsäure, pH 8,4, sterilfiltriert
AraC	1,5 mM 1- β -D-Arabinofuranosylcytosin

2.1.7 Molekulargewichtsmarker

Tabelle 7 **Verwendete Molekulargewichtsmarker**

Molekulargewichtsmarker	Hersteller
GeneRuler 1 kB DNA ladder	NEB
GeneRuler 100 bp DNA ladder	NEB
SMART Ladder	Eurogentec
PAGERuler	Fermentas
PAGERuler Plus	Fermentas
Precision Plus Protein Standard	BioRad

2.1.8 Antikörper

Tabelle 8: Verwendete primäre Antikörper (Abkürzungen: mk, monoklonal; pk, polyklonal; K, Kaninchen; Ms, Meerschweinchen; M, Maus; WB, Western-Blot; ICC Immuncytochemie; EM, Elektronenmikroskopie)

Primär antikörper	Spezies	Hersteller	Verdünnung
anti-Bassoon (mk)	M	Stressgen	WB: 1:2000
Anti-Bassoon (pk)	Ms	Synaptic Systems	ICC: 1:500
anti-CtBP1 (mk)	M	BD Transduction laboratories	WB: 1:5.000; ICC: 1:2000
anti-CtBP1 (pk)	K	Synaptic Systems	WB: 1:1.000; ICC: 1:1000
anti-CtBP1-L N-Term	Ms	Diana Hübler / Dr. W.D. Altmann (Leibniz-Institut für Neurobiologie, Magdeburg)	WB: 1:200
anti-CtBP2 (mk)	M	BD Transduction laboratories	WB: 1:1.000; ICC: 1:1500
anti-CtBP2 (pk)	K	Synaptic Systems	WB: 1:1.000; ICC: 1:1500; EM 1:2000
GM 130 (mk)	K	abcam	WB: 1:1.000; ICC: 1:1000
GAD65 (mk)	M	abcam	ICC: 1:1000
anti-GFP, Klon B34 (mk)	M	Covance/Babco	WB: 1:20000
anti-GAPDH (pk)	K	abcam	WB: 1:3000
anti-HP1alpha (mk)	M	Millipore	WB: 1:500
anti-c-Myc (9E10) (mk)	M	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	ICC: 1:500
anti-NeuN clone A60 (mk)	M	Millipore	WB: 1:100
anti-RIBEYE A-Domäne (pk)	K	Synaptic Systems	WB: 1:250
anti-Synapsin1,2 (pk)	K	Synaptic Systems	ICC: 1:1000
anti-Syntaxin 6 (mk)	M	BD Transduction laboratories	ICC: 1:1000
anti-Synaptophysin (pk)	K	Synaptic Systems	WB: 1:1000

Tabelle 9: Verwendete sekundäre Antikörper

Konjugat	Sekundär antikörper	Spezies	Hersteller	Verdünnung
Peroxidase	anti-Maus	Ziege	Dianova	WB: 1:10000
Peroxidase	anti-Kaninchen	Esel	Dianova	WB: 1:10000
Peroxidase	anti-Meerschweinchen	Ziege	Dianova	WB: 1:10000
Alexa Fluor® 680	anti-Kaninchen	Ziege	Invitrogen	WB: 1:40000
Alexa Fluor® 680	anti-Maus	Ziege	Invitrogen	WB: 1:40000
CF770	anti-Maus	Esel	Biotum antibodies, gekoppelt durch Dr. W.D. Altmann	WB: 1:40000
CF770	anti-Kaninchen	Ziege	Biotum antibodies, gekoppelt durch Dr. W.D. Altmann	WB: 1:40000
CF770	anti-Meerschweinchen	Esel	Biotum antibodies, gekoppelt durch Dr. W.D. Altmann	WB: 1:40000
Alexa Fluor® 488	anti-Maus IgG	Ziege oder Esel	Molecular probes	WB: 1:2000
Alexa Fluor® 488	anti-Kaninchen IgG	Ziege oder Esel	Molecular probes	WB: 1:2000
Alexa Fluor® 488	anti-Meerschweinchen IgG	Ziege oder Esel	Molecular probes	WB: 1:2000
Alexa Fluor® 568	anti-Maus IgG	Ziege oder Esel	Molecular probes	WB: 1:2000
Alexa Fluor® 568	anti-Kaninchen IgG	Ziege oder Esel	Molecular probes	WB: 1:2000
Alexa Fluor® 568	anti-Meerschweinchen IgG	Ziege oder Esel	Molecular probes	WB: 1:2000
Alexa Fluor® 647	anti-Maus IgG	Ziege oder Esel	Molecular probes	WB: 1:1000
Alexa Fluor® 647	anti-Kaninchen IgG	Ziege oder Esel	Molecular probes	WB: 1:1000
Biotin	anti-Kaninchen	Ziege	Vector	ICC: 1:2000

2.1.9 Vektoren und Expressionskonstrukte

Tabelle 10 Verwendete Vektoren und Expressionskonstrukte

Vektor	Hersteller/Referenz	Verwendung
pEGFP-CW3	Dr. W.D.Altrock	Expression von GFP-Fusionsproteinen in Mammaliazellen
pCMV-Tag2	Stratagene	Entfernung der Flag-Markierung
pCMV-ohne tag	Diana Hübler	Expression von intern Myc-markierten Fusionsproteinen in Mammaliazellen
pBSII-SK (+)	Clontech	Vermehrung von Plasmid-DNA in Bakterien

2.1.10 Primer

Tabelle 11 Verwendete Primer (Abkürzungen: V, Vorwärts; R, Rückwärts)

Name	Primer-Richtung	Sequenz	Verwendung
RC 1.1	V	5'-cggaattcggccaccatgtcaggcgctccgacctc-3'	Einführung einer Kozak-Sequenz und EcoRI Schnittstelle an das 5' Ende von CtBP1-L
RC 1.2	R	5'-accgctcgagctacaactggtcagtcgtatgg-3'	Einführung einer XhoI Schnittstelle an das 3' Ende von CtBP1
RC 1.12	V	5'-cagaaactcatctctgaagaggatctgggcactcgggtccagagt-3'	Einführung einer internen Myc Markierung in den Loop der NBD von CtBP1/BARS50
RC 1.11	R	5'-ttcccgaagtcctggtgtagccaggtagttcgtcggtatag-3'	Einführung einer internen Myc Markierung in den Loop der NBD von CtBP1/BARS50
RC 1.9	V	5'-gagcagaaactcatctctgaagaggatctcaatggggctgcctac-3'	Einführung einer internen Myc Markierung in den C-Terminus von CtBP1/BARS50
RC 1.10	R	5'-agggtgcaccacagcagggtccatgct-3'	Einführung einer internen Myc Markierung in den C-Terminus von CtBP1/BARS50
RC 2.1	V	5'-aagactcgagatggcccttgggataag-3'	Amplifizierung von CtBP2 aus einer pACT2- Rattenhirn cDNA Bibliothek
RC 2.2	V	5'-aagactcgagatgaacggccccct-3'	Amplifizierung von CtBP2-S aus einer pACT2- Rattenhirn cDNA Bibliothek
RC 2.3	R	5'-tctgggtaccctattgctcgttggggt-3'	Amplifizierung von CtBP2 und ctBP2-S aus einer pACT2- Rattenhirn cDNA Bibliothek

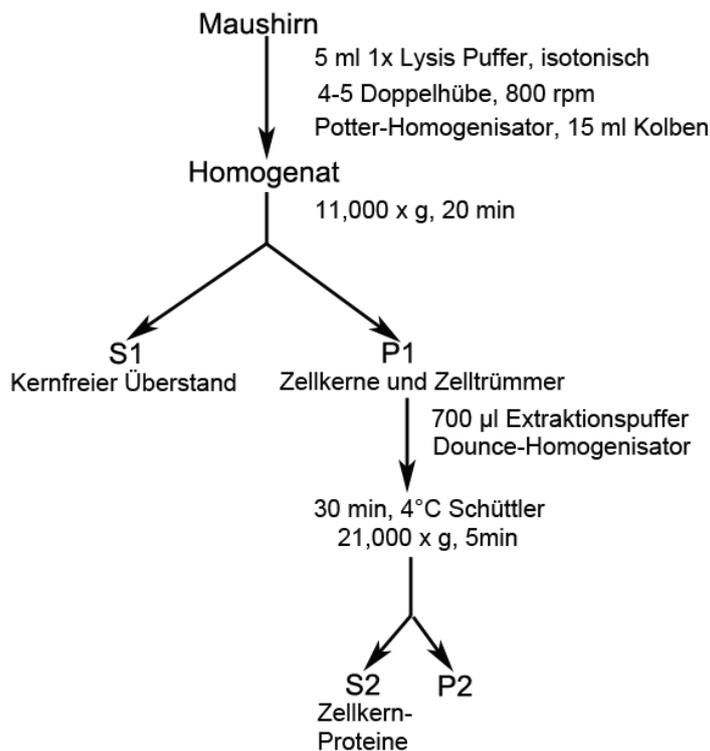
2.2 Proteinbiochemie

2.2.1 Fraktionierungen

2.2.1.1 Isolation von Zellkernen

- o CellLytic™ NuCLEAR™ Extraction Kit (Sigma-Aldrich, Product Code: NXTRACT)
- o 5x Lysis Puffer, isotonisch: 50 mM Tris HCl; pH 7,5; 10 mM MgCl₂; 15 mM CaCl₂ und 1,5 mM Saccharose
- o Extraktions Puffer: 20 mM HEPES, pH 7,9; 1,5 mM MgCl₂; 0,42 M NaCl; 0,2 mM EDTA und 25% Glycerol
- o Potter-S Homogenisator B. Braun Biotech. International: 15 ml Kolben, 30 ml Kolben
- o Dounce Homogenisator, Wheaton; VWR International: 7 ml Kolben

Alle Schritte wurden nach Angaben des Herstellers bei 4 °C durchgeführt und alle Reagenzien waren eiskalt. Das Gehirn einer C57/BL6-Maus wird in Stücke geschnitten und gewogen. Das so ermittelte Nassgewicht dient der Berechnung der benötigten Puffer Mengen. Die hier gemachten Angaben beziehen sich auf 500 mg Maushirn-Gewebe. Das präparierte Gehirn wird zweimal mit 1x PBS gewaschen und auf Eis gelagert. Zu 5 ml 1x Lysis-Puffer, isotonisch, werden 50 µl 0,1 M DTT und 50 µl eines Protease Inhibitor Cocktails gegeben. In einem Potter-Homogenisator (15 ml Kolben) wird dann mit 4-5 Doppelhüben und 800 rpm das Maushirn in dem 1x Lysis-Puffer homogenisiert. Das Homogenat wird anschließend für 20 min bei 11,000 x g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird der Überstand verworfen und das Pellet in 700 µl Extraktions-Puffer (inklusive 7,5 µl DTT und 7,5 µl Protease Inhibitor Cocktail) mit Hilfe eines Dounce-Homogenisators resuspendiert. Anschließend wird die Probe bei 4 °C für 30 min geschüttelt. Dann folgt eine Zentrifugation bei 21,000 x g für 5 min. Der dabei entstehenden Überstand enthält die gereinigten Zellkern-Proteine und wird anschließend in ein kaltes Reaktionsgefäß überführt. Für die quantitative biochemische Untersuchung des Verteilungsmusters bekannter CtBP1/BARS50- und CtBP2/RIBEYE-Isoformen in Zellkernen und Synaptosomen (Abschnitt 3.1.5.1) wurden drei Hirne in drei unabhängigen Experimenten zur Präparation der Zellkerne verwendet. Für Abschnitt 3.1.5.2 (Quantitative biochemische Untersuchung der Synaptosomen- und Zellkern-Lokalisation von CtBP2 in Cerebellum und Cortex) wurden aus drei Gehirnen die Cortices und Cerebelli gesammelt, jeweils vereinigt, und daraus die Zellkern-Fraktion präpariert.



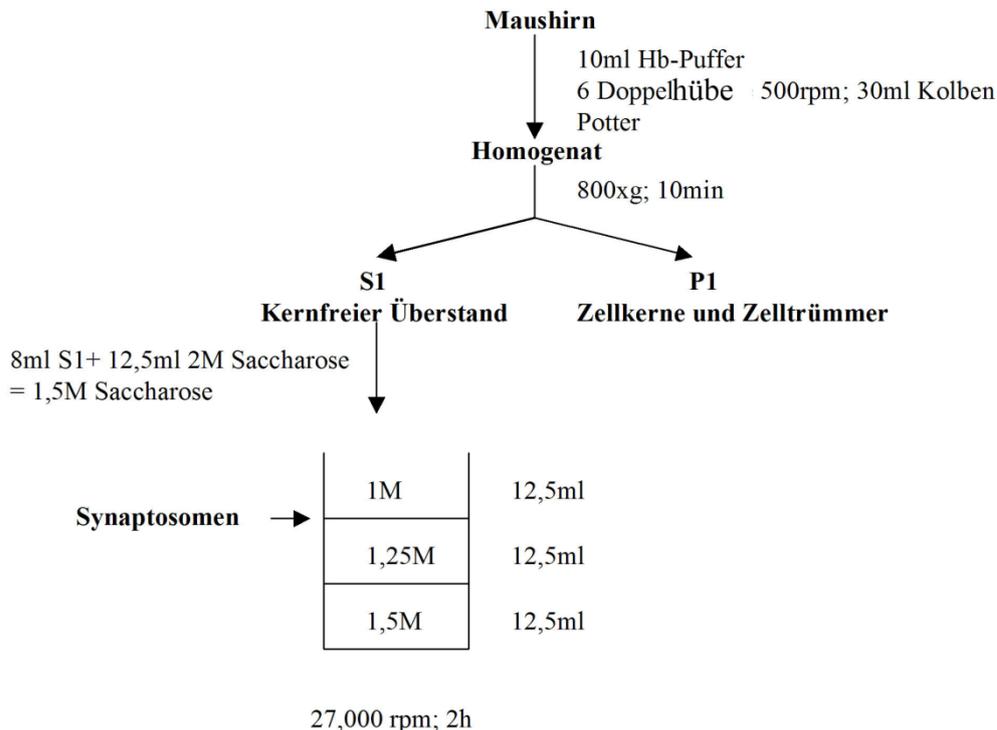
Schema 1 Präparation von Zellkernen

2.2.1.2 Isolation von Synaptosomen

- o Homogenisierungs-Puffer: 10 mM Tris HCl pH 7,4; 0,32 M Saccharose;
- o 1x complete protease inhibitor
- o Saccharose-Lösungen: 2 M, 1,25 M und 1 M Saccharose
- o 1mM EDTA; 10 mM Tris HCl, pH 8.0
- o Zentrifuge: Beckman L7-55 Ultracentrifuge; Beckman Coulter Optima™ L-70K
- o Rotoren: Beckman SW28Ti; Beckman 14 x 95 mm Ultra-Clear Zentrifugen-Röhrchen
- o Potter-S Homogenisator: B.Braun Biotech. International; 30 ml Kolben

Das Synaptosomen-Protokoll wurde nach Phillips et al. (Phillips et al., 2001) durchgeführt. Auch hier müssen alle Schritte auf Eis ausgeführt werden und die Reagenzien müssen eiskalt sein. Es wird das Gehirn einer C57/BL6-Maus (~500 mg) zu 10 ml Homogenisierungs-Puffer gegeben und durch 6 Doppelhübe mit 500 rpm in einem Potter-Homogenisator homogenisiert. Das Homogenat wird dann für 10 min bei 800 rpm in einem 15 ml Falcon zentrifugiert. Nach der Zentrifugation werden die ersten 8 ml des Überstandes mit 18,9 ml der 2,0 M Saccharose-Lösung vermischt um eine Saccharose-Konzentration von 1,5 M zu erhalten. Von dieser 1,5 M Saccharose-Lösung werden 12,5 ml in ein 25 x 89 mm Ultra-Clear Zentrifugen-Röhrchen überführt und mit je 12,5 ml einer 1,25 M und einer 1 M Saccharose-Lösung überschichtet. Nach erfolgreicher Überschichtung werden die Proben für 2 h bei 100,000 x g in einem SW28Ti Rotor zentrifugiert. Anschließend befinden sich die Synaptosomen in der 1,25/1 M-Grenzschicht. Für die quantitative biochemische

Untersuchung des Lokalisationsmuster bekannter CtBP1/BARS50- und CtBP2/RIBEYE-Isoformen in Zellkernen und Synaptosomen (Abschnitt 3.1.5.1) wurden drei Hirne in drei unabhängigen Experimenten zur Präparation der Synaptosomen verwendet. Für Abschnitt 3.1.5.2 (Quantitative biochemische Untersuchung der Synaptosomen- und Zellkern-Lokalisation von CtBP2 in Cerebellum und Cortex) wurden aus drei Gehirnen die Cortices und Cerebelli gesammelt, jeweils vereinigt, und daraus die Synaptosomen-Fraktion präpariert.



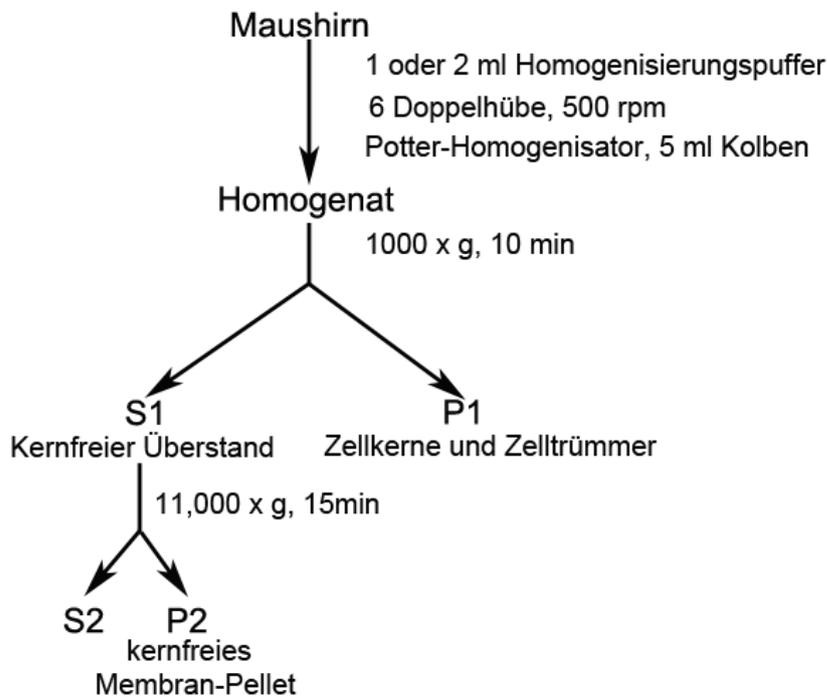
Schema 2 Präparation von Synaptosomen

2.2.1.3 Isolierung von kernfreien Membran-Pellets (P2) aus verschiedenen Hirnarealen des Maushirn

- o Homogenisierungs-Puffer: 10 mM Tris HCl pH 7,4; 0,32 M Saccharose;
- o 1x complete protease inhibitor
- o Potter-S Homogenisator: B.Braun Biotech. International; 5ml Kolben
- o 2x SDS-Probenpuffer: 500mM Tris-HCl; 20% Glycerin; 4% SDS, 1mM EDTA; 0,001 % Bromphenolblau; pH 8,5; 10 % β -Mercaptoethanol
- o Nass-Gewicht einzelner Hirnareale:

Cortex	0,17-0,19 g
Cerebellum	~ 0,06 g
Striatum	~ 0,01 g
Hippokampus	~ 0,01 g
Diencephalon	0,04 – 0,05 g
Mittelhirn	0,03 – 0,04 g
Olfaktorischer Bulbus	0,01 - 0,02 g
Pons und Medulla oblongata	0,03 - 0,05 g

Alle Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt und alle Reagenzien waren eiskalt. Das Gehirn einer C57/BL6-Maus wird entnommen und in die acht Hirnareale unterteilt. Der Cortex und das Cerebellum werden zu 2 ml Homogenisierungspuffer, alle anderen Hirnareale zu 1 ml Homogenisierungspuffer gegeben und durch 6 Doppelhübe bei 500 rpm in einem 5 ml-Potter-Homogenisator homogenisiert. Das Homogenat wird anschließend für 10 min bei 1000 x g zentrifugiert. Der dabei entstehende Überstand (S1) wird dann vom Pellet (P1) getrennt und nochmals bei 11,000 x g für 15 min zentrifugiert. Der bei der Zentrifugation entstehende Überstand (S2) wird verworfen, das Pellet (P2) ist das kernfreie Membran Pellet. P2 wird anschließend 1 h bei RT in 1x SDS-Probenpuffer resuspendiert, 5 min auf 95 °C erhitzt, 5 min bei 16,000 x g zentrifugiert und der Überstand dann in ein neues Reaktionsgefäß überführt.



Schema 3 Präparation kernfreier Membran-Pellets (P2)

2.2.2 Probenaufbereitung für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

2.2.2.1 Probenaufbereitung für die denaturierende SDS-PAGE mittels TCA-Fällung

- o 20 % Trichloressigsäure bei 4 °C und Aceton bei –20 °C
- o 2 x SDS-Probenpuffer: 500 mM Tris-HCl; 20 % Glycerin; 4 % SDS, 1 mM EDTA; 0,001 % Bromphenolblau; pH 8,5; 5 % β-Mercaptoethanol
- o Zentrifugen: 5415R; 5417R (Eppendorf)

Zu Beginn werden alle Proben 1+1 mit 20 %iger TCA-Lösung versetzt und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubationszeit werden die gefällten Proteine für 15 min mit 16,000 x g bei 4 °C pelletiert und das Proteinpellet anschließend mit 500 µl Aceton gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wird das Pellet in 200 µl 1 x SDS-Probenpuffer durch Schütteln bei RT für 1-2 h aufgenommen. Die Proben werden dann für 5 min auf 90 °C erhitzt, wieder abgekühlt und mit 16,000 x g für 5 min bei 4°C zentrifugiert, um die unlöslichen Bestandteile abzutrennen.

2.2.2.2 Probenaufbereitung für die Zweidimensionale SDS-PAGE mittels Aceton-Fällung

- o 80 % Ethanol, -20 °C kalt
- o Aceton, -20 °C kalt
- o Zentrifugenröhrchen
- o Zentrifuge: Sorval RC 6+ (Thermo Scientific), Rotor: SLA 1500

Zu jeder Probe werden 10 ml -20 °C kaltes Aceton gegeben, die Probe mit Parafilm verschlossen und über Nacht bei -20 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wird die Probe dreimal mit Aceton und dreimal mit 80 % Ethanol gewaschen. Nach jedem Waschschrift folgt eine Zentrifugation für 10 min bei 10,000 rpm bei 4 °C. Das Pellet wird anschließend lyophilisiert und kann dann für die Zweidimensionale SDS-PAGE verwendet werden.

2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

2.2.3.1 Proteinquantifizierung mit der Bradford-Methode

- o Bradford-Reagenz: 100 mg/l Coomassie Brilliant Blue G250, 5 % Ethanol, 8,5 % Phosphorsäure
- o BSA-Lösung: 0,5 mg/ml BSA (*bovine serum albumin*) in PBS
- o NaCl-Lösung: 150 mM NaCl

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach der Bradford Methode (Ausubel et al., 1990) wurden 100 µl einer Proteinlösung mit 1 ml Bradford-Reagenz vermischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm photometrisch bestimmt. Eine Eichkurve wurde in Doppelbestimmung mit Hilfe einer Verdünnungsreihe von BSA mit NaCl-Lösung im Bereich von 0 - 10 µg Protein angefertigt und durch lineare Regression die Proteinkonzentration berechnet.

2.2.3.2 Proteinquantifizierung mit der Amidoschwarz-Methode

- o Amidoschwarz-Lösung: 14,4 g Amidoschwarz auf 1 l Methanol-Eisessig → über Nacht rühren und filtrieren
- o Methanol-Eisessig: 9 Teile Methanol + 1 Teil Essigsäure
- o Geräte: VERSAmax microplate reader (Molecular Devices)
- o Software: Soft Max Pro 4.8

Bei der Amidoschwarz-Methode von (Popov et al., 1975) wird ein Aliquot der Proteinprobe mit Wasser auf ein Volumen von 100 μ l eingestellt, 200 μ l Färbelösung dazu gegeben, 20 min bei RT inkubiert und gefälltes Protein, an das der Farbstoff Amidoschwarz assoziiert ist, bei 16,000 x g und RT für 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wird anschließend dreimal mit 1 ml Methanol-Eisessig gewaschen und nach der letzten Waschung luftgetrocknet. Zum Abschluss wird es in 500 μ l 0,1 N NaOH aufgenommen und die Messung der Proben erfolgt dann im Mikrotiterplattenleser Titertek Multiskan MCC/340 (Labystems) bei einer Wellenlänge von 600 nm.

2.2.4 Denaturierende SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen

2.2.4.1 Denaturierende SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen nach Laemmli

- o 4x Trenngelpuffer: 1,5 M Tris-HCl; pH 8,8
- o 4x Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris-HCl; pH 6,8
- o Rotiphorese 30: 30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid (Carl Roth)
- o 30 ml Trenngel-Gießlösung für 5 Gele: 6,5 ml 4x Puffer; 8,7 ml Rotiphorese 30; 6 ml 80 % Glycerin; 4,8 ml H₂O; 20 μ l TEMED; 100 μ l 10 % APS
- o 10 ml Sammelgel-Gießlösung für 5 Gele: 2,5 ml 4x Puffer; 1 ml Rotiphorese 30; 2,3 ml 80 % Glycerin; 4,2 ml H₂O; 10 μ l TEMED; 60 μ l 10 %ige APS-Lösung; 2,5 μ l Phenolrot (2000 x von Sigma-Aldrich)
- o 10 x Tris-Glycin-Laufpuffer: 1,92 M Glycin; 250 mM Tris-Base; 1 % SDS

Das Tris-Glycin Gel-System nach der Methode von (Laemmli, 1970) dient der Auftrennung mittlerer und kleiner Proteine. Es wurden Gele mit einem linearen Gradienten von 8-10 %igen Trenngelen und einem 3 %igen Sammelgel verwendet. Zum Herstellen der Gele und zur Elektrophorese kam das *Hofer Mighty Small System SE250* (Amersham Biosciences) mit den Abmessungen 10 x 8 x 0,075 cm und ein Gradienten-Mischer zum Einsatz. Die Probenaufbereitung erfolgte nach Absatz 2.2. Zur elektrophoretischen Auftrennung wurde eine konstante Stromstärke von 10 oder 12,5 mA bei einer Grenzspannung von 220 V angelegt und die Elektrophorese wurde beendet wenn die Bromphenolblau-Lauffront am Ende des Trenngels angekommen ist.

2.2.4.2 Denaturierende SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen nach dem Tris-Acetat-System

- o 4 x Trenngel- und Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris-Acetat; pH 7,0
- o Rotiphorese 30: 30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid (Carl Roth)
- o 13 ml 8 %ige Trenngel-Gießlösung für 5 Gele: 3,25 ml 4 x Puffer; 3,47 ml Rotiphorese 30; 3 ml 80 % Glycerin; 3,28 ml H₂O; 10 µl TEMED; 50 µl 10 % APS-Lösung; 10 µl gesättigte Bromphenolblaulösung
- o 13 ml 3,5 % Trenngel-Gießlösung für 5 Gele: 3,25 ml 4 x Puffer; 1,25 ml Rotiphorese 30; 3 ml 80 % Glycerin; 7,48 ml H₂O; 10 µl TEMED; 50 µl 10 % APS-Lösung;
- o 10 ml Sammelgel-Gießlösung für 5 Gele: 2,5 ml 4 x Puffer; 1 ml Rotiphorese 30; 2,3 ml 80 % Glycerin; 4,2 ml H₂O; 10 µl TEMED; 60 µl 10 %ige APS-Lösung; 5 µl gesättigte Bromphenolblaulösung
- o 20 x Laufpuffer: 1 M Tricine; 1 M Tris-Base; 2 % SDS → Kathodenpuffer wurde frisch mit final 1 mM Gluthation versetzt

Das Tris-Acetat System basiert auf dem NuPAGE-System der Firma Invitrogen und dient der Auftrennung besonders großer Proteine wie Bassoon. Es wurden Gele mit einem linearen Gradienten von 3,5-8 % und einem Sammelgel von 3 % gegossen. Zum Herstellen der Gele und zur Elektrophorese kam das *Hoefer Mighty Small System SE250* (Amersham Biosciences) mit den Abmessungen 10 x 8 x 0,075 cm und ein Gradienten-Mischer zum Einsatz. Die Probenaufbereitung erfolgte nach Absatz 2.2. Zur elektrophoretischen Auftrennung wurde eine konstante Stromstärke von 10 oder 12,5 mA bei einer Grenzspannung von 220 V angelegt und die Elektrophorese wurde beendet wenn die Bromphenolblau-Lauffront aus dem Gel vollständig herausgelaufen war.

2.2.5 Proteinnachweis im SDS-Gel mittels Coomassie-Färbung

- o Färbelösung: 0,1 % Coomassie Blau R250 (Serva); 5 % Methanol ; 10 % Eisessig in H₂O
- o Entfärbelösung : 5 % Methanol in H₂O; 7 % Essigsäure
- o Trocknungslösung: 50 % Methanol; 5 % Glycerin in H₂O

Zum Nachweis von Proteinen im SDS-Gel wird der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau R-250 verwendet. Er lagert sich an die basischen Seitenketten der Aminosäuren an und färbt so die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine. Dazu wird das Gel erst mindestens 30 min in der Färbelösung bei RT inkubiert und anschließend wird nicht gebundenes *Coomassie Blue* durch Inkubation in Entfärbelösung in Gegenwart eines Papiertuchs entfernt. Die Trocknung der Gele erfolgte durch Inkubation für 15 min in Trocknungslösung und anschließender Lagerung zwischen zwei CellophanTM-Folien in einem Geltrocknungsrahmen über Nacht.

2.2.6 Western-Blot-Transfer und Ponceau S-Färbung

- o Transferpuffer: 25 mM Bicine, 25 mM Bis Tris, 1 mM EDTA, 1 % Methanol
- o Immobilon®-FL-PVDF-Membranen (Millipore)
- o Hoefer TE 22 Mini Tank Transphor Unit-System
- o Ponceau S-Färbelösung: 0,5 % Ponceau S; 1 % Essigsäure

Ziel dieser Methode ist es, die durch Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine *Immobilon®-FL-PVDF Membran* zu transferieren und für immunologische Nachweise mit spezifischen Antikörpern zu nutzen. Die hier verwendete elektrophoretische Übertragung von negativ geladenen SDS-Proteinkomplexen aus einem Acrylamid Gel auf eine Membran mit Hilfe eines elektrischen Feldes wurde erstmals von (Towbin et al., 1979) beschrieben. Vor dem Transfer der Proteine auf die *Immobilon®-FL-PVDF-Membran*, muss diese durch Methanol aktiviert werden und in Transferpuffer äquilibriert werden. Der Transfer erfolgt dann bei konstant 200 mA und 4 °C im Transferpuffer-gefüllten *Hoefer TE 22 Mini Tank Transphor Unit-System* für 2-3 h. Hiernach werden die Membranen an der Luft getrocknet.

Um zu überprüfen, ob die Proteine auf die Membran geblottet wurden, wird diese mit Ponceau S angefärbt. Dazu werden nach 15 sec in Methanol die Membranen 5 min in H₂O gewaschen, 15 min mit Färbelösung inkubiert und anschließend solange mit H₂O gewaschen bis die Proteinbanden gut sichtbar sind.

2.2.7 Immundetektion mittels ECL

- o PBS-T: 1 x PBS mit 0,1 % Tween-20 versetzt
- o Blotto: 5 % Magermilchpulver in PBS-T
- o ECL-Detektionssystem: Immobilon™ Western (Millipore) und
- o Hyperfilm-ECL (Amersham Biosciences)
- o Chemostar Imager (INTAS)
- o Entwicklermaschine *Curix60* (Agfa)

Zum immunologischen Nachweis der Proteine mit Epitop-spezifischen Antikörpern wurde folgendes Protokoll angewandt: Blockierung für 1 h bei RT in Blotto, dreimaliges Spülen mit PBS-T, Inkubation für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C mit Primärantikörperverdünnung in PBS-T-5 % BSA-0,025 % NaN₃, dreimaliges Spülen mit Blotto, waschen für einmal 15 min und zweimal 5 min in Blotto bei RT, Inkubation mit Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper in Blotto für 1 h bei RT, dreimaliges Spülen mit PBS-T, waschen für einmal 15 min und dreimal 5 min mit PBS-T bei RT. Die Detektion der an den Zweitantikörper gekoppelten Meerrettich-Peroxidase erfolgte über das ECL (enhanced chemoluminescence) Detektionssystem (Amersham Biosciences oder Millipore) nach Angaben des Herstellers. Die Chemilumineszenz wurde mit Hilfe des Chemostar Imager (INTAS) oder mit Hyperfilm-ECL-Filmen (Amersham Biosciences) detektiert. Die ECL-Filme wurden dann mit der Entwicklermaschine *Curix60* (Agfa) entwickelt. Die weitere Bearbeitung

und Quantifizierung der Bilder erfolgte mit Hilfe der Adobe Photoshop CS5- und Image J-Software. Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe der GraphPad Prism 5-Software und es wurde ein unverbundener t-Test angewendet.

2.2.8 Immundetektion mit Fluoreszenzfarbstoffen

Die Western-Blots mit Fluoreszenzfarbstoffen wurden mit Hilfe des Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR™ Biosciences) entwickelt. Die Prozessierung der Membranen erfolgte größtenteils wie in 2.2.7 beschrieben. Die Unterschiede im Protokoll sind: das Blockieren der Membranen erfolgte in Blotto ohne Tween 20, es wurden Fluorophor-gekoppelte Antikörper verwendet welche sich in einer Stock-Lösung aus 1 x PBS; 0,1 % Tween 20; 1 % BSA; 0,01 % SDS und 0,025 % Natriumazid befanden und der letztmalige Waschschrift der Membranen erfolgte mit PBS ohne Tween 20. Die weitere Bearbeitung und Quantifizierung der Bilder erfolgte mit Hilfe der Adobe Photoshop CS5- und Image J- Software. Für die statistische Analyse wurde ein unverbundener t-Test angewendet und die GraphPad Prism 5-Software verwendet.

2.2.9 Zweidimensionale Gel-Elektrophorese

- o Rehydratisierungs-Puffer: 9 M Urea, 4 % CHAPS, 10 mM Tris, 32 mM DTT, Bromphenolblau auf 10 ml H₂O
- o 2D sample Prep for Nuclear proteins, Pierce
- o IPG-Streifen: Immobiline Dry Strips, pH 3-11, 18 cm von BioRad
- o Equilibrierungs-Puffer: 50 mM Tris-HCl, 6 M Urea, 30 % Glycerol, 2 % SDS, Bromphenolblau, pH 8.8

Die zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE) von Zellkern- und Synaptosomen- Fraktionen (Abschnitte 2.2.1.1 und 2.2.1.2) von C57/BL6-Mäusen wurde in Zusammenarbeit mit Kathrin Pohlmann und Dr. Karl-Heinz Smalla (Leibniz-Institut für Neurobiologie, Speziallabor Molekularbiologische Techniken) durchgeführt. Für die erste Dimension der 2D-PAGE wurden die Proteine in einem ersten Schritt mit Aceton gefällt (Abschnitt 2.2.2.2), und in Rehydratisierungs-Puffer aufgenommen. Die Zellkern-Proteine wurden dann mit dem 2D-Sample Prep for Nuclear Proteins-Kit nach Angaben des Herstellers entsalzt. Im Anschluss erfolgt eine Bestimmung der Proteinkonzentration mit Hilfe der Bradford-Methode (Bio-Rad). Die Proben, die 1 mg Protein enthielten, wurden auf einen IPG-Streifen geladen und durch steigende elektrische Spannung fokussiert. Für die zweite Dimension wurden die IPG-Streifen in Equilibrierungs-Puffer equilibriert und die Proteine mittels SDS-PAGE (11 %ige Gele, Duracryl, Genomic solutions; gel size 24 x 19 cm) in einem Hoefer DALT System nach ihren Molekulargewicht aufgetrennt. Der Proteinnachweis erfolgte mittels Coomassie-Färbung (Abschnitt 2.2.5) oder die Proteine wurden ebenfalls im Hoefer DALT System auf Immobilon®-FL-PVDF-Membranen gebロットet. Die Immundetektion erfolgte wie in Abschnitt 2.2.7 beschrieben

2.2.10 Probenaufbereitung für die massenspektroskopische Analyse

Die Spots auf den entwickelten Filmen wurden mit den Spots auf den Coomassie-Gelen verglichen. Die dabei übereinstimmenden Spots wurden aus dem Coomassie-Gel ausgestochen, mit Trypsin verdaut (Jimenez et al., 2001), über ZIP-TIPs gereinigt (Millipore) und auf eine matrixunterstützte Laserdesorption/Ionisation (MALDI) *target plate* geladen. Die massenspektroskopischen Messungen wurden am Institut für Innere Medizin, Institut für Experimentelle Innere Medizin der medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität durch Dr. Thilo Kähne am MALDI-TOF/TOF Autoflex 3 Smartbeam (BRUKER) durchgeführt.

2.3. Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Präparation und Transformation chemisch kompetenter Zellen E.coli XL10-Gold

- o TB-Lösung: 10 mM PIPES, 55 mM MnCl₂, 15 mM CaCl₂, 25 mM KCl, pH 6,7, Steril filtriert
- o Tetracyclin: 10 µg/ml Tetracyclin-HCl
- o Chloramphenicol: 30 µg/ml Chloramphenicol

Die Transformation chemisch kompetenter E.coli XL 10-Gold-Zellen erfolgte nach dem Protokoll von Inoue et al. (Inoue et al., 1990). Es wurden mit einer *E.coli* XL10-Gold-Übernachtskultur 25 ml 2 x YT-Tetracyclin-Chloramphenicol Medium inokuliert und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. In der mittleren Log-Phase wurden die Zellen dann für 10 min in einem Gemisch aus Eis und Wasser abgekühlt und anschließend für 15 min bei 1000 x g pelletiert. Die Zellen wurden anschließend in 50 ml eiskalter TB-Lösung aufgenommen und auf Eis 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut für 10 min bei 1000 x g pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml eiskalter TB-Lösung aufgenommen. Die resuspendierten Zellen werden dann mit final 7 % DMSO versetzt, in 200 µl Aliquots aufgeteilt und bei -80 °C gelagert.

2.3.2 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

- o Puffer P1: 50 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A; pH 8,0 bei 4 °C
- o Puffer P2: 200 mM NaOH; 1 % SDS
- o Puffer P3: 3,0 M K-Acetat; pH 5,5
- o Tris/HCl: 10 mM Tris/HCl, pH 8,0
- o NANODROP 1000 Spektrophotometer V 3.7

Zur Plasmid-DNA Präparation aus Bakterien wird die alkalische Lyse-Methode von Birnboim und Doly (Birnboim and Doly, 1979) verwendet. Hier werden für eine kleine Plasmid-Präparation 2 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit einer einzelnen

Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Übernachtskultur wird dann für 5 min bei 1000 x g zentrifugiert, das Pellet durch vortexen in 200 µl P1-Lösung resuspendiert, nach Zugabe von 200 µl P2-Lösung vorsichtig umgeschwenkt und zur Lyse für 5 min bei RT inkubiert. Bei Zugabe von 200 µl eiskalten P3-Puffer kommt es dann zur Neutralisation und Fällung der denaturierten Proteine und der chromosomalen DNA. Nach 10 min auf Eis wird dann bei 16,000 x g, RT für 5 min präzipitiertes Material abgetrennt. 500 µl des Überstandes werden dann zu 350 µl Isopropanol pipettiert, vorsichtig gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Durch die anschließende Zentrifugation für 5 min bei 4 °C mit 16,000 x g wird die gefällte Plasmid-DNA pelletiert und einmal mit 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wird dann luftgetrocknet und anschließend in 50 µl 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde dann mit Hilfe des NANODROP 1000 Spektrophotometer V 3.7 gemessen. Die Richtigkeit neu generierter Konstrukte wurde mittels Sequenzierung durch entsprechende Primer überprüft (SEQLAB, Sequence Laboratories Göttingen GmbH).

2.3.3 Restriktionsverdau

Für einen präparativen Verdau von DNA zur Generierung von linearisierten Vektor oder zur Freisetzung von einem DNA-Fragment zur Klonierung wurde eine DNA-Menge eingesetzt, die final 10 µg gewünschtem DNA-Fragment entspricht. Die in 30-50 µl entsprechendem Inkubationspuffer gelöste DNA wurde in Gegenwart von 25-30 U Enzymaktivität für 2-4 h bei der empfohlenen Temperatur (in der Regel 37 °C) inkubiert. Für einen Kontrollverdau zur Identifizierung des erwünschten Plasmides nach einer Ligation wurden 1 µl einer Lösung aus der Mini-Plasmid-Präparation mit 2 U Restriktionsenzym in 20 µl geeignetem Inkubationspuffer für 2-4 h bei der empfohlenen Temperatur (in der Regel 37 °C) umgesetzt.

2.3.4 Nichtdenaturierende Agarosegelelektrophorese und Isolierung von DNA aus Agarose Gelen

- o 6 x Agarosegelauftragspuffer: 60 % Glycerin, 60 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl pH 7,6; 0,15 % Orange G, 0,03 % Xylencyanol
- o Ethidiumbromid-Stammlösung: 10 mg/ml Ethidiumbromid in H₂O
- o Laufpuffer: 1x Tris-Acetat.EDTA (TAE); 50 x TAE: 2 M Tris-Base, 1M Essigsäure, 0,05 M EDTA
- o Gelkammer: wide mini sub cell; mini sub cell (BioRad); power supply 1000/500 (BioRad)
- o DNA-Isolierungskit: Nucleo Spin Extract II (Macherey-Nagel)
- o 10 mM Tris-HCl; pH 7,5

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe von 1 xTAE-gepufferten 0,7-1 %igen Agarosegelen, die pro 100 ml Agaroselösung mit 3 µl Ethidiumbromidstammlösung versetzt wurden. Die DNA-Lösungen wurden in Agarosegellaufpuffer aufgenommen und die Trennung der Moleküle erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 70 V. Identifiziert wurden die DNA-Fragmente über UV-Licht angeregte Fluoreszenz des in die DNA eingebauten Ethidiumbromids und zur Dokumentation wurden von den angeregten Gelen Photographien an der Gel-Dokumentationseinheit *Gel Doc 2000* (BioRad) gemacht. Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach einer Restriktionsendonucleasen-Reaktion (Abschnitt 2.3.3) oder PCR (Abschnitt 2.3.7) wurden die entsprechenden Bereiche aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem DNA-Aufreinigungskit NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers isoliert.

2.3.5 Ligation eines Fragments mit dem entsprechenden Vektor

Um ein optimales Ligations-Ergebnis zu erhalten, werden 1 µl des DNA-Fragments (100 nmol) mit 0,5 µl des vorgesehenen Vektor (100 nmol), 1 µl Ligationspuffer, 0,5 µl *T4 DNA-Ligase* und 6,5 µl H₂O vermischt und für 30-60 min bei 20 °C inkubiert. Als Kontrolle dient ein Ansatz ohne DNA-Fragment.

2.3.6 Hitzeschock Transformation von E.coli XL10-Gold-Zellen

Zur Transformation werden die hitzeschock-kompetenten E.coli-Zellen auf Eis aufgetaut, mit 10 µl des Ligationsansatzes versetzt, vorsichtig gemischt und für 5-15 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgt im PCR Cycler ein Hitzeschock von 42 °C für 30 sec, mit anschließender Überführung der Bakterien in 1 ml SOC-Medium und Inkubation unter Schütteln für 1 h bei 37 °C. Zum Schluss werden die Bakterien bei 1000 x g für 5 min pelletiert, in wenig SOC-Medium resuspendiert und auf dem Plasmid entsprechenden Antibiotika-haltigen Agarplatten ausgestrichen. Die Inkubation der Platten erfolgt bei 37 °C über Nacht.

2.3.7 Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Generierung von DNA-Fragmenten

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) diente der Amplifikation von DNA-Fragmenten. Dazu wurden spezifische Primer verwendet (Abschnitt 2.1.10), die zu den ersten oder letzten 18-21 Basenpaaren der gewünschten Fragmente komplementär waren und zusätzlich eine Sequenz zur Einführung einer Restriktionsschnittstelle trugen. Für einen 50 µl PCR-Ansatz wurden 0,05 µM Vorwärts- und Rückwärts-Primer, 200 µM dNTPs, 1 Unit Phusion-Polymerase und 50-100 ng Matrizen-DNA verwendet. Als Matrizen dienten für die endogen Myc-markierten CtBP1/BARS50 Konstrukte die Ursprungs pBSII-CtBP1/BARS50 Konstrukte

(zur Verfügung gestellt von Dr. Wilko D. Altmann) und für CtBP2 und CtBP2-S eine pACT2-Rattenhirn cDNA-Bibliothek (Clontech). Die PCR-Reaktionen erfolgten unter Variation der *Annealing*-Temperatur nach dem in Tabelle 12 aufgeführten Protokoll.

Tabelle 12 PCR-Programm für die Amplifikation von DNA-Fragmenten

Zyklen	Zeit	Temperatur	
1x	30 s	98 °C	
30x	30 s	98 °C	Denaturierung
	30 s	65 °C	<i>Annealing</i>
	1 min 30 s	72 °C	Elongation
1x	2 min	72°C	

2.4 Zellkultur und Immunocytochemie

2.4.1 Zellkultur von HEK293T-Zellen

HEK293T-Zellen wurden in D-MEM Kulturmedium bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Passage der konfluenten Kulturen erfolgte zweimal pro Woche. Zur Durchführung von Experimenten wurde Antibiotika- und Antimykotika-freies Medium verwendet.

2.4.2 Transfektion von HEK293T-Zellen mit Hilfe der Calciumphosphat-Methode und Herstellung von Lysaten

- o Lösung A: 500 mM CaCl₂ in Zellkultur H₂O, steril gefiltert und bei RT gelagert
- o Lösung B: 140 mM NaCl; 50 mM HEPES; 1,5 mM Na₂PO₄ in Zellkulturwasser; pH 7,05; steril gefiltert und bei RT gelagert
- o steriles Verbrauchsmaterial: Pipetten, Zellkulturflaschen
- o 1xPBS-1 mM MgCl₂-1 mM CaCl₂
- o Benzonase® Nuclease (Sigma)

Einen Tag vor der Transfektion werden die Zellen mit HBSS gewaschen, durch Trypsin gelöst und mit frischem D-MEM-Medium in eine frische 75 cm² Flasche überführt. Am Transfektions-Tag werden 500 µl von Lösung A mit 25 µg Konstrukt-DNA vermischt und zu 500 µl Lösung B gegeben. Nach einer Inkubationszeit von exakt 1 min wird das Gemisch dann zu den, am Vortag vorbereiteten, Zellen gegeben und für 4 h bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Zeit wird das alte Medium entfernt und wieder neues D-MEM-Medium zu den Zellen gegeben. Nach 1-3 Tagen sind die Zellen ausreichend gewachsen. Das alte Medium wird verworfen, die Zellen werden mit 1xPBS-1mM MgCl₂-1mM CaCl₂ gewaschen und in 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Um die im HEK293T-Zell-Lysat enthaltene DNA zu entfernen, wird das Lysat 15 min bei RT mit Benzonase®-Nuclease behandelt, anschließend auf 90 °C

für 5 min erhitzt und dann bei 16,000 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird nach der Zentrifugation in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt und kann jetzt für Westernblot-Analysen verwendet werden.

2.4.3 Präparation von Gliazellkulturen aus Ratten

Hippocampi von P0-P3 Ratten (Stamm: RjHan:Wi; Züchter: Elevage Janvier, Frankreich) wurden in HBSS⁺ präpariert. Anschließend wurde das Gewebe mit HBSS- gewaschen und für 20 min bei 37 °C in Trypsin-EDTA inkubiert. Nach Abnahme des Trypsins wurden die Gewebe in D-MEM Kulturmedium mit Hilfe von 20G x 0,9 mm- und 26G x 0,45 mm-Kanülen sechsmal trituriert und in Kulturflaschen von 75 cm² das Material von zwei Tieren kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und nach Erreichen der Konfluenz (nach ca. 7 Tagen) die Zellen mit Trypsin-EDTA abgelöst und 1:1 passagiert. Die erhaltenen Kulturen wurden nach Erreichen der Konfluenz in D-MEM Kulturmedium mit 10 % DMSO langsam bei -80 °C eingefroren und anschließend bei -150 °C gelagert. 2 – 3 Tage vor der Präparation von hippokampalen Neuronen (siehe 2.4.4) wurden die Zellen aufgetaut und in Schalen (6 cm Durchmesser) in D-MEM-Kulturmedium kultiviert. Am Tag der Präparation wurde ein Medium Wechsel zu Neurobasal™-Kulturmedium durchgeführt.

2.4.4 Primäre hippokampale Neuronenkulturen von Ratten

Zur Präparation von primären hippokampalen Neuronen von Ratten in Banker-Kulturen (Banker and Goslin, 1998) wurden Hippocampi von 18 Tage alten Rattenembryonen präpariert. Dissoziierte Neurone wurde mit niedriger Dichte (15.000 Zellen/Deckgläschen, Durchmesser 18 mm) auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen, die mit je drei Wachspunkten versehen waren, ausplattiert und 1 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen auf Gliazell-Kulturen (Abschnitt 2.4.3) gelegt. Die hippokampalen Primärkulturneuronen wurden von Heidi Wickborn und Annika Lenuweit zur Verfügung gestellt. Die Transfektion der Neurone erfolgte an Tag 3 mit Hilfe der Calciumphosphat-Methode.

2.4.5 Transfektion von hippokampalen Primärkulturneuronen mit Hilfe der Calciumphosphat-Methode

- o OptiMEM (Invitrogen)
- o 2 M CaCl₂
- o 2 x HBS: 274 mM NaCl; 10 mM KCL; 1,4 mM Na₂HPO₄; 15 mM Glucose; 42 mM HEPES; pH 7.06; steril filtriert; gelagert bei -20°C

Pro Deckglas wurden 1 µg DNA, 3,8 ml CaCl₂ und 30 µl Wasser zur Transfektion verwendet. Zu diesem Gemisch wird Tropfen für Tropfen 30 µl HBS pro Deckglas dazu gegeben und das ganze langsam auf einem Vortexer geschüttelt. Anschließend folgt eine Inkubationszeit

von 30 min bei RT im Dunkeln. Die zu transfizierenden Deckgläschen werden während dieser Zeit in eine neue 12 well Platte überführt, die mit frischen, warmen OptiMEM gefüllt ist. Zu jedem Deckgläschen werden 60 µl der Transfektions-Lösung pipettiert und anschließend die Deckgläschen für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation werden die Deckgläschen zweimal mit Neurobasal™ gewaschen und anschließend wieder in ihr Original-Medium überführt. Nach 11 Tagen werden die Neuronen dann fixiert.

2.4.6 Immuncytochemie von hippokampalen Primärkulturneuronen aus Rattenhirn

- o Blockierlösung: 10% Pferdeserum (hitzeinaktiviert); 0,25 % Triton-X 100; 0,025 % Natriumazid; 25 mM Glycin; 1x PBS
- o Mowiol: 2,4 g Mowiol 4-88 (Hoechst); 6 g Glycerin; 6 ml H₂O; 121 ml 0,2M Tris

Die verwendeten Primärkulturneuronen wurden zuerst 3 x mit PBS-0,5 mM MgCl₂-0,5 mM CaCl₂ gewaschen und anschließend für 10 min mit 4 % Formaldehyd-4 % Saccharose fixiert. Zur Entfernung des Formaldehyds wurden die Zellen dann 3 x 5 min mit PBS gewaschen, dann 1 h in Blockierlösung; 1-2 h in Primärantikörperverdünnung in Blockierlösung; 4 x 5 min PBS; 1-1,5 h Sekundärantikörperverdünnung in Blockierlösung im Dunkeln und 4 x 5 min PBS im Dunkeln. Deckgläschen wurden mit Mowiol auf Objektträger eingebettet und bei 4 °C gelagert. Die Anregung der Fluoreszenz durch eine Quecksilber Dampfampe erfolgte am Fluoreszenzmikroskop *Axioplan 2 Imaging* (Zeiss) über die Filter Nr. 44 (Zeiss), 20 (Zeiss) und F41-008 (AHF). Weiterhin wurde entweder das 63 x- oder 20 x-Objektiv zur Aufnahme von Bildern verwendet. Zur Dokumentation wurde jeweils die CCD Kamera Spot RT in Verbindung mit der Software *Meta View* (beide Visitron Systems). Die weitere Bildbearbeitung und Quantifizierung erfolgte über *Photoshop CS5* (Adobe Systems) und *Image J*. Für die statistische Analyse wurde die *Prism 5*-Software (GraphPad) verwendet.

2.4.7 Immun-Elektronenmikroskopie

- o PBS-A: 0,2 % BSA (Bovines Serum Albumin) in 1 x PBS
- o ABC-Komplex: Vector ABC kit; 1:1000

Die Elektronenmikroskop (EM)-Aufnahmen wurden von Dr. Karin Richter angefertigt und zur Verfügung gestellt. Für die Immuncytochemischen Färbungen wurden männliche, adulte Mäuse anästhesiert und transkardial erst für 12 min mit 4 % Formaldehyd in 0,1 M Phosphat-Puffer (pH 7.4) fixiert, die Hirne entnommen und nochmals mit 4 % Formaldehyd über Nacht bei 6 °C fixiert. Von den Hirnen wurden dann an einem Vibratom Sagitalschnitte angefertigt und folgendes Färbe-Protokoll angewandt: Inkubation für 1 h in 10 % Normalen Ziegen Serum (NGS), Zugabe des primären Antikörpers und 0,1 % Natriumazid in die gleiche Lösung und

Inkubation für 72 h bei 6°C, Waschschrift mit PBS, Inkubation mit PBS-A für 1 h, Inkubation mit Biotin-konjugiertem sekundären Antikörper für 20 h bei RT, Waschschrift mit PBS, Inkubation mit einem ABC-Komplex in PBS-A, Waschschrift mit PBS und 0,05 M Tris HCl Puffer (pH 7.6). Anschließend wurde die Aktivität der gebundenen Peroxidase mit einer Lösung aus 1,4 mM DAB und 0,013% H₂O₂ in 0,05 M Tris HCL Puffer sichtbar gemacht. Nach dem Abstoppen der Reaktion wurden die Schnitte für 60 min in 1 % OsO₄ in 0,1 M Cacodylat -Puffer fixiert, in einer Serie von graduierten Ethanol-Bädern dehydriert, inklusive eines 45 minütigen Blockierungsfärben mit 2 % Uranyl Acetat in 70 % Ethanol und dann in Durcupan horizontal eingebettet. Vom Cortex des Cerebellums werden ultradünne Schnitte (70 nm) mit Hilfe einer Ultracut UCT (Leica) geschnitten und unter einem Zeiss EM 900 Mikroskop untersucht. Die Bilder wurden dann mit einer 2k-CCD-Kamera (TRS) aufgenommen.

2.4.8 Immunhistochemie adulter Maushirnschnitte

Adulte Mäuse wurden anästhesiert und mit 4 % Formaldehyd in 0,1 M Phosphat-Puffer (pH 7.4) fixiert. Anschließend wurden die Hirne entnommen, nochmals mit 4 % Formaldehyd über Nacht bei 4 °C fixiert, mit 0,5 M und 1 M Saccharose inkubiert und bei -20 °C eingefroren. Mit Hilfe eines Cryotoms wurden dann 30-40 nm dicke Sagital-Schnitte aus der Ebene des dorsalen Hippokampus angefertigt. Diese Schnitte wurden dann wie folgt weiter behandelt: Inkubation mit 1 % Natriumborhydrat in PBS, Blockierung und Permeabilisierung mit 10 % Pferdeserum, 0,3 % TritonX-100 in PBS für 60 min; primärer Antikörper über Nacht bei 4 °C, erneuter Blockierungsschritt mit 0,4 % BSA; 0,3 % TritonX-100 gefolgt von einer über Nacht Inkubation der Schnitte in sekundärem Antikörper, Waschschrift mit PBS und im Anschluss erfolgte das Einbetten der Schnitte auf Objektträger-Gläser. Die Schnitte wurden freundlicherweise von Annika Lenuweit zur Verfügung gestellt.

3. Ergebnisse

3.1. Untersuchung der räumlichen Expression und subzellulären Lokalisation von CtBP1/BARS50- und CtBP2-Isoformen

Zum weiteren Verständnis der Funktion der CtBP-Proteine bei der Regulation höherer Hirnfunktionen, sollten die regionalen Expressionsmuster der CtBP1/BARS50- und CtBP2-Isoformen im adulten Gehirn untersucht werden. Dazu wurden immunhistochemische Analysen adulter Maushirn-Schnitte und biochemische Analysen der Homogenat- und P2-Fractionen einzelner Hirnareale durchgeführt. Immunocytochemische Analysen hippocampaler Primärkulturneuronen sollten zusätzlich einen Hinweis auf Zelltyp-spezifische Expressionsmuster der CtBP1/BARS50- und CtBP2-Proteine geben.

Zum Verständnis der exakten molekularen Natur des synaptischen CtBP1/BARS50 und der subzellulären Verteilungen der Mitglieder der CtBP-Proteinfamilie wurde die subzelluläre Verteilung der einzelnen CtBP-Isoformen mit Hilfe von quantitativen biochemischen Analysen gereinigter Zellkern- und Synaptosomen-Fractionen und immunocytochemischer Färbungen hippocampaler Primärkulturneuronen untersucht. Für die biochemischen Analysen wurde unter anderem ein, im Rahmen meiner Diplomarbeit hergestellter, N-Terminus-spezifischer Antikörper gegen CtBP1-L verwendet. Außerdem wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Karin Richter immun-elektronenmikroskopische Aufnahmen von CtBP1/BARS50 und CtBP2/RIBEYE gefärbten Synapsen der Molekularschicht des Kleinhirncortex angefertigt. Zur Untersuchung der intrazellulären Verteilung der CtBP1-S/BARS50-, CtBP2- und CtBP2-S-Isoformen, wurden ein intern mit einem Myc-Epitop markiertes CtBP1-S/BARS50-Konstrukt und N-Terminus mit EGFP markierte CtBP2-Konstrukte in hippocampale primäre Neuronenkulturen exprimiert und immunocytochemisch untersucht. Des Weiteren wurde eine vergleichende 2D-gelelektrophoretische Analyse der CtBP1/BARS50-Isoformen in synaptosomalen und nukleären Fractionen durchgeführt. Dies sollte einen weiteren Einblick in die synaptische Natur von CtBP1/BARS50 bieten und gleichzeitig einen ersten Hinweis, auf mögliche Synapsen-spezifische posttranslationale Modifikationen der CtBP1/BARS50-Isoformen geben.

3.1.1 Herstellung eines Antikörpers gegen den spezifischen N-Terminus von CtBP1-L

Die beiden Isoformen des CtBP1-Gens, CtBP1-L und CtBP1-S/BARS50, sind bis auf ihre N-Termini identisch. Da die Epitope der beiden kommerziell erhältlichen CtBP1/BARS50-Antikörper im C-Terminus liegen, war es bis jetzt nicht möglich zwischen den CtBP1-L- und CtBP1-S/BARS50-Isoformen zu unterscheiden. Um das Lokalisationsmuster der CtBP1-L-Isoformen zu untersuchen, musste ein N-Terminus spezifischer Antikörper hergestellt werden. Dazu wurden zwei Meerschweinchen mit einem Keyhole-Limpet-Hämocyanin-(KLH) gekoppelten Peptid, das aus den ersten 13 N-terminalen Aminosäuren von CtBP1-L bestand (Abbildung 4A), immunisiert. Um zu überprüfen, welches der CtBP1-L-N-Terminus-Seren eine spezifische CtBP1/BARS50-Immunantwort zeigt, wurden Westernblot-Streifen von Maushirn-Homogenat gefärbt (gezeigt ist nur das zur Aufreinigung verwendete Rohserum). Als Kontrollen dienten Färbungen der monoklonalen und polyklonalen CtBP1/BARS50-Antikörper, die beide eine spezifische CtBP1/BARS50-Immunreaktivität bei ~50 kDa detektierten. Das nicht gereinigte CtBP1-L-N-Terminus-Serum detektiert, neben zwei Banden bei ~50 kDa, noch weitere Banden mit unterschiedlichen Molekulargewicht (MW) (Abbildung 4B). Nach der Reinigung des Serums, welche im Rahmen meiner Diplomarbeit erfolgte, wurde die Spezifität des neuen CtBP1-L-Antikörpers mittels Westernblot-Streifen von CtBP1/BARS50-GST-Fusionsproteinen und Maushirn-Homogenat untersucht (Abbildung 4C). Der gereinigte CtBP1-L-Antikörper erkennt, auf den mit CtBP1/BARS50-GST-Fusionsproteinen beladenen Westernblot-Streifen, spezifisch nur die CtBP1-L-Isoform bei einem MW von ~70 kDa (rechter Blotstreifen in Abbildung 4C). Bei den restlichen, vom Antikörper detektierten, Banden handelt es sich wahrscheinlich um Abbauprodukte des GST-CtBP1-L-Fusionsproteins. Auf mit Maushirn-Homogenat beladenen Westernblot-Streifen detektiert der Antikörper zwei Banden bei ~50 kDa, wobei diese nur bei sehr hoher Auflösung als Doppel-Bande zu erkennen sind. Eine der Banden läuft auf gleicher Höhe wie die 50 kDa Bande die von den beiden kommerziell erhältlichen CtBP1/BARS50-Antikörpern detektiert wird. Die zweite Bande hat ein etwas größeres MW. Möglicherweise handelt es sich bei der zweiten Bande um eine weitere CtBP1-L-Isoform oder um CtBP1-L, welches in seiner Aminosäuren-Sequenz phosphoryliert ist. Zusätzlich dazu detektiert der Antikörper noch weitere, schwache Banden, die höchstwahrscheinlich unspezifisch sind.

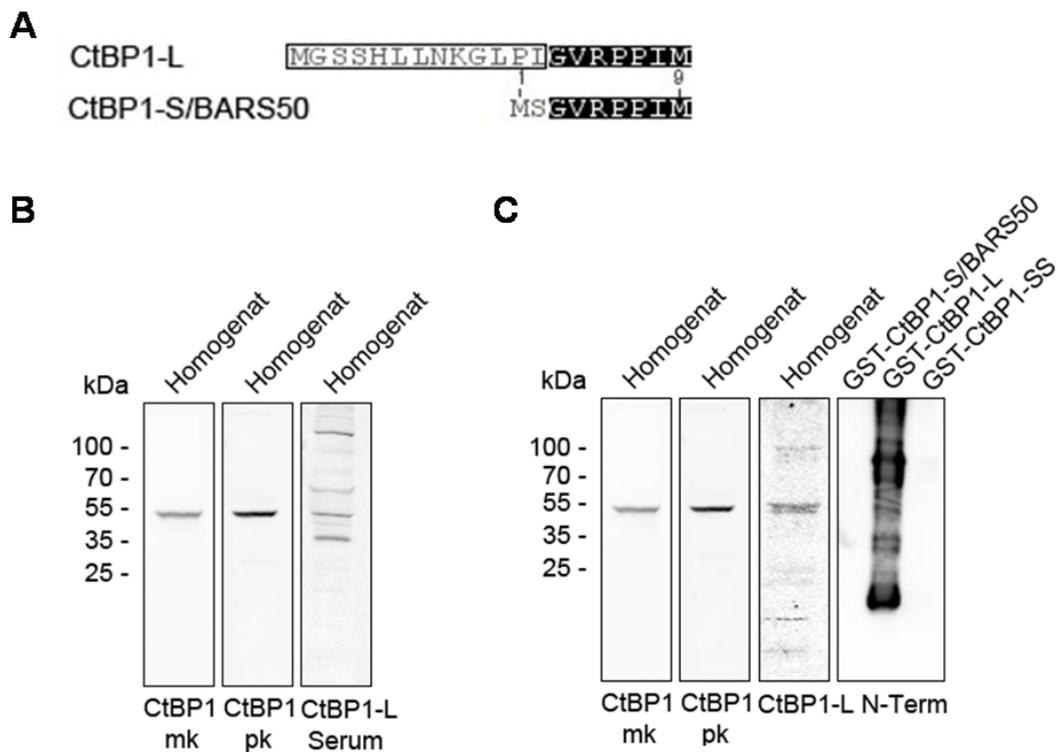


Abbildung 4: Herstellung und Charakterisierung eines Antikörpers gegen den spezifischen N-Terminus von CtBP1-L.

A. Darstellung der jeweils ersten N-terminalen Aminosäuren der CtBP1-L- und CtBP1-S/BARS50-Isoformen. Bei den eingerahmten Aminosäuren der CtBP1-L-Isoform handelt es sich um das, zur Herstellung des CtBP1-L-N-Terminus-Antikörpers, verwendete Peptid.

B. Westernblot-Analyse des CtBP1-L-Rohserums.

Aufgetragen wurden gleiche Proteinmengen (10 µg pro Bahn) von Maushirn-Homogenat. Auf dem ersten und zweiten Westernblot-Streifen detektieren der monoklonale und polyklonale CtBP1/BARS50-Antikörper (CtBP1 mk und pk) jeweils eine spezifische CtBP1/BARS50-Immunreaktivität bei ~50 kDa. Der dritte Blotstreifen wurde mit dem CtBP1-L-Rohserum (CtBP1-L-Serum) behandelt. Dieses detektiert eine starke und eine schwache Bande bei ~50 kDa. Neben diesen zwei 50 kDa-Banden detektiert das Rohserum noch mehrere, schwächere Banden mit unterschiedlichen MW.

C. Westernblot Analyse des gereinigten CtBP1-L-Antikörpers.

Bei den ersten drei Blot-Streifen wurden gleiche Proteinmengen (10 µg pro Bahn) von Maushirn-Homogenat aufgetragen. Der letzte Blot-Streifen wurde mit gereinigtem GST-Fusionsprotein (gleiches Volumen; 10 µl pro Bahn) der drei CtBP1/BARS50-Isoformen beladen. Die beiden CtBP1/BARS50-Antikörper (mk und pk) detektieren jeweils ein spezifisches CtBP1/BARS50-Immunsignal bei ~50 kDa. Der CtBP1-L-Antikörper (CtBP1-L N-Term) detektiert, auf mit Hirnhomogenat beladenen Westernblot-Streifen, zwei Banden bei ~50 kDa und weitere, schwache Banden bei unterschiedlichen MW. Auf dem mit GST-Fusionsproteinen beladenen Westernblot-Streifen, detektiert der gereinigte CtBP1-L-Antikörper spezifisch nur das gereinigte GST-CtBP1-L-Fusionsprotein mit einem MW von ~70 kDa. Bei dem vom Antikörper detektierten Schmier in der gesamten Bahn, handelt es sich wahrscheinlich um Abbau-Produkte des GST-Fusionsproteins.

3.1.2 CtBP1/BARS50 und CtBP2/RIBEYE sind in der gereinigten Synaptosomen-Fraktion angereichert

Zur biochemischen Untersuchung des subzellulären Verteilungsmusters bekannter CtBP1/BARS50- und CtBP2/RIBEYE-Isoformen, mussten Synaptosomen- und Zellkern-Fraktionen mit hoher Ausbeute und Reinheit isoliert werden. Für die Fraktionierung von Synaptosomen wurde ein modifiziertes Protokoll von Phillips (Phillips et al., 2001) verwendet. Die Reinheit der präparierten Synaptosomen wurde mittels Westernblot-Analysen der einzelnen Fraktionen überprüft (Abbildung 5A). So zeigte die Färbung der Westernblot-Streifen mit einem Bassoon-Antikörper, eine starke Anreicherung des CAZ-Proteins in der Synaptosomen-Fraktion. Weiterhin detektierte auch der Antikörper gegen Synaptophysin 1, einem synaptischen Vesikel-Membran-Protein, ein starke Bande in der Synaptosomen-Fraktion. Der Antikörper gegen den neuronalen Zellkernmarker NeuN detektiert nach Angaben des Herstellers 3 Banden, zwei spezifische Banden mit einem MW von 46 und 48 kDa, und eine unspezifische Bande bei einem MW von ~66 kDa. In der Synaptosomen-Fraktion detektiert der Antikörper nur die unspezifische Bande bei ~66 kDa. Wie zu erwarten war, wurde auch CtBP1/BARS50 stark in der Synaptosomen-Fraktion angereichert. Unerwartet war allerdings, das sehr starke Signal des monoklonalen CtBP2/RIBEYE-Antikörpers in dieser Fraktion. Zuerst wurde hier von einer präparationsbedingten Kontamination von CtBP2 aus der Zellkern Fraktion ausgegangen. Es wurden dann verschiedene Modifikationen des Präparations-Protokoll vorgenommen (nicht gezeigte Daten), welche allerdings keinen Einfluss auf das Phänomen hatten.

Zur Präparation von Zellkernen aus Maushirn wurde das CellLytic™ NuCLEAR™-Kit von Sigma verwendet. Dieses Kit bot die beste Kombination aus Reinheit der Zellkern-Fraktion und Schnelligkeit der Präparation. Auch hier wurde die Reinheit der einzelnen Fraktionen mittels Westernblot-Analysen überprüft (Abbildung 5B). Der neuronale Zellkernmarker NeuN ist spezifisch in der Zellkern-Fraktion angereichert, da er zwei Banden bei einem MW von ~46-48 kDa detektiert. Auch detektieren sowohl der CtBP1/BARS50- als auch der CtBP2/RIBEYE-Antikörper in der Zellkern-Fraktion jeweils eine spezifische Immunreaktivität bei ~50 kDa. Im Gegensatz dazu ist das CAZ-Protein Bassoon nicht in der Zellkern-Fraktion angereichert. Nur der Synaptophysin1-Antikörper detektiert ein schwaches Signal in der Zellkern-Fraktion, was auf eine leichte Kontamination der Zellkern-Fraktion mit synaptischem Vesikel-Material hindeutet.

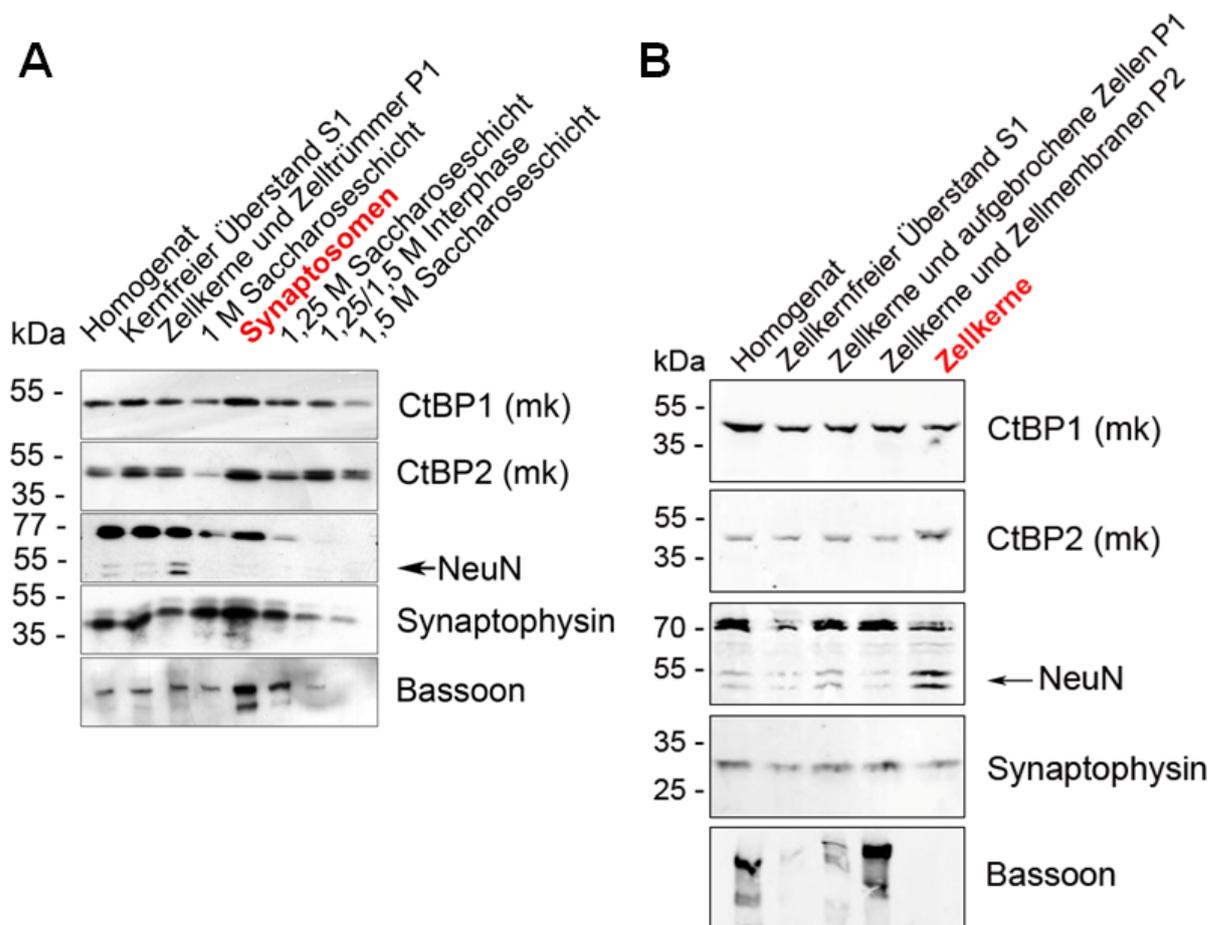


Abbildung 5: Präparation von gereinigten Synaptosomen- und Zellkern-Fractionen

A. Westernblot-Analyse der gereinigten Synaptosomen und der bei der Aufreinigung entstandenen einzelnen Fraktionen. Aufgetragen wurden von jeder Fraktion die gleiche Proteinmenge (10 µg pro Bahn). Der CtBP1/BARS50-Antikörper (mk) und die Antikörper gegen Synaptophysin1 und Bassoon zeigen eine starke Anreicherung aller drei Proteine in der Synaptosomen-Fraktion. Unerwartet ist, das starke Signal des CtBP2/RIBEYE-Antikörpers (mk) in der Synaptosomen-Fraktion. Diese Bande kann zudem nicht auf eine Kontamination der synaptosomalen Fraktion mit Zellkern-Material zurück geführt werden, da der neuronale Zellkernmarker NeuN in der Synaptosomen-Fraktion nur eine unspezifische Bande bei ~66 kDa detektiert.

B. Westernblot-Analyse gereinigter Zellkerne und der bei der Aufreinigung entstandenen einzelnen Fraktionen. Auch hier wurden wieder von allen Fraktionen gleiche Proteinmengen (10 µg pro Bahn) aufgetragen. Wie zu erwarten war, zeigen sowohl der CtBP1/BARS50- als auch der CtBP2/RIBEYE-Antikörper eine starke Bande in der Zellkern-Fraktion. Zudem ist auch NeuN stark in der Zellkern-Fraktion angereichert. Das CAZ-Protein Bassoon kann dagegen nicht in der Zellkern-Fraktion detektiert werden. Nur der Antikörper gegen Synaptophysin 1 detektiert eine schwache Kontamination der Zellkern-Fraktion mit synaptischem Vesikel-Material.

3.1.3 Untersuchung der CtBP1/BARS50- und CtBP2/RIBEYE-Antikörper auf Kreuzreaktivität

Um sicherzugehen, dass die kommerziell erhältlichen Antikörper gegen CtBP1/BARS50 und CtBP2/RIBEYE in den folgenden Experimenten spezifisch ihre jeweiligen Isoformen erkennen, wurden die Spezifitäten der Antikörper auf Westernblot-Streifen überprüft. Diese wurden mit Maushirn- oder Retina-Homogenat sowie mit Lysat von HEK293T-Zellen, die mit EGFP-, CtBP1- oder CtBP2-Konstrukten transfiziert wurden, beladen. Von den HEK293T-Zell-Lysaten wurden jeweils gleiche Volumina (10 µl pro Tasche) und von den Homogenaten die gleiche Proteinmenge (10 µg pro Tasche) geladen.

3.1.3.1 Untersuchung der monoklonalen und polyklonalen CtBP1/BARS50-Antikörper

Die monoklonalen und polyklonalen CtBP1/BARS50-Antikörper (Abbildung 6 A und B) detektieren in allen untersuchten Fraktionen jeweils das endogene CtBP1/BARS50, bei einem apparenten Molekulargewicht von ~50 kDa. Dabei ist das CtBP1/BARS50-Immunsignal auf den mit Lysat von EGFP-CtBP1-Konstrukt transfizierten HEK293T-Zellen beladenen Westernblot-Streifen besonders stark, was wahrscheinlich auf eine Degradation des EGFP-CtBP1-Fusionsproteins zurückzuführen ist. Zusätzlich dazu detektieren beide Antikörper, auf mit Lysat von EGFP-CtBP1-Konstrukt transfizierten HEK 293T-Zellen beladenen Westernblot-Streifen, stark das überexprimierte EGFP-CtBP1-Fusionsprotein (70 kDa). Dagegen wird von beiden Antikörpern weder das überexprimierte EGFP-CtBP2-Konstrukt noch RIBEYE im Retina-Homogenat detektiert. Somit sind beide Antikörper spezifisch für CtBP1/BARS50 und zeigen keine Kreuzreaktivität mit CtBP2/RIBEYE. Als Kontrolle der überexprimierten EGFP-CtBP-Fusionsproteine wurde ein GFP-Antikörper verwendet, welcher auf mit Lysat von CtBP-Konstrukten transfizierten HEK293T-Zellen beladenen Westernblot-Streifen mehrere Banden bei 70 kDa erkennt. Dagegen erkennt der Antikörper, auf mit Lysat von untransfizierten HEK293T-Zellen beladenen Westernblot-Streifen, keine Banden (Abbildung 6C).

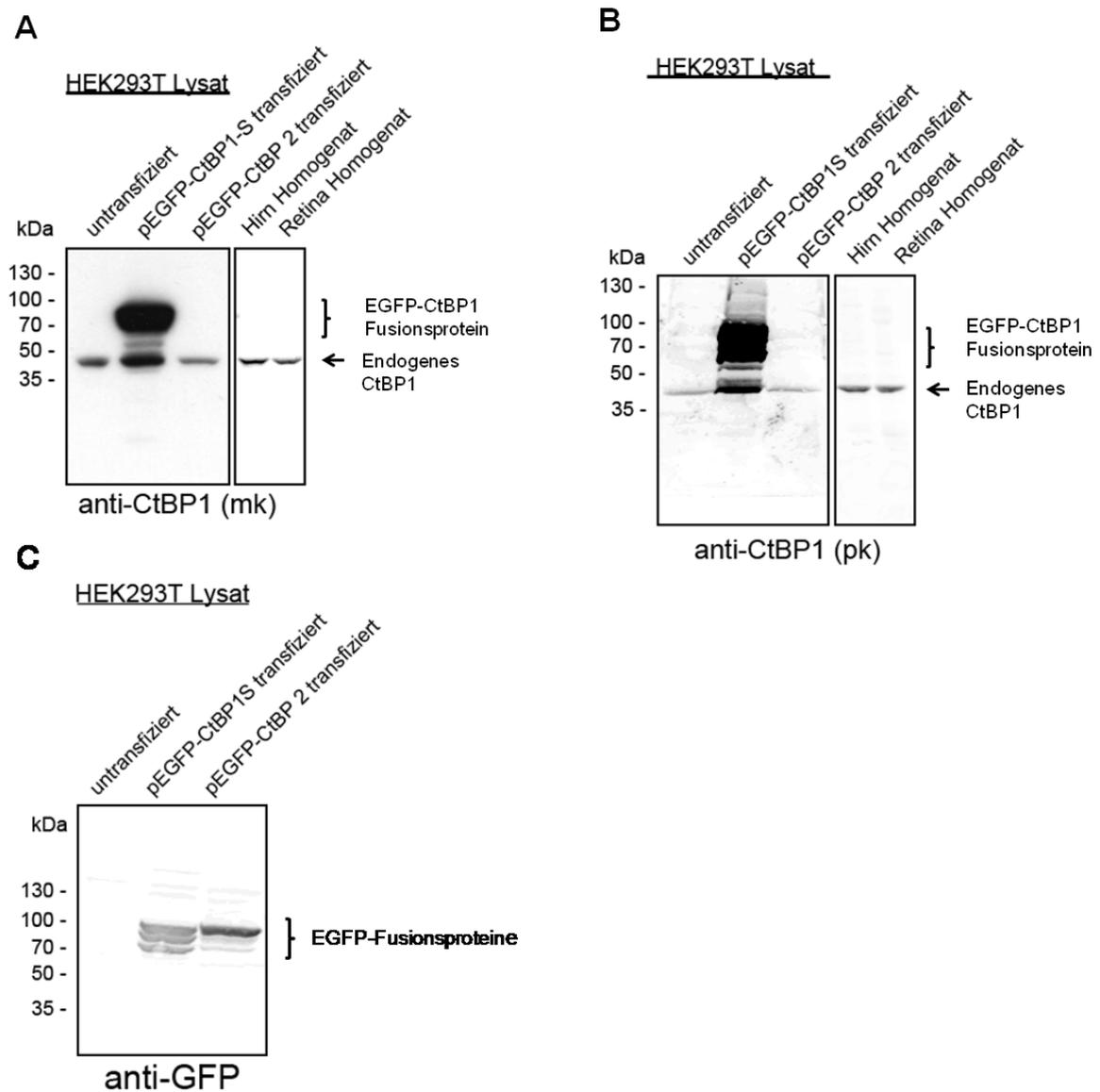


Abbildung 6: Für beide CtBP1/BARS50-Antikörper kann eine Kreuzreaktivität mit CtBP2/RIBEYE ausgeschlossen werden.

Von den Lysaten der mit den EGFP-CtBP-Konstrukten transfizierten HEK293T-Zellen wurden gleiche Volumina (10 µl pro Bahn), von den Homogenaten gleiche Proteinmengen (10 µg pro Bahn) geladen.

A. Der monoklonale CtBP1/BARS50-Antikörper (mk) detektiert in allen Fraktionen das endogene CtBP1 (~50 kDa). Auf mit Lysaten von EGFP-CtBP-Konstrukten transfizierten Westernblot-Streifen detektiert er das EGFP-CtBP1-Fusionsprotein (~70 kDa), aber nicht das EGFP-CtBP2-Fusionsprotein. Zudem erkennt er, auf mit Retina-Homogenat beladenen Westernblot-Streifen, RIBEYE nicht.

B. Der polyclonale CtBP1/BARS50-Antikörper (pk) erkennt in allen Fraktionen das endogene CtBP1 (~50 kDa). Daneben detektiert er, auf mit Lysaten von EGFP-CtBP-Konstrukten transfizierten HEK293T-Zellen beladenen Westernblot-Streifen, das EGFP-CtBP1-Fusionsprotein, aber nicht das überexprimierte EGFP-CtBP2-Fusionsprotein. Auf mit Retina-Homogenat beladenen Westernblot-Streifen detektiert er keine RIBEYE-Doppelbande bei ~110 und 120 kDa.

C. Der polyclonale GFP-Antikörper detektiert die überexprimierten EGFP-CtBP1- und CtBP2-Fusionsproteine. Dagegen detektiert der Antikörper kein Signal, auf dem mit untransfiziertem HEK293T-Zell-Lysat beladenen Westernblot-Streifen.

3.1.3.2 Untersuchung des monoklonalen, polyklonalen CtBP2/RIBEYE- und des RIBEYE A-Domänen-Antikörpers

Die beiden monoklonalen und polyklonalen CtBP2/RIBEYE-Antikörper detektieren, in allen untersuchten Fraktionen, eine Doppel-Bande bei einem apparenten MW von ~46 und 49 kDa (Abbildung 7 A und C). Hierbei handelt es sich höchst wahrscheinlich um die beiden endogenen CtBP2-Isoformen CtBP2 und CtBP2-S (Vergier et al., 2006). Diese unterscheiden sich nur gering in ihren kalkulierten MW, was die Auflösung beider Isoformen (Banden) erschwert. Auch detektieren beide Antikörper, auf mit Retina-Homogenat beladenen Westernblot-Streifen, die RIBEYE-Doppelbande bei einem MW ~110 und 120 kDa. Zusätzlich dazu wird von beiden Antikörpern das überexprimierte EGFP-CtBP2-Fusionsprotein, mit einem MW von ~70 kDa, detektiert. Wohingegen sie mit dem EGFP-CtBP1-Fusionsprotein keine Kreuzreaktivität zeigen. Somit kann die Spezifität beider Antikörper für CtBP2/RIBEYE bestätigt werden. Im Gegensatz zum monoklonalen CtBP2/RIBEYE-Antikörper detektiert der polyklonale CtBP2/RIBEYE-Antikörper in allen Fraktionen, außer der Maushirn-Homogenat-Fraktion, eine zusätzliche Bande bei ~250 kDa. Diese Bande konnte auch in gereinigten Zellkern-Fractionen nachgewiesen werden, wohingegen sie nicht in Synaptosomen-Fractionen exprimiert zu sein scheint (Abbildung 7D). Da diese Bande nicht vom monoklonalen CtBP2/RIBEYE-Antikörper detektiert wird, handelt es sich bei dieser Bande wahrscheinlich um eine Kreuzreaktivität des polyklonalen CtBP2/RIBEYE-Antikörpers. Da diese Bande aber vorallem in der gereinigten Zellkern-Fraktion und nicht in der Synaptosomen-Fraktion auftritt, kann dieser Antikörper trotzdem zur Untersuchung der synaptischen CtBP2-Expression im adulten Nagerhirn verwendet werden. Der polyklonale RIBEYE A-Domänen-Antikörper detektiert in allen drei, mit den Lysaten der HEK293T-Zellen und den mit Mausgehirn-Homogenat beladenen, Westernblot-Streifen kein oder ein sehr schwaches, unspezifisches Signal. Nur auf dem mit Retina-Homogenat beladenen Westernblot-Streifen, detektiert der Antikörper spezifisch zwei Banden bei einem MW von ~110 und ~120 kDa (Abbildung 7B). Somit kann davon ausgegangen werden, dass der RIBEYE A-Domänen-Antikörper spezifisch nur RIBEYE und nicht CtBP2 erkennt. Zudem kann eine Lokalisation von RIBEYE an chemischen Synapsen des Mausgehirns weitgehend ausgeschlossen werden.

Diese Ergebnisse, zusammen mit den Ergebnissen der Synaptosomen-Präparation, deuten daher darauf hin, dass CtBP2 genau wie CtBP1 an konventionellen chemischen Synapsen lokalisiert ist.

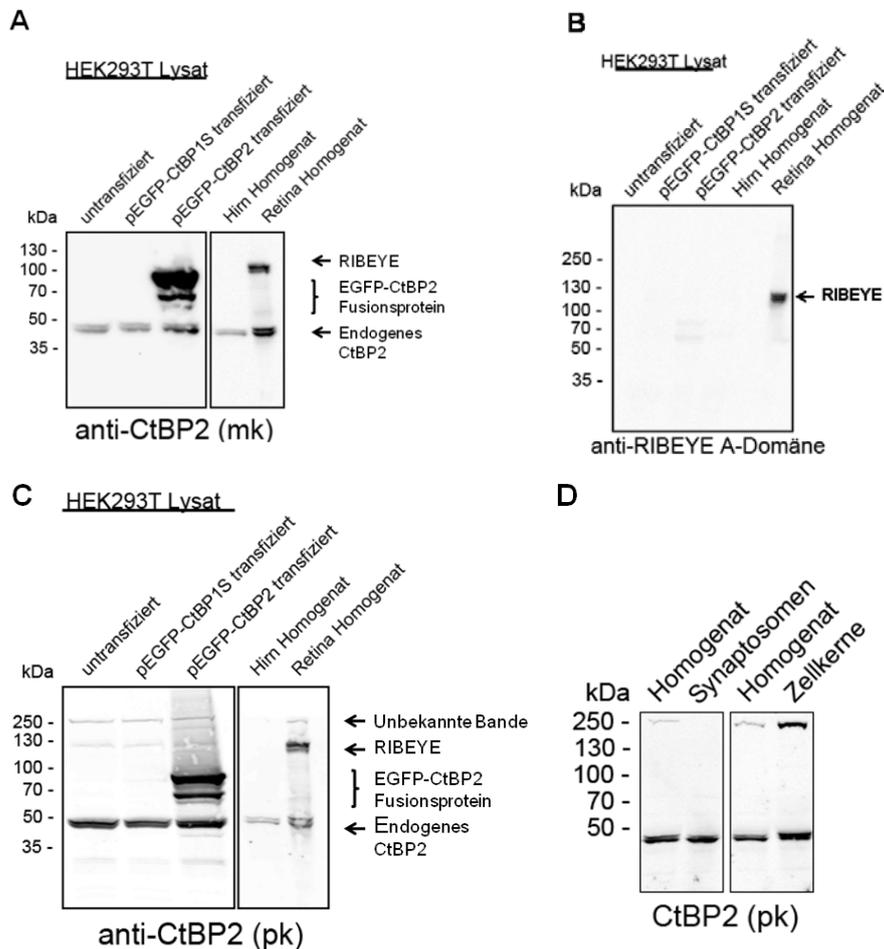


Abbildung 7: Alle drei untersuchten CtBP2/RIBEYE-Antikörper zeigen keine Kreuzreaktivität mit CtBP1/BARS50. Von den Lysaten der mit den EGFP-CtBP-Konstrukten transfizierten HEK293T-Zellen wurden gleiche Volumina (10 µl pro Bahn), von den Homogenaten gleiche Proteinmengen (10 µg pro Bahn) geladen.

A. Der monoklonale CtBP2/RIBEYE-Antikörper (mk) erkennt hier in den Lysaten der HEK293T-Zellen das endogene CtBP2 (~50 kDa), das überexprimierte EGFP-CtBP2-Fusionsprotein aber nicht das überexprimierte EGFP-CtBP1-Fusionsprotein. Zudem erkennt der Antikörper, auf Westernblot-Streifen mit Retina-Homogenat, sowohl die CtBP2-Doppelbände (~50 kDa) als auch die RIBEYE-Doppelbände (~110 und 120 kDa).

B. Der polyklonale RIBEYE-A-Domänen-Antikörper detektiert nur auf den Westernblot-Streifen mit Retina-Homogenat, eine spezifische Doppelbände bei ~110 und 120 kDa. Auf den anderen vier Westernblot-Streifen ist entweder kein oder unspezifisches Signal zu sehen.

C. Auch der polyklonale CtBP2/RIBEYE-Antikörper (pk) detektiert in allen Fraktionen das endogene CtBP2 (~50 kDa). Zudem erkennt er, auf mit Lysaten von EGFP-CtBP-Konstrukten transfizierten HEK293T-Zellen beladenen Westernblotstreifen, das überexprimierte EGFP-CtBP2-Fusionsprotein aber nicht das EGFP-CtBP1-Fusionsprotein. Im Retina-Homogenat detektiert er RIBEYE (~110 und 120 kDa). Zu beachten ist hier die zusätzlich vom Antikörper in allen Fraktionen, außer der Maushirn-Homogenat-Fraktion, detektierte Bande bei ~250 kDa.

D. Die einzelnen Fraktionen wurden aus Mausgehirn präpariert und von jeder Fraktion wurden die gleichen Proteinmengen (10 µg pro Tasche) geladen. Die unbekannte Bande bei ~250 kDa wird stark im Zellkern exprimiert. Dagegen ist sie auf Westernblot-Streifen von Maushirn-Homogenat nur schwach detektierbar und in der Synaptosomen-Fraktion ist keine Bande sichtbar.

3.1.4 Untersuchung der räumlichen und Zelltyp-spezifischen Expressionsmuster von CtBP1/BARS50 und CtBP2 im adulten Maushirn

3.1.4.1 Immunhistochemie von Maus-Hirnschnitten mit CtBP1/BARS50- und CtBP2/RIBEYE-Antikörpern

In ersten biochemischen Untersuchungen von Synaptosomen-Fractionen zeigte der CtBP2/RIBEYE-Antikörper eine eindeutige Anreicherung von CtBP2 in dieser Fraktion. Da in anschließenden Experimenten eine Kreuzreaktivität des Antikörpers mit CtBP1/BARS50 ausgeschlossen werden konnte, sollte jetzt das Expressionsmuster von CtBP2 im adulten Gehirn überprüft werden. Dazu wurden fixierte Sagital-Schnitte (lateral 1,8 mm) von adulten Mäusehirnen angefertigt und mit einem monoklonalem CtBP1/BARS50-Antikörper sowie einem polyklonalen CtBP2/RIBEYE-Antikörper immunhistochemisch untersucht. Dies geschah mit freundlicher Unterstützung von Dr. Anna Fejtova und Annika Lenuweit. Um die nukleäre und synaptische Lokalisation von CtBP1/BARS50 und CtBP2 zu untersuchen, wurden die Maushirn-Schnitte mit einem Präsynapsen-Marker, einem Antikörper gegen das CAZ-Protein Bassoon, und einem Zellkern-Marker, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) ko-färbt. In einem ersten Schritt wurden dann Übersichtsbilder angefertigt und die Expression von CtBP1/BARS50 und CtBP2 im gesamten Gehirn untersucht (Abbildung 8 A und B). CtBP1/BARS50 (Abbildung 8 A) wird im gesamten Gehirn exprimiert, wobei die CtBP1/BARS50-Expression die Verteilung des CAZ-Proteins Bassoon im Neuropil vieler Hirnareale wieder spiegelt. Dabei konnte im Vorderhirn und im Cerebellum eine besonders starke CtBP1/BARS50-Immunreaktivität detektiert werden. Dagegen war die detektierte Immunreaktivität im Hirnstamm (Medulla oblongata, Pons und Mittelhirn), mit Ausnahme der Substantia nigra, geringer (Abbildung 8 A). In der weißen Substanz (*Corpus callosum*, *Capsula interna*, *Pedunculus cerebri*, *Pedunculus cerebellaris* und der Trakt des *Nervus trigeminus*) des Gehirns war eine CtBP1/BARS50-Immunreaktivität nur in einigen Zellkernen sichtbar (siehe Pfeile in Abbildung 8D). Im Diencephalon ist die CtBP1/BARS50-Expression im *Subthalamus* höher als im *dorsalen Thalamus*. In den inneren Großhirnstrukturen ist die CtBP1/BARS50-Immunreaktivität im *Globus pallidus* und dem *ventralen Pallidum* höher als im *ventralen* und *caudaten Putamen*. Im Gegensatz dazu ist die Bassoon-Immunreaktivität im ventralen Putamen (*Nucleus accumbens* und *Tuberculum olfactorium*) hoch. Der polyklonale CtBP2/RIBEYE-Antikörper (Abbildung 8 B) detektiert, neben einer eindeutig nukleären CtBP2-Immunreaktivität im gesamten Gehirn, eine starke CtBP2-Immunreaktivität im Neuropil des Bulbus olfactorius und des Cerebellums, wobei diese im Gegensatz zu CtBP1/BARS50 und Bassoon auch in der Körnerschicht des Kleinhirn-Cortexes sichtbar ist.

Zusätzlich dazu ist auch in den Neuropil-Schichten des Hippokampus und des *cerebralen* Cortexes eine diffuse CtBP2-Immunreaktivität lokalisiert.

Im Kleinhirn ist die Immunreaktivität des CtBP1/BARS50-Antikörpers auf das Neuropil der Molekularschicht und die Zellkerne in der Purkinje-Zellschicht beschränkt (Abbildung 8 C). Im Gegensatz dazu ist die CtBP2-Immunreaktivität diffus in der Molekular-, Purkinjezell- und Körnerschicht zu finden, wo sie im Zellkern verschiedener Kleinhirn-Zelltypen und im Neuropil des *Stratum moleculare* lokalisiert ist (Abbildung 8C). Dies deutet somit auf eine synaptische Lokalisation von CtBP2 im Kleinhirn-Cortex hin.

Im Hippokampus detektiert der CtBP1/BARS50-Antikörper CtBP1/BARS50 in allen Molekularschichten, wobei auch hier die CtBP1/BARS50-Immunreaktivität die Färbung des Bassoon-Antikörpers wieder spiegelt (Abbildung 8D). So ist die CtBP1/BARS50-Immunreaktivität vor allem im *Subiculum*, in der polymorphen Zellschicht des *Gyrus dentatus* und im *Stratum lucidum* der CA3-Region besonders stark. Im Gegensatz zu Bassoon konnte eine CtBP1/BARS50-Immunreaktivität auch in der Körnerschicht des *Gyrus dentatus*, der Pyramidenzellschicht der CA1-Region und schwächer in der Pyramidenzellschicht der CA2- und CA3-Region des Ammonshorns detektiert werden. Die CtBP2-Immunreaktivität war im Hippokampus vor allem in den Zellkörpern der Körnerschicht des *Gyrus dentatus*, der Pyramidenzellschicht der CA3- und besonders der CA2-Region sehr stark. Dagegen konnte in der Pyramidenzellschicht der CA1-Region praktisch keine CtBP2-Immunreaktivität nachgewiesen werden. Neben dieser Zellkern-ständigen Färbung konnte auch in den Molekularschichten der CA1-3-Regionen des Ammonshorns, der polymorphen Zellschicht des *Gyrus dentatus* und im *Stratum lucidum* der CA3-Region (siehe Pfeil in Abbildung 8D) eine diffuse CtBP2-Immunreaktivität nachgewiesen werden (Abbildung 8D).

Im Cortex findet sich die CtBP1/BARS50-Immunreaktivität in allen sechs Zellschichten (Abbildung 8E). Die CtBP2-Immunreaktivität ist dagegen in der oberen Schicht fünf (*Lamina pyramidalis interna*) besonders stark. Diese Schicht zeichnet sich durch sehr große Pyramidenzellen und einer mittleren Zelldichte aus. Zudem ist diese Zellschicht vor allem in motorischen Cortex-Bereichen besonders stark ausgebildet. Eine CtBP2-Immunreaktivität im Neuropil findet sich zudem in den Cortex-Zellschichten eins bis fünf (Abbildung 8E).

Zusammenfassend zeigt diese Untersuchung, dass CtBP1/BARS50 generell stärker im Neuropil als im Zellkern, CtBP2 dagegen stärker im Zellkern als im Neuropil exprimiert wird. Gleichzeitig zeigen die Expressionsmuster der CtBP1/BARS50- und CtBP2-Isoformen aber auch regionale Unterschiede. So konnte z. B. im Hippokampus in der Körnerschicht der CA1-Region des Ammonshorns eine CtBP1/BARS50-Immunreaktivität detektiert werden, wohingegen für CtBP2 praktisch keine Immunreaktivität nachgewiesen werden konnte. Gleichzeitig kann hier erstmals eine CtBP2-Immunreaktivität im Neuropil des *Stratum moleculare* des Kleinhirn-Cortexes gezeigt werden.

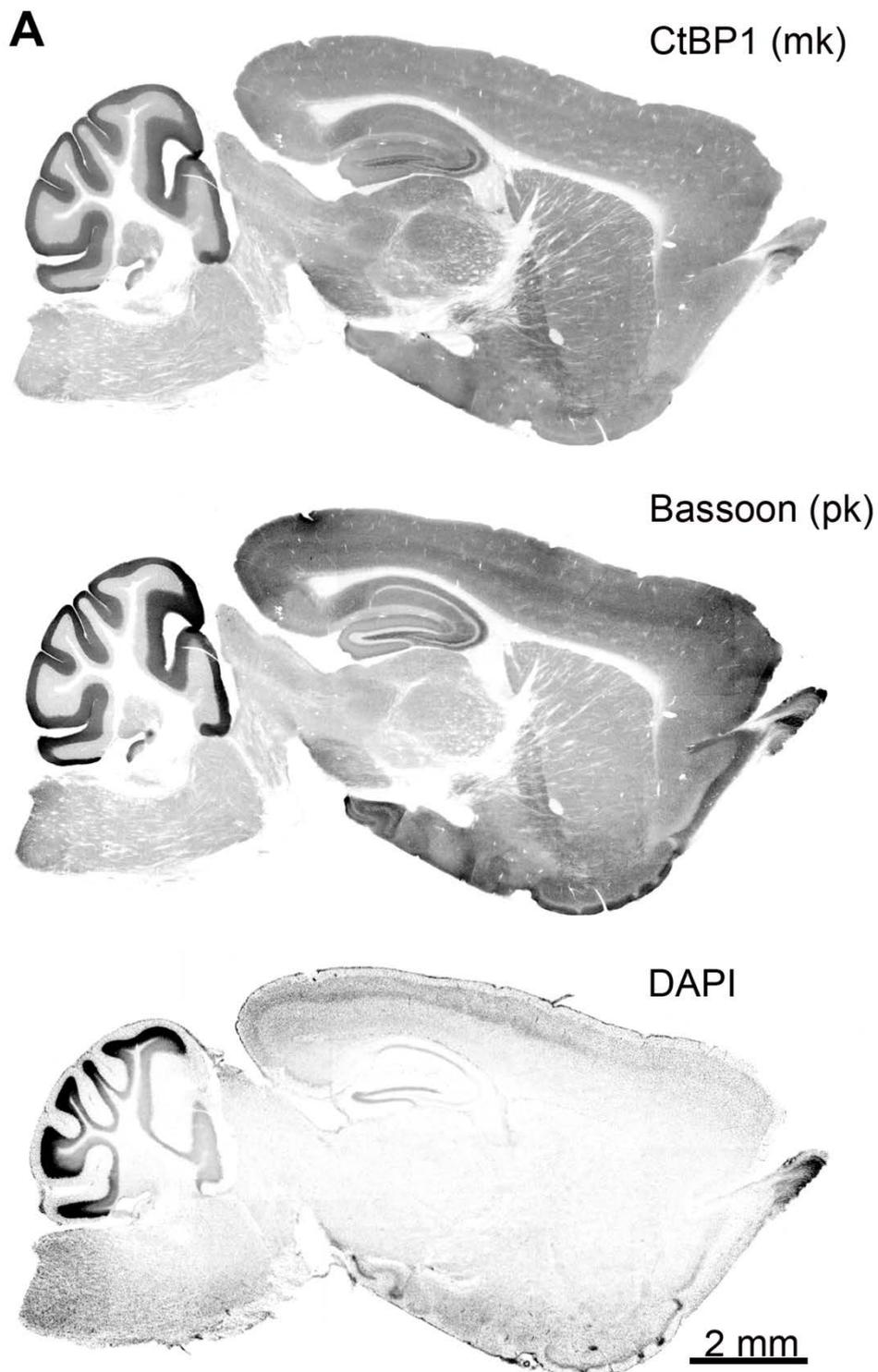


Abbildung 8 A: Expression von CtBP1/BARS50 im adulten Mausgehirn
Für die synaptische Färbung wurde ein Antikörper gegen Bassoon, für die nukleäre Färbung DAPI verwendet. CtBP1/BARS50 wird, in allen untersuchten Hirnarealen des Mausgehirn, sowohl in der weißen als auch grauen Substanz, exprimiert. Dabei spiegelt die CtBP1/BARS50 in vielen Teilen die synaptische Färbung des Antikörpers gegen Bassoon wieder. Das Bild wurde von Dr. Anna Fejtova zur Verfügung gestellt.

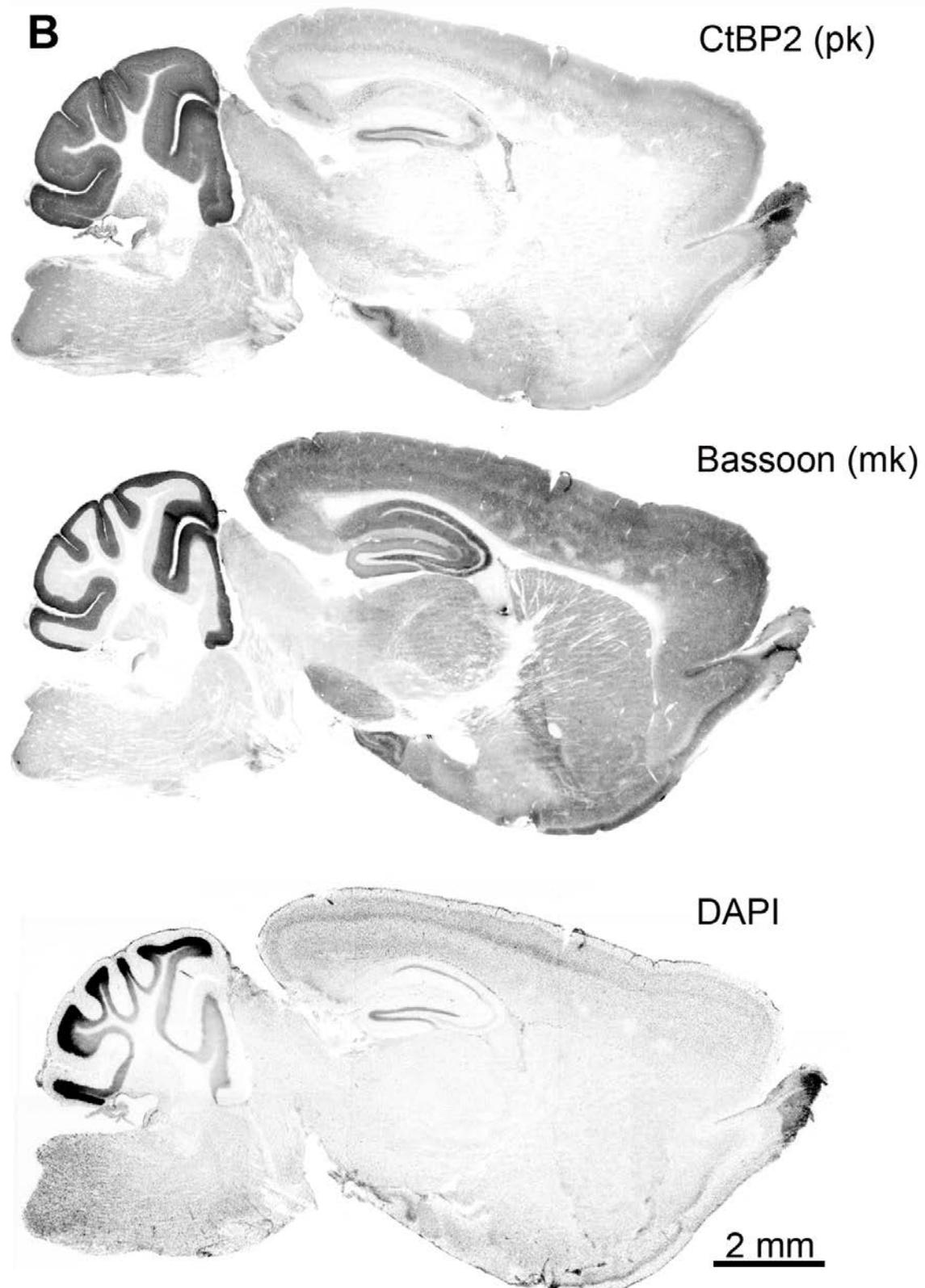


Abbildung 8 B: Expression von CtBP2/BARS50 im adulten Maushirn
CtBP2/RIBEYE wird neben seiner Zellkern-ständigen Lokalisation vor allem im Neuropil des Kleinhirn *Stratum moleculare* und des Bulbus olfactorius exprimiert. Als Synapsen-Marker wurde ein Antikörper gegen Bassoon, als Zellkern-Marker DAPI verwendet. Das Bild wurde von Dr. Anna Fejtova zur Verfügung gestellt.

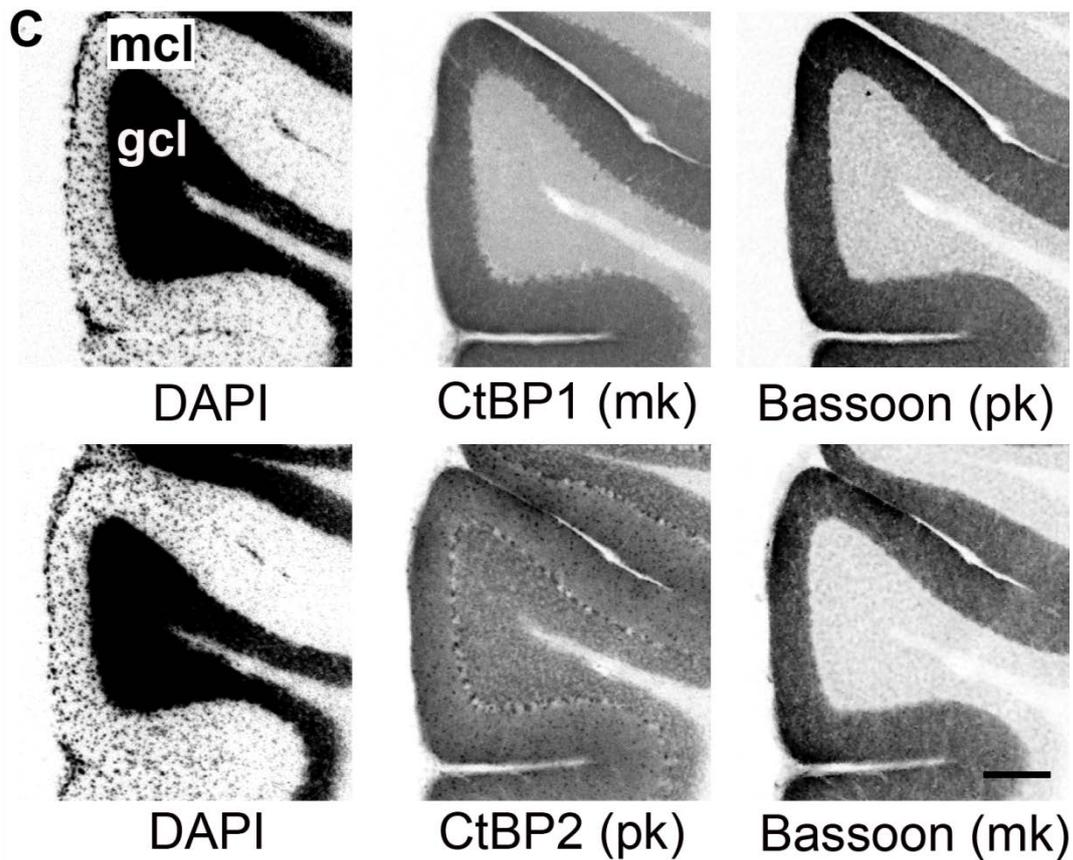


Abbildung 8 C: Expression von CtBP1/BARS50 und CtBP2 im Kleinhirn-Cortex
 Als Zellkern-Marker wurde DAPI, als Synapsen-Marker Bassoon verwendet.
 CtBP1/BARS50 wird nur in der Purkinje-Zellschicht und der Molekularschicht des Kleinhirn-Cortexes exprimiert. In der Purkinje-Zellschicht ist die CtBP1-Immunreaktivität im Zellkern lokalisiert, wohingegen sie in der Molekularschicht im Neuropil lokalisiert ist. Zudem spiegelt die Neuropil-Färbung die synaptische Färbung des Bassoon-Antikörpers wieder.
 Die CtBP2-Immunreaktivität wird in allen drei Zellschichten, „*Stratum granulosum*, *Stratum purkinjense* und *Stratum moleculare*“, des Kleinhirn-Cortexes zellkernständig detektiert. Zusätzlich dazu, findet sich auch im Neuropil des „*Stratum moleculare*“ eine starke CtBP2-Expression. Abkürzungen: gcl: *Stratum granulosum*; mcl: *Stratum moleculare*. Das Bild wurde von Dr. Anna Fejtova zur Verfügung gestellt. Der Größenbalken entspricht 300 µm.

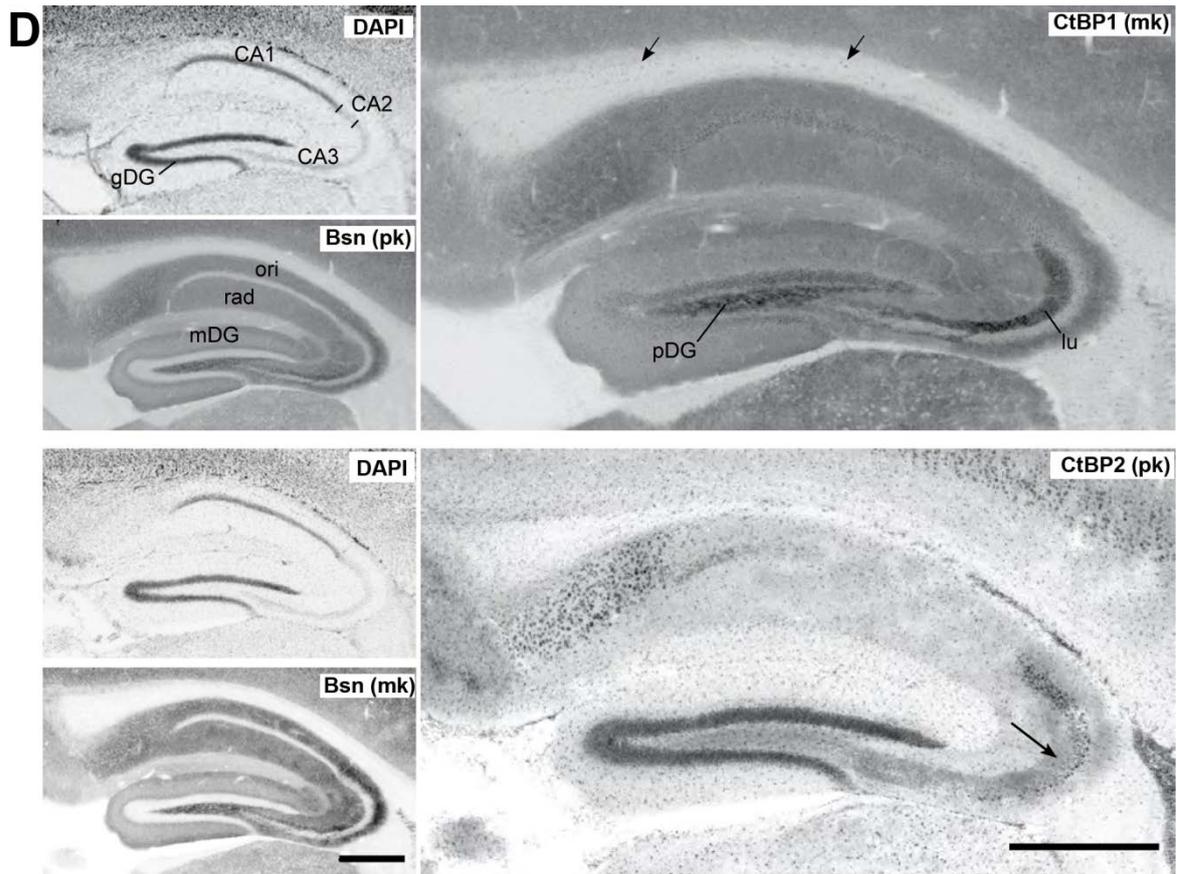


Abbildung 8 D-E: Expression von CtBP1 und CtBP2 im Hippokampus und im cerebralen Cortex. Als Zellkern-Marker wurde DAPI, als Synapsen-Marker ein monoklonaler oder polyklonaler (mk oder pk) Antikörper gegen Bassoon (Bsn) verwendet.

D. Die CtBP1-Immunreaktivität ist in allen Molekularschichten des Hippokampus und der Körnerschicht des *Gyrus dentatus*, der Pyramidenzellschichten der CA1- und schwächer in der CA2- und CA3-Region lokalisiert. Eine CtBP2-Immunreaktivität findet sich in der Körnerschicht des *Gyrus dentatus*, der Pyramidenzellschichten der CA3- und CA2-Region, aber praktisch nicht in der CA1-Region. Zudem konnte auch in den Molekularschichten der CA1-3-Regionen, des *Gyrus dentatus* und im *Stratum lucidum* der CA3-Region eine diffuse CtBP2-Immunreaktivität nachgewiesen werden. Abkürzungen: CA1-3, Ammonshorn-Regionen 1-3; gDG, Körnerschicht; pDG, polymorphe Zellschicht und mDG, Molekularschicht des *Gyrus dentatus*; ori, *Stratum oriens*; rad, *Stratum radiatum*; lu, *Stratum lucidum*.

E. CtBP1/BARS50 ist in allen sechs Kortex-Schichten gleich stark exprimiert. Die CtBP2-Immunreaktivität ist dagegen in der oberen Schicht fünf besonders stark. Aber auch im Neuropil der Schichten eins bis vier findet sich eine diffuse CtBP2-Immunreaktivität. Die Bilder wurden von Dr. Anna Fejtova zur Verfügung gestellt. Die Größenbalken entsprechen in Bild D 600 µm und in Bild E 250 µm.

3.1.4.2 Biochemische Untersuchung der CtBP1/BARS50- und CtBP2-Expression im adulten Maushirn

Nachdem mit Hilfe der immunhistochemischen Untersuchungen an adulten Maushirn-Schnitten gezeigt werden konnte, dass CtBP2 in den verschiedenen Hirnarealen unterschiedlich stark im Neuropil lokalisiert ist, sollten die relativen Expressionslevel von CtBP1/BARS50 und CtBP2 mittels Westernblot-Analysen von Homogenat- und P2-Fraktionen einzelner Hirnareale biochemisch bestätigt werden. Dazu wurden vier adulte Mausgehirne jeweils in acht Hirnregionen, nämlich Bulbus olfactorius, Cortex, Striatum, Hippokampus, Diencephalon, Mittelhirn, Pons mit Medulla oblongata und Cerebellum, unterteilt. Anschließend wurden aus allen Fraktionen jeweils Homogenat und kernfreie Membran-Fraktionen (P2) hergestellt. Sowohl von den Homogenat- als auch von den P2-Fraktionen wurden jeweils gleiche Proteinmengen (10 µg pro Tasche) aufgetragen. Zur Überprüfung der geladenen Proteinkonzentration und der Probenqualität wurden die Westernblots mit einem Antikörper gegen GAPDH gefärbt. Wie in der GAPDH-Ladungskontrolle zu sehen ist, wurde vom Cortex-Homogenat auf allen Westernblots, aufgrund von Problemen beim Solubilisieren der Proteine in SDS-Probenpuffer, jeweils weniger als 10 µg Protein geladen.

Der monoklonale CtBP1/BARS50-Antikörper detektiert sowohl in der Homogenat- als auch in der P2-Fraktion aller acht Hirnareale eine tendenziell gleich starke CtBP1/BARS50-Immunreaktivität bei einem spezifischen MW von ~ 50 kDa (Abbildung 9 A und B).

Auch der polyklonale CtBP1/BARS50-Antikörper zeigt eine ungefähr gleich starke CtBP1-Immunreaktivität in den Homogenat- und P2-Fraktionen der acht Hirnareale (Abbildung 9 C und D). Beachtenswert ist allerdings die leicht höhere CtBP1/BARS50-Immunreaktivität in der P2-Fraktion des Cerebellums (Abbildung 9D). Dieses Ergebnis steht aber in guter Übereinstimmung mit den Daten aus der immunhistochemischen Analyse adulter Maushirn-Schnitte, da auch hier in der Molekularschicht des Kleinhirns eine sehr starke CtBP1/BARS50-Immunreaktivität gezeigt werden konnte (Abschnitt 3.1.4.1).

Die vom CtBP1-L-Antikörper detektierte Immunreaktivität ist in den Homogenat- und P2-Fraktionen der einzelnen Hirnareale unterschiedlich stark (Abbildung 9 E und F). So fällt vor allem die viel geringere CtBP1-L-Immunreaktivität in den Fraktionen des Bulbus olfactorius, des Mittelhirns, der Pons mit Medulla oblongata und des Kleinhirns auf. Wohingegen die Fraktionen des Striatums, des Hippokampus und des Diencephalons die stärkste CtBP1-L-Immunreaktivität zeigen. Wie ein Vergleich mit der GAPDH-Ladungskontrolle zeigt, lassen sich diese Unterschiede in den Immunreaktivitäten zum Teil durch Ladungsunterschiede zwischen den einzelnen Fraktionen erklären. Dies trifft aber nicht für alle Fraktionen im gleichen Maße zu. Zusätzlich zu der erwarteten Bande bei einem MW von ~ 50 kDa detektiert der Antikörper weitere Banden im höheren MW-Bereich.

Der monoklonale und polyklonale CtBP2/RIBEYE-Antikörper detektieren in den Homogenat- und P2-Fractionen der einzelnen Hirnareale jeweils eine Doppelbande mit einem MW von ~ 46 und 49 kDa (Abbildung 9 G-J). Zu beachten ist, dass der geringe Unterschied zwischen den MW beider Banden die Auftrennung dieser mit Hilfe des, beim monoklonalen CtBP2/RIBEYE-Antikörper verwendeten, ECL-Systems schwierig macht. Durch die Verwendung von Fluorophor-gekoppelten sekundären Antikörpern für den polyklonalen CtBP2/RIBEYE-Antikörper können beide Banden dagegen vollständig aufgetrennt werden. Dabei ist die CtBP2-Immunreaktivität beider CtBP2/RIBEYE-Antikörper tendenziell in den Fractionen des Bulbus olfactorius und des Kleinhirns am stärksten. In den anderen Hirnarealen können dagegen nur sehr schwache CtBP2-Immunreaktivitäten detektiert werden.

Die Färbungen der beiden CtBP2/RIBEYE-Antikörper bekräftigen somit die Resultate der immunhistochemischen Studie adulter Maushirn-Schnitte, in der eine starke CtBP2-Immunreaktivität im Neuropil des Cerebellums und des Bulbus olfactorius gezeigt werden konnte.

Zur Überprüfung der Anreicherung synaptischer Proteine in der P2-Fraktion, wurde ein mit Homogenat- und P2-Fractionen beladener Westernblot mit einem Antikörper gegen das synaptische Vesikelprotein Synaptophysin1 gefärbt. Der Vergleich der Synaptophysin1-Immunreaktivität in den Homogenat- und P2-Fractionen zeigt, eine generell höhere Immunreaktivität des Antikörpers in den P2-Fractionen der einzelnen Hirnareale (Abbildung 9 K). Somit kann eine Anreicherung von synaptischen Proteinen in der P2-Fraktion bestätigt werden.

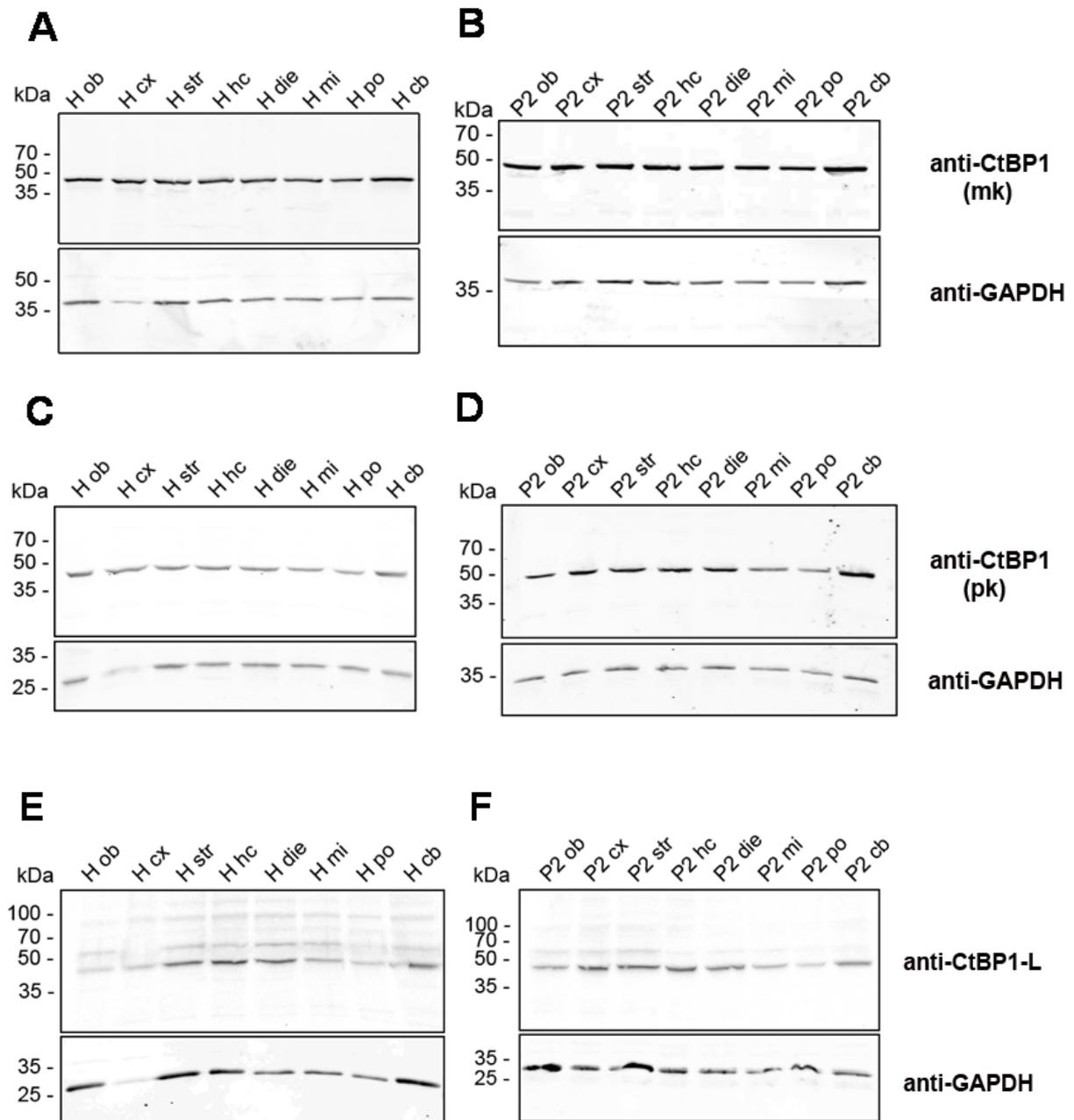


Abbildung 9 A-F: CtBP1/BARS50 ist in allen Hirnarealen tendenziell gleich stark exprimiert.

A, B. Die CtBP1-Immunreaktivität des monoklonalen CtBP1/BARS50-Antikörper ist in den Homogenat- und P2-Fractionen der einzelnen Hirnareale etwa gleich stark.

C, D. Der polyclonale CtBP1/BARS50-Antikörper detektiert ebenfalls in allen Hirnarealen eine ungefähr gleich starke CtBP1-Immunreaktivität. Zu beachten ist allerdings, die tendenziell leicht höhere CtBP1-Immunreaktivität in der P2-Fraktion des Kleinhirns.

E, F. Die vom CtBP1-L-Antikörper detektierte Immunreaktivität ist auf den ersten Blick in den einzelnen Hirnarealen unterschiedlich stark. Im Striatum, Hippokampus und Diencephalon ist sie besonders hoch, dagegen ist sie in den Fraktionen des Bulbus olfactorius, des Mittelhirns, der Pons mit Medulla oblongata und des Kleinhirns eher schwach. Beim Vergleich mit der GAPDH-Ladungskontrolle zeigt sich aber, dass sich diese Unterschiede in den CtBP1-L-Immunreaktivitäten zum Teil durch die Ladungsunterschiede erklären lassen. Abkürzungen: H, Homogenat; P2, kernfreies Membran Pellet; ob, Bulbus olfactorius; cx, Cortex; str, Striatum; hc, Hippokampus; die, Diencephalon; mi, Mittelhirn; po, Pons mit Medulla oblongata, cb, Cerebellum.

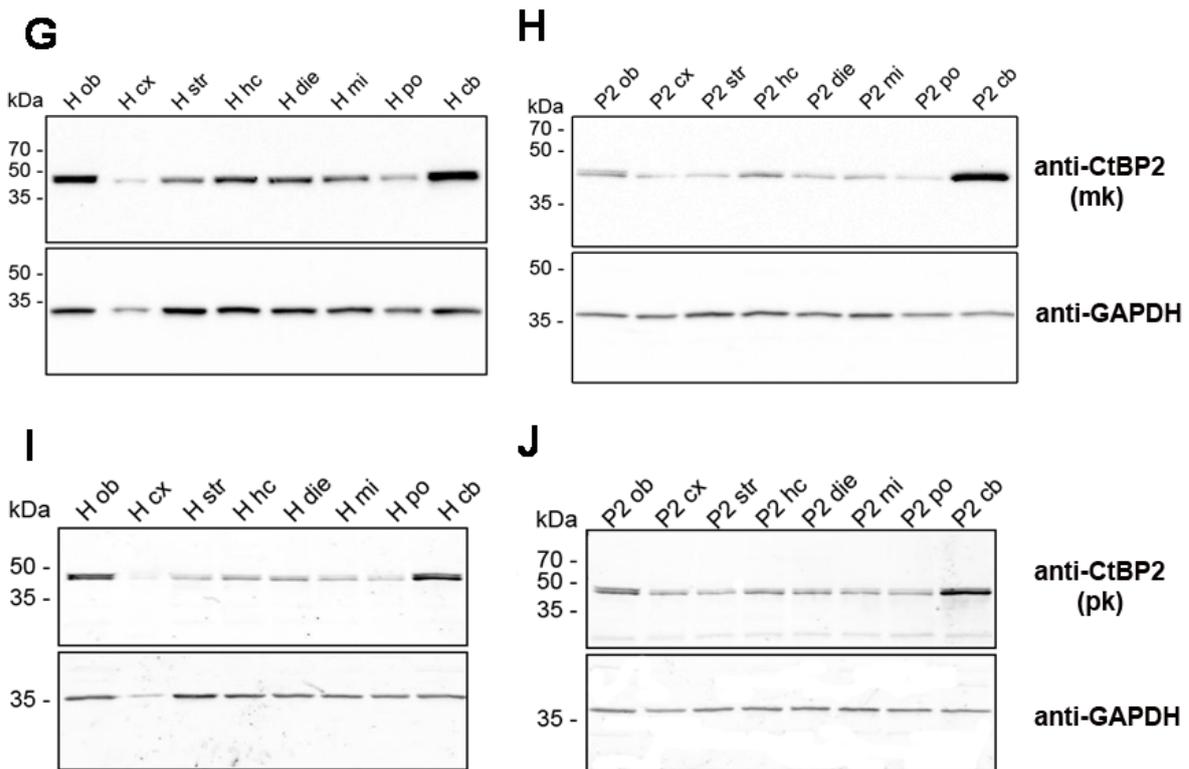


Abbildung 9 G-J: CtBP2 ist in unterschiedlichen Hirnarealen unterschiedlich stark exprimiert.

Die beiden CtBP2/RIBEYE-Antikörper detektieren in allen Fraktionen eine Doppelbande bei einem MW von ~50 kDa, wobei die CtBP2-Immunreaktivitäten in den Fraktionen des Bulbus olfactorius und des Kleinhirns tendenziell am stärksten sind. Als Ladungskontrolle wurde ein Antikörper gegen GAPDH verwendet. Abkürzungen: H, Homogenat; P2, kernfreie Membran Pellets; ob, Bulbus olfactorius; cx, Cortex; str, Striatum; hc, Hippokampus; die, Diencephalon; mi, Mittelhirn; po, Pons mit Medulla oblongata, cb, Cerebellum.

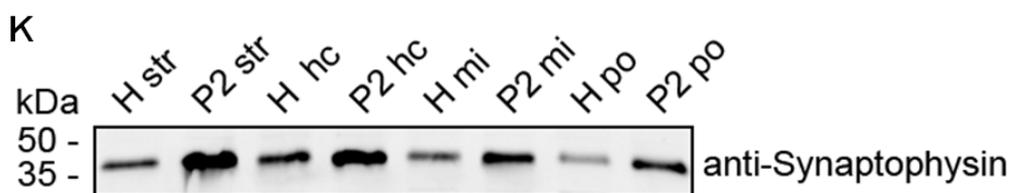


Abbildung 9 K: In den P2-Fraktionen ist Synaptosomen-Material angereichert.

Der Vergleich der Homogenat- und P2-Fraktionen, zeigt eine generell höhere Immunreaktivität des Antikörpers gegen das synaptische Vesikelprotein Synaptophysin1 in den P2-Fraktionen der einzelnen Hirnareale.

Abkürzungen: H, Homogenat; P2, kernfreie Membran Pellets; str, Striatum; hc, Hippokampus; mi, Mittelhirn; po, Pons mit Medulla oblongata.

3.1.4.3 Untersuchung der CtBP1/BARS50- und CtBP2-Expression in inhibitorischen und exzitatorischen Neuronen

Bei immunocytochemischen Färbungen von primären hippocampalen Neuronenkulturen mit CtBP1/BARS50- und CtBP2/RIBEYE-Antikörpern ist aufgefallen, dass die CtBP1/BARS50- und CtBP2-Immunreaktivitäten in den Zellkernen verschiedener Hippokampus-Zelltypen unterschiedlich stark sind. Um zu überprüfen, ob die Zelltyp-Spezifität für die unterschiedlichen nukleären Expressionslevel beider Proteine verantwortlich ist, wurden hippocampale Primärkulturneuronen nach 14 Tagen in Kultur (*days in vitro, div*), mit einem CtBP1/BARS50- und CtBP2/RIBEYE-Antikörper gefärbt und die nukleäre Immunreaktivität beider Antikörper quantitativ analysiert. Um zwischen inhibitorischen und exzitatorischen Neuronen unterscheiden zu können, wurde der inhibitorische Neuronenmarker GAD65 verwendet, welcher etwa 25% aller Zellen in den verwendeten Kulturen färbte. Als Zellkern-Marker wurde DAPI verwendet.

Es zeigte sich, dass die CtBP2-Immunreaktivität in den Zellkernen inhibitorischer Neurone fast um die Hälfte schwächer ist als die CtBP2-Immunreaktivität in Zellkernen exzitatorischer Neurone (Abbildung 10). Im Gegensatz dazu ist das Immun-Signal des polyklonalen CtBP1/BARS50-Antikörpers in den Zellkernen inhibitorischer Neurone leicht höher als in Zellkernen exzitatorischer Neurone (Abbildung 10).

Zudem ist die Immunreaktivität des CtBP2/RIBEYE-Antikörpers im Vergleich zu der Signal-Intensität des CtBP1/BARS50-Antikörpers viel geringer (Abbildung 10 B), was durch eine geringere Affinität des CtBP2/RIBEYE-Antikörpers mit seinem Immunogen erklärt werden kann.

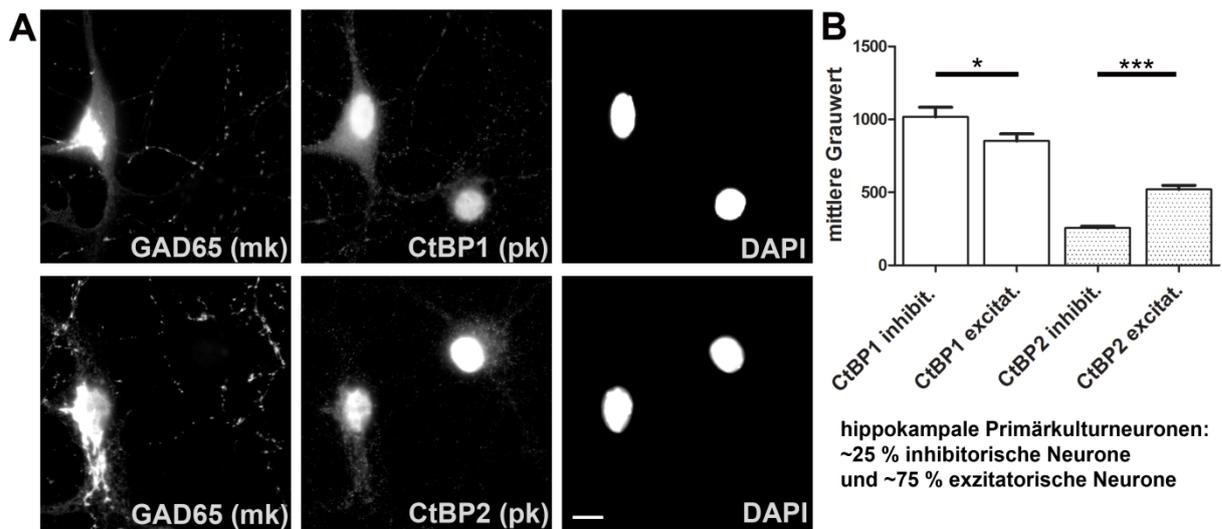


Abbildung 10: CtBP1/BARS50 und CtBP2 sind in den Zellkernen exzitatorischer und inhibitorischer Neurone unterschiedlich stark lokalisiert.

Gezeigt sind Immunfluoreszenzfärbungen von div 14, Formaldehyd fixierten hippocampalen Neuronenkulturen aus Ratte.

A. Der inhibitorische Neuronen-Marker GAD65 färbt sowohl den Golgi-Apparat als auch die Synapsen inhibitorischer Neurone. Der polyklonale CtBP1/BARS50-Antikörper zeigt in inhibitorischen und exzitatorischen Neuronen eine Färbung des Zellkerns, des Cytosols und der Neuriten. Dabei ist die CtBP1/BARS50-Immunreaktivität im Zellkern inhibitorischer Neurone tendenziell stärker als die im Zellkern exzitatorischer Neurone. Der polyklonale CtBP2/RIBEYE-Antikörper detektiert in beiden Neuronen-Typen ein Signal ebenfalls im Zellkern, im Cytosol und den Zellfortsätzen. Im Zellkern des exzitatorischen Neurons detektiert der CtBP2-Antikörper, im Vergleich zum inhibitorischen Neuron, die stärkere Immunreaktivität. Als Zellkern-Marker wurde DAPI verwendet.

B. Die Quantifizierung der mittleren Grau-Werte des CtBP1/BARS50- und CtBP2/RIBEYE-Antikörper-Signals in den Zellkernen inhibitorischer und exzitatorischer Neurone wurde von jeweils 40 Neuronen aus zwei unabhängigen Experimenten vorgenommen. Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten \pm SEM der mittleren Grauwerte (CtBP1 pc, *, p-Wert 0,0486; CtBP2 pc, ***, p-Wert 0,0001, unverbundener T-Test). Der Größenbalken in Abbildung 10A entspricht 10 μ m.

3.1.5 Biochemische Untersuchung des subzellulären Lokalisationsmusters bekannter CtBP1/BARS50- und CtBP2-Isoformen im adulten Maushirn

3.1.5.1 Quantitative biochemische Untersuchung des Verteilungsmusters bekannter CtBP1/BARS50- und CtBP2/RIBEYE-Isoformen in Zellkernen und Synaptosomen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass CtBP2 neben einer Zellkern-ständigen Lokalisation auch an konventionellen chemischen Synapsen lokalisiert ist, sollte quantitativ überprüft werden, wie die CtBP1/BARS50- und CtBP2-Isoformen in Zellkernen und Synaptosomen verteilt sind. Dazu wurden Westernblot-Analysen von Homogenat-, gereinigten Zellkern- und Synaptosomen-Fractionen durchgeführt und die relative Anreicherung beider Proteine in der Zellkern- und Synaptosomen-Fraktion gegen die Homogenat-Fraktion als Kontrollwert gemessen. Aus jeweils drei adulten Maushirnen wurde entweder die Synaptosomen- (1, 2, 3) oder die Zellkern-Fraktion (a, b, c) präpariert. Von Synaptosomen, Zellkernen und Homogenat wurden jeweils gleiche Proteilmengen geladen (10µg pro Tasche) und jede Probe dreimal aufgetragen.

Der monoklonale und polyklonale CtBP1/BARS50- als auch der CtBP1-L-Antikörper detektieren, im Vergleich zur Zellkern-Fraktion, eine deutlich stärkere CtBP1-Immunreaktivität in der Synaptosomen-Fraktion (Abbildung 11 A, C, E). In der Zellkern-Fraktion detektiert der CtBP1-L-Antikörper, im Gegensatz zu den zwei kommerziell erhältlichen CtBP1/BARS50-Antikörpern, zwei Banden. Eine sehr schwache Bande bei ~50 kDa und eine etwas stärkere Bande bei ~40 kDa. Für die quantitative Analyse wurde die Bande bei ~40 kDa verwendet.

Auch die quantitative Analyse der Banden-Intensitäten aller drei CtBP1/BARS50-Antikörper bestätigt die eindeutige Anreicherung von CtBP1/BARS50 in der Synaptosomen-Fraktion (Abbildung 11 B, D, F).

Die zwei CtBP2/RIBEYE-Antikörper detektieren in allen drei Fraktionen eine Doppelbande bei einem MW von ~46 und 49 kDa (Abbildung 11 G, I). Es ist anzunehmen, dass es sich bei den beiden Banden um die beiden CtBP2/RIBEYE-Isoformen, CtBP2 und CtBP2-S, handelt (Verger et al., 2006). Aufgrund der geringen Unterschiede des Molekulargewichts der CtBP2- (48,9 kDa) und CtBP2-S- (46, 2 kDa) Isoformen ist die Auflösung beider Banden (Isoformen) mit Hilfe des, für den monoklonalen CtBP2/RIBEYE-Antikörper, verwendeten ECL-Systems auch hier schwierig. Durch die Verwendung eines Fluorophor-gekoppelten sekundären Antikörpers für den polyklonalen CtBP2/RIBEYE-Antikörper kann aber gezeigt werden, dass die einzelnen Banden dieser Doppelbande in der Synaptosomen- und Zellkern-Fraktion unterschiedlich stark lokalisiert sind (Abbildung 11 I). In der Synaptosomen-Fraktion ist die

untere Bande stärker lokalisiert und die obere Bande ist kaum vorhanden. In der Zellkern-Fraktion sind beide Banden sichtbar, hier ist allerdings die obere Bande stärker angereichert. Die quantitativen Analysen der Banden-Intensität der von den beiden CtBP2/RIBEYE-Antikörpern detektierten Doppelbande in allen drei Fraktionen (Abbildung 11 H, J) ergaben, dass CtBP2 prinzipiell stärker in der Zellkern-Fraktion angereichert wird, dass zudem aber auch in der Synaptosomen-Fraktion eine Anreicherung von CtBP2, höchstwahrscheinlich CtBP2-S, stattfindet.

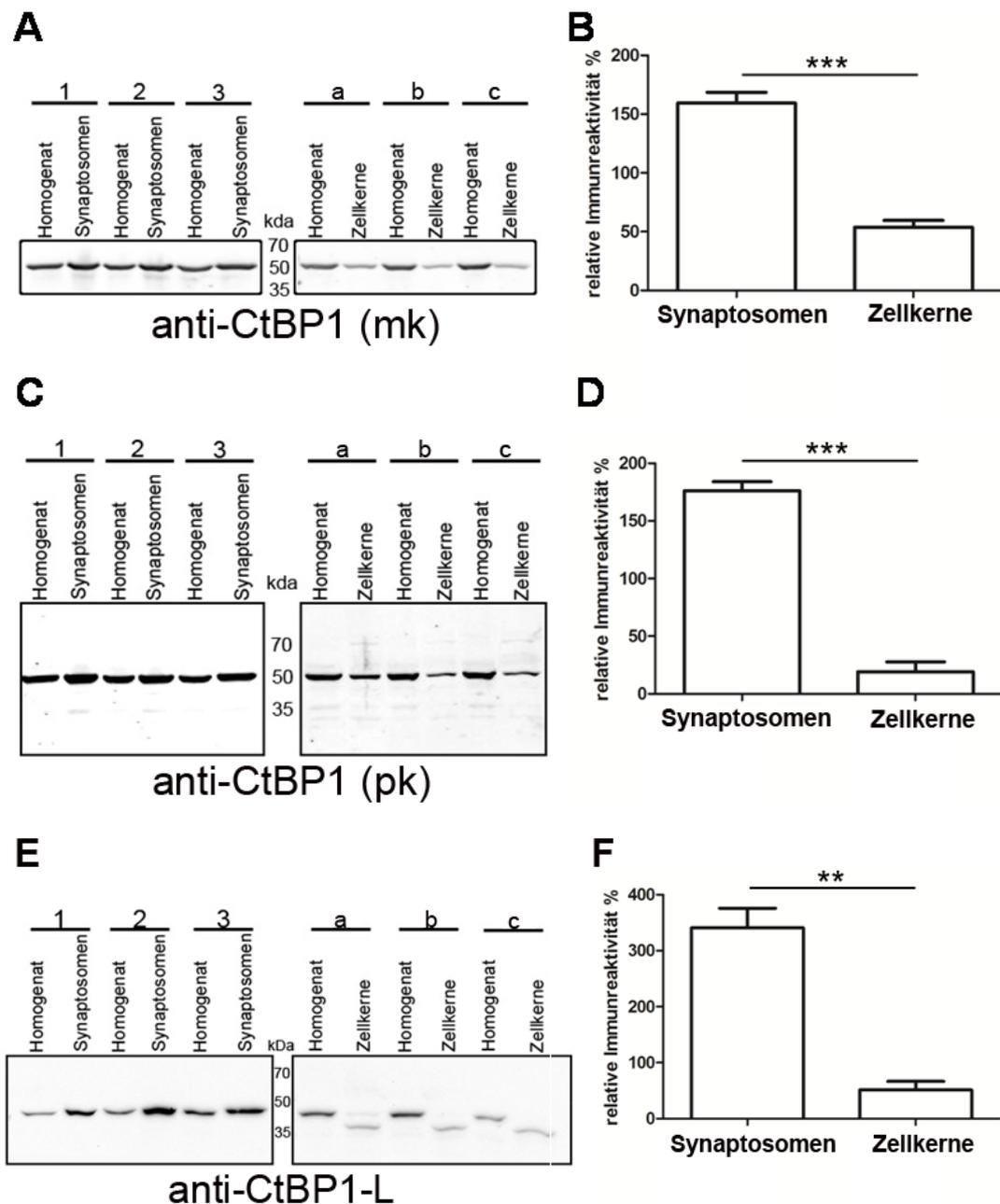


Abbildung 11 A-F: CtBP1/BARS50 reichert sich verstärkt in der Synaptosomen-Fraktion an. Von Synaptosomen (1, 2, 3), Zellkernen (a, b, c) und Homogenat wurden jeweils die gleichen Proteinmengen geladen (10µg pro Tasche) und jede Probe dreimal aufgetragen.

A, C, E. Alle drei CtBP1/BARS50-Antikörper detektieren in allen drei Fraktionen eine spezifische Bande bei einem MW von ~50 kDa, wobei alle drei Antikörper die stärkste CtBP1-Immunreaktivität in der Synaptosomen-Fraktion zeigen. Unerwartet ist, die vom CtBP1-L-Antikörper in der Zellkern-Fraktion detektierte zweite Bande bei einem MW von ~40 kDa. Diese Bande ist zudem noch stärker exprimiert als die erwartete Bande bei 50 kDa und wurde deshalb auch für die quantitative Analyse verwendet.

B, D, F. Quantitative Analyse der Banden-Intensitäten der drei CtBP1/BARS50-Antikörper in der Synaptosomen- und Zellkern-Fraktion. Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten \pm SEM der Banden-Intensitäten von drei Maushirnen, die gegen die Kontroll-Werte des Homogenates normalisiert wurden (mkCtBP1, ***, p-Wert: 0,0006; pkCtBP1, ***, p-Wert: 0,0002; CtBP1-L N-Term, **, p-Wert: 0,0017; unverbundener T-Test).

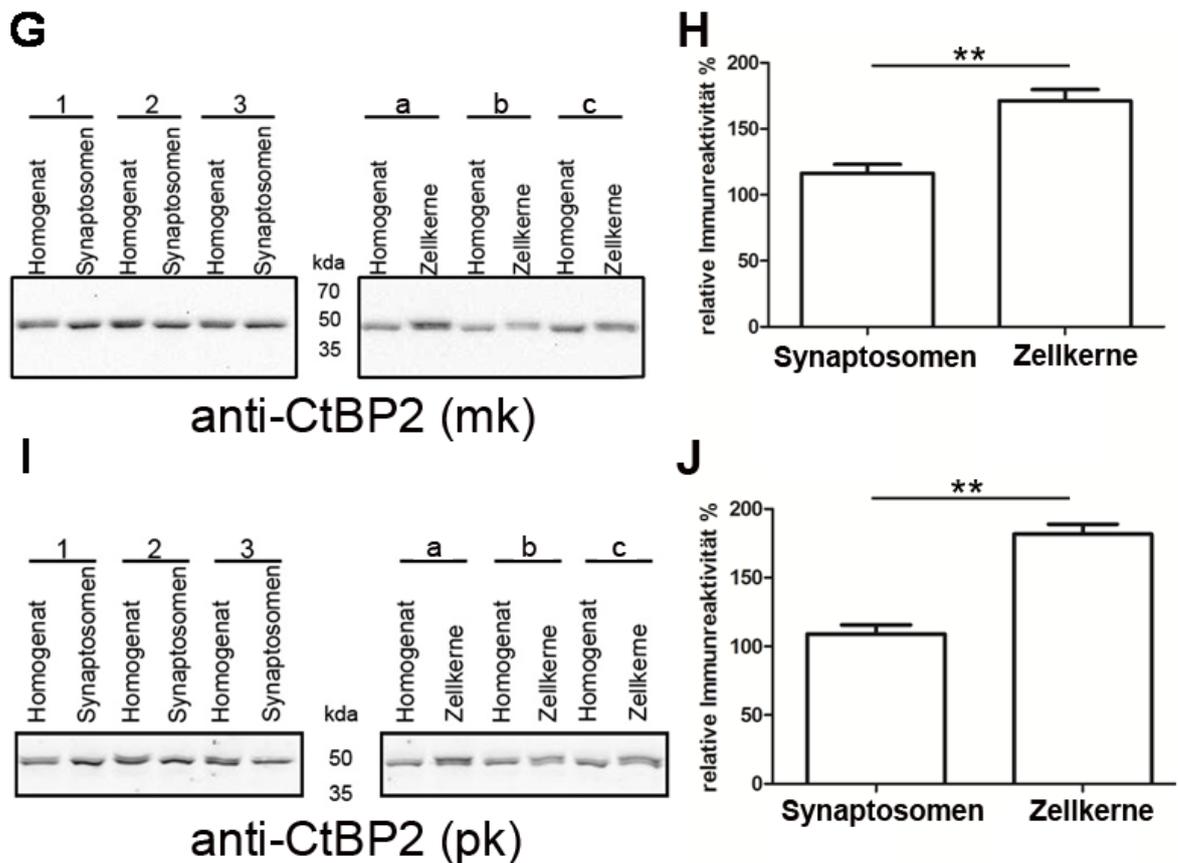


Abbildung 11 G-J: CtBP2/RIBEYE reichert sich stärker in der Zellkern-Fraktion, als in der Synaptosomen-Fraktion, an.

Von Synaptosomen, Zellkernen und Homogenat wurde jeweils die gleiche Proteinmenge geladen (10µg pro Tasche) und alle Proben wurden dreimal geladen.

G, I. Beide CtBP2/RIBEYE-Antikörper detektieren in allen drei Fraktionen eine Doppelbande bei einem MW von ~50 kDa. Die einzelnen Banden, dieser Doppelbande, werden in der Synaptosomen- und Zellkern-Fraktion unterschiedlich stark angereichert. In der Synaptosomen-Fraktion ist die Bande mit einem niedrigeren MW stärker lokalisiert, in der Zellkern-Fraktion ist es die Bande mit einem etwas höheren MW.

H, J. Quantitative Analyse der Bandintensitäten der Doppelbande die von den beiden CtBP2/RIBEYE-Antikörper in der Synaptosomen- und Zellkern-Fraktion detektiert wurde. Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten ± SEM der Banden-Intensitäten von drei Maushirnen, die gegen die Kontroll-Werte des Homogenates normalisiert wurden (mkCtBP2, **, p-Wert: 0,0072; pkCtBP2, **, p-Wert: 0,0016; unverbundener T-Test).

3.1.5.2 Quantitative biochemische Untersuchung der Synaptosomen- und Zellkern-Verteilung von CtBP2 in Cerebellum und Cortex

In Abschnitt 3.1.4.2 wurde gezeigt, dass CtBP2 in den P2-Fractionen verschiedener Hirnareale unterschiedlich stark lokalisiert ist. So ist die CtBP2-Immunreaktivität in der P2-Fraktion des Kleinhirns stark, in der P2-Fraktion des Cortexes dagegen eher schwach. Um zu überprüfen, ob die starke synaptische Lokalisation von CtBP2 im Kleinhirn-Cortex auf eine spezifische synaptische Sortierung von CtBP2 innerhalb dieser Hirnregion zurückzuführen ist, sollte hier die relative Anreicherung von CtBP2 in der Synaptosomen- und Zellkern-Fraktion in beiden Hirnarealen mittels quantitativer Westernblot-Analysen überprüft werden. Aufgrund des geringen Nass-Gewichts beider Hirnareale wurden die Cortices und Kleinhirne von je drei adulten Maushirnen vereinigt, jeweils die Synaptosomen- oder Zellkern-Fraktion präpariert und anschließend von jeder Probe dreimal die gleiche Proteinmenge geladen (10µg pro Tasche).

Die relative Anreicherung von CtBP2 in der Zellkern- und Synaptosomen-Fraktion entspricht sowohl im Cortex-Gewebe als auch im Cerebellum-Gewebe der des gesamten Gehirns und ist in beiden Fraktionen vergleichbar (Abbildung 12 A, C, E, G). In beiden Hirnarealen detektieren die beiden CtBP2/RIBEYE-Antikörper in allen drei Fraktionen jeweils eine Doppelbande, wobei die Einzel-Banden in der Synaptosomen- und Zellkern-Fraktion unterschiedlich stark exprimiert werden. Wie auch schon in Abschnitt 3.1.5.1 gezeigt, wird in der Synaptosomen-Fraktion die Bande mit dem geringeren MW, CtBP2-S, stärker angereichert und die Bande mit dem höheren MW ist kaum sichtbar. In der Zellkern-Fraktion sind beide Banden lokalisiert allerdings ist hier die Bande mit dem höheren MW, CtBP2, die Stärkere von beiden.

Auch die quantitativen Analysen der Doppelbanden-Intensität in den einzelnen Fraktionen entsprachen der des gesamten Gehirns und waren in beiden Fraktionen vergleichbar (Abbildung 12 B, D, F, H).

Somit ist die Zellkern-Synaptosomen-Verteilung von CtBP2 in beiden Hirnarealen miteinander vergleichbar und es ist davon auszugehen, dass die geringere CtBP2-Immunreaktivität im Neuropil des Cortexes auf eine geringere CtBP2-Expression in diesem Hirnareal zurückzuführen ist und nicht durch fehlenden synaptischen Transport in dieser Hirnregion erklärt werden kann.

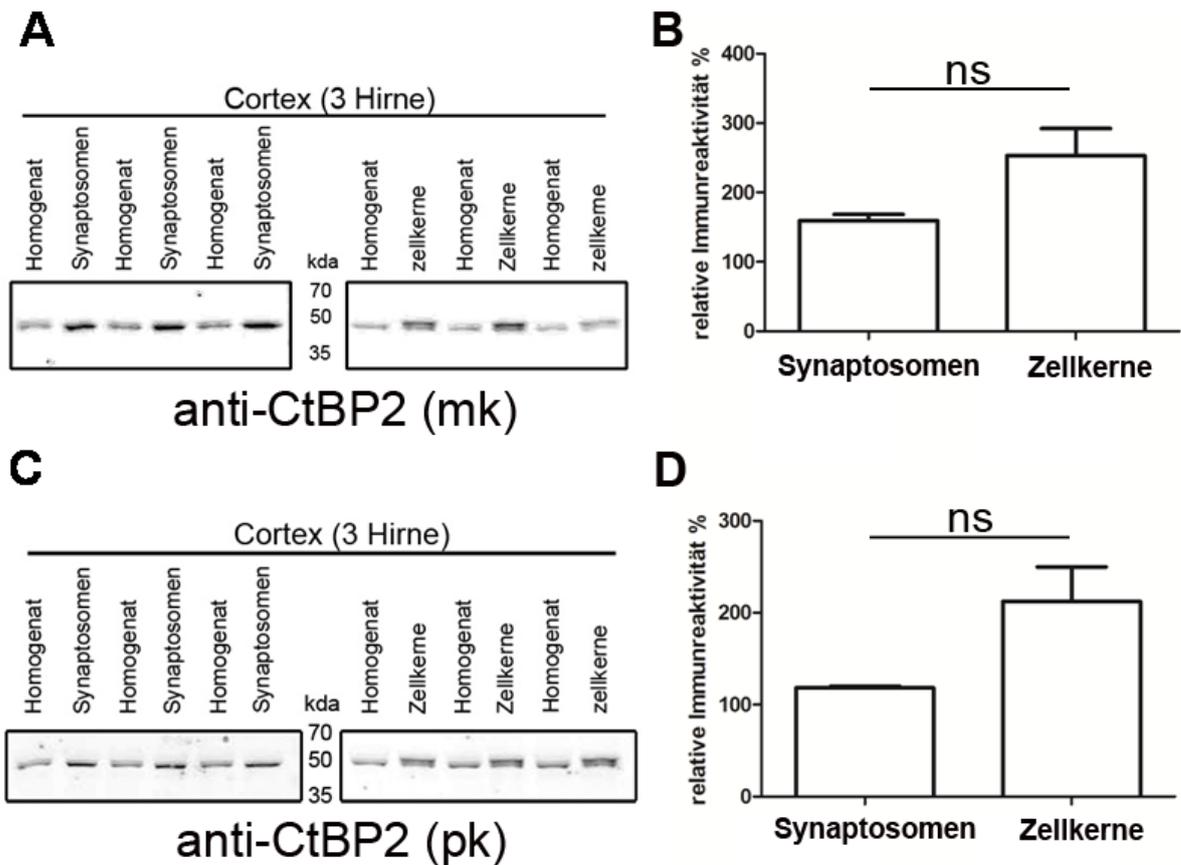


Abbildung 12 A-D: Die CtBP2-Verteilung in der Zellkern- und Synaptosomen-Fraktion des Cortex-Gewebes entspricht der des gesamten Gehirns.

A, C. Aus drei adulten Maushirnen wurden die Cortices vereinigt und die Synaptosomen- oder Zellkern-Fraktion präpariert. Von Synaptosomen, Zellkernen und Homogenat wurde jeweils die gleiche Proteinmenge geladen (10µg pro Tasche). Beide Antikörper detektieren in allen drei Fraktionen eine Doppelbande, deren Einzelbanden in der Synaptosomen- und Zellkern-Fraktion unterschiedlich exprimiert sind. Prinzipiell ist aber die CtBP2-Immunreaktivität in der Zellkern-Fraktion höher als in der Synaptosomen-Fraktion. Allgemein ist die Expressionsrate von CtBP2 im Cortex-Gewebe gering.

B, D. Quantitative Analyse der Banden-Intensitäten der, von den CtBP2/RIBEYE-Antikörpern detektierten, Doppelbande in der Synaptosomen- und Zellkern-Fraktion aus Cortex-Gewebe. Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten \pm SEM der Banden-Intensitäten von gesammeltem Cortex-Gewebe aus drei Maushirnen, die gegen die Kontroll-Werte des Homogenates normalisiert wurden (mkCtBP2, ns, p-Wert: 0,0800; pkCtBP2, ns, p-Wert: 0,0670; unverbundener T-Test).

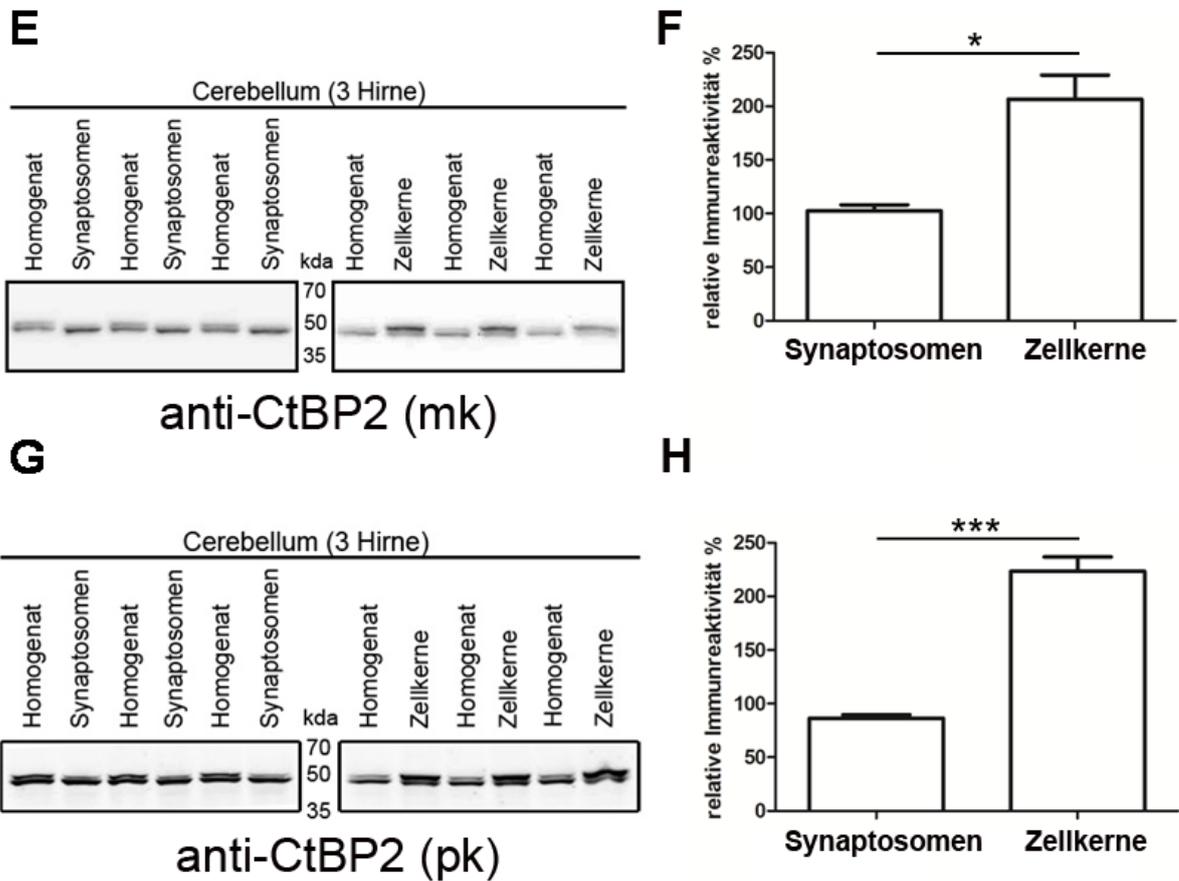


Abbildung 12 E-H: Die CtBP2-Verteilung in der Zellkern- und Synaptosomen-Fraktion ist mit der Verteilung im Cortex vergleichbar.

E, G. Aus drei adulten Maushirnen wurden die Kleinhirne vereinigt und die Synaptosomen- oder Zellkern-Fraktion präpariert. Von Synaptosomen, Zellkernen und Homogenat wurde jeweils die gleiche Proteinmenge geladen (10µg pro Tasche). Die Zellkern-Synaptosomen-Verteilung entspricht der des gesamten Gehirns und ist mit der Verteilung im Cortex vergleichbar. Prinzipiell ist CtBP2 stärker in der Zellkern-Fraktion angereichert. Allgemein ist die Expressionsrate von CtBP2 im Cerebellum-Gewebe höher als im Cortex-Gewebe.

F, H. Quantitative Analyse der Banden-Intensitäten der von den CtBP2/RIBEYE-Antikörpern detektierten Doppelbanden in Synaptosomen und Zellkern-Fraktion aus Cerebellum-Gewebe. Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten \pm SEM der Banden-Intensitäten von gesammeltem Cerebellum-Gewebe aus drei Maushirnen, die gegen die Kontroll-Werte des Homogenates normalisiert wurden (mkCtBP2, *, p-Wert: 0,0110; pkCtBP2, ***, p-Wert: 0,0006; unverbundener T-Test).

3.1.6. Ultrastrukturelle und mikroskopische Untersuchungen der subzellulären Lokalisationsmuster bekannter CtBP1/BARS50- und CtBP2-Isoformen

3.1.6.1 Ultrastrukturelle Untersuchung der synaptischen CtBP1/BARS50- und CtBP2-Lokalisation in der Molekularschicht des Kleinhirn-Cortexes

Zur Überprüfung der synaptischen Lokalisation von CtBP1/BARS50 und CtBP2 wurden immun-elektronenmikroskopische Aufnahmen der Molekularschicht des Kleinhirn-Cortexes gemacht. Für die Immunfärbungen wurden der monoklonale CtBP1/BARS50- und der polyklonale CtBP2/RIBEYE-Antikörper verwendet (Abbildung 13). Dies geschah in Zusammenarbeit mit Dr. Karin Richter und die Bilder wurden von Ihr freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die dunklen Peroxidase-Produkte des CtBP1/BARS50- (Abbildung 13 A - E) und des CtBP2/RIBEYE- (Abbildung 13 F - I) Antikörpers sind in, über die gesamte Molekularschicht des Kleinhirn-Cortexes verteilten, Neuronenpopulationen zu finden. Dabei färben beide Antikörper die Präsynapse, wohingegen in der Postsynapse keine Immunreaktivität detektierbar ist. Innerhalb der Präsynapse ist die Immunreaktivität beider Antikörper in der Nähe des synaptischen Spalts am stärksten. Der Großteil der von beiden Antikörpern gefärbten Synapsen sind asymmetrische Synapsen (Abbildung 13 A, C-H). Zudem findet sich die CtBP1/BARS50- und vor allem die CtBP2-Immunreaktivität auch in den Parallelfaser-Axononen der Körnerzellen. Zudem kann auch in den Präsynapsen symmetrischen Synapsen eine CtBP1/BARS50- und CtBP2-Immunreaktivität an der CAZ detektiert werden (Abbildung 13 B, I).

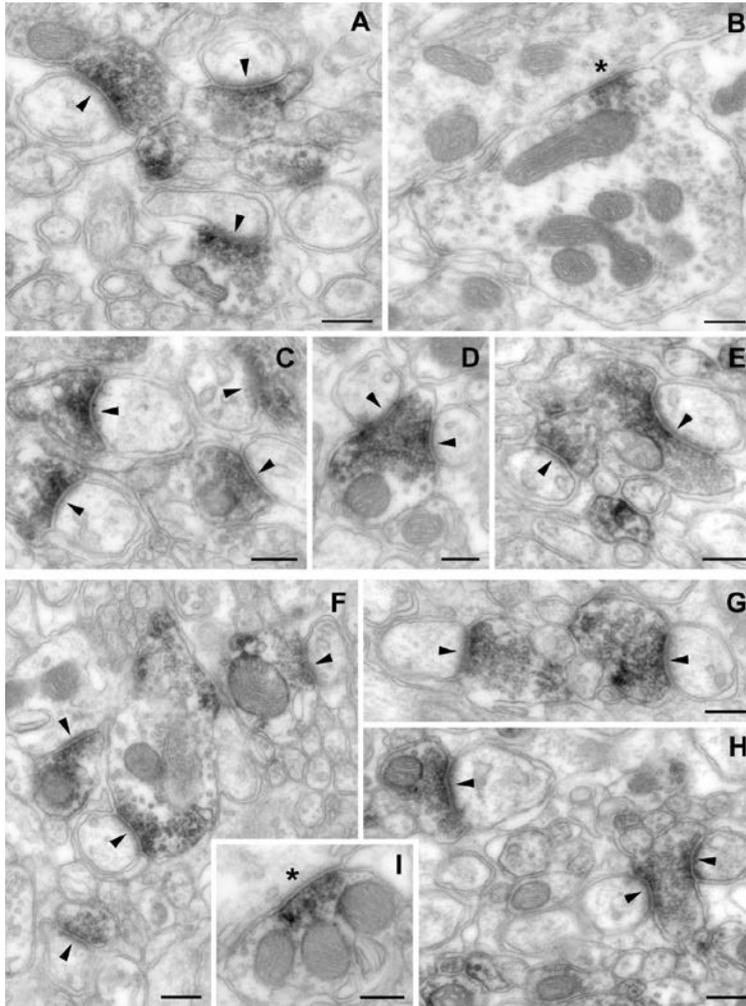


Abbildung 13: CtBP1/BARS50- und CtBP2-Lokalisation innerhalb der Molekularschicht des Kleinhirn-Cortexes.

Die immun-elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen eine CtBP1/BARS50- (A - E) und eine CtBP2- (F - I) Immunreaktivität in den Präsynapsen verschiedener Neuronenpopulationen innerhalb der Molekularschicht des Kleinhirn-Cortexes.

A, C. CtBP1/BARS50 gefärbte axonale Varikositäten (vorrassichtlich von Parallelfasern) kontaktieren ungefärbte postsynaptische Elemente (wahrscheinlich Dornen der Purkinje-Zellen).

B. Symmetrische Synapse zwischen einem CtBP1/BARS50 gefärbten präsynaptischen Element (wahrscheinlich einem Axon der Korbzellen) und dem Zellkörper einer Purkinje-Zelle. Dabei konzentriert sich das dunkle Peroxidase-Produkt des CtBP1/BARS50-Antikörpers in der Nähe des synaptischen Spalts.

D, E. Axonale Varikositäten kontaktieren dendritischen Dornenfortsätze und bilden mit Ihnen synaptische Kontakte aus. In Abbildung D ko-lokalisiert das Peroxidase-Produkt zudem mit den präsynaptischen Vesikeln.

E. Die CtBP1/BARS50-Immunreaktivität ist in der Region der aktiven Zone am stärksten. Trotzdem findet sich auch innerhalb der Axone eine starke CtBP1/BARS50-Immunreaktivität.

F-H. Die CtBP2-Immunreaktivität findet sich in den asymmetrischen Synapsen, wobei die Konzentration des dunklen Peroxidase-Produkts zur aktiven Zone hin zunimmt. Dagegen ist in Postsynaptischen Elementen keine CtBP2-Immunreaktivität detektierbar. In Abbildung H ist zudem eine Färbung innerhalb der Axone sichtbar.

I. Die CtBP2-gefärbte Präsynapse einer Korbzelle bildet mit dem Zellkörper einer Purkinje-Zelle einen symmetrischen synaptischen Kontakt aus. * markiert die Postsynapse symmetrische Synapse, ◄ markiert die Postsynapse asymmetrische Synapsen. Die Abbildungen wurden freundlicherweise von Dr. Karin Richter zur Verfügung gestellt. Die Größenbalken entsprechen in allen Bildern 250 nm.

3.1.6.2 Mikroskopische Untersuchung der CtBP1/BARS50-Verteilung in hippokampalen Primärkulturneuronen

Zur weiteren Untersuchung der CtBP1/BARS50-Lokalisation wurden hippokampale Primärkulturneuronen nach 14 Tagen in Kultur mit Formaldehyd fixiert und mit dem monoklonalen GM130-Antikörper, welcher das *cis*-Golgi-Netzwerk und dendritisches Golgi-Material (*Golgi Outposts*) (Horton and Ehlers, 2003) färbt, einem polyklonalen Antikörper gegen Bassoon sowie dem monoklonalen CtBP1/BARS50-Antikörper immunocytochemisch untersucht. Der CtBP1/BARS50-Antikörper zeigt neben einer starken Zellkern-Färbung eine punktförmige Färbung entlang den Neuriten, welche zu großen Teilen mit der synaptischen Färbung des Bassoon-Antikörpers (Abbildung 14) und/oder mit der Färbung des GM130-Antikörpers ko-lokalisiert. Dies bestätigt die bereits gezeigte synaptische Lokalisation von CtBP1/BARS50 (tom Dieck et al. 2005). Da bis jetzt noch kein Golgi-Material an Synapsen gezeigt wurde (Pierce et al., 2001, Horton and Ehlers, 2003), ist die Ko-Lokalisation der Färbung des GM130-Antikörpers mit der Bassoon-Immunreaktivität in vielen vesikel-förmigen Strukturen entlang der Zellfortsätze allerdings unerwartet.

Im Cytosol des Neurons färbt der CtBP1/BARS50-Antikörper diffus viele vesikel-förmige Strukturen. Ob es sich dabei um Golgi-assoziiertes CtBP1/BARS50 handelt ist unklar, da aufgrund der Auflösungsgrenzen der verwendeten Lichtmikroskopie-Technik keine Aussage über eine mögliche Ko-Lokalisation der CtBP1/BARS50-Färbung mit der GM130-Immunreaktivität am *cis*-Golgi-Apparat möglich ist.

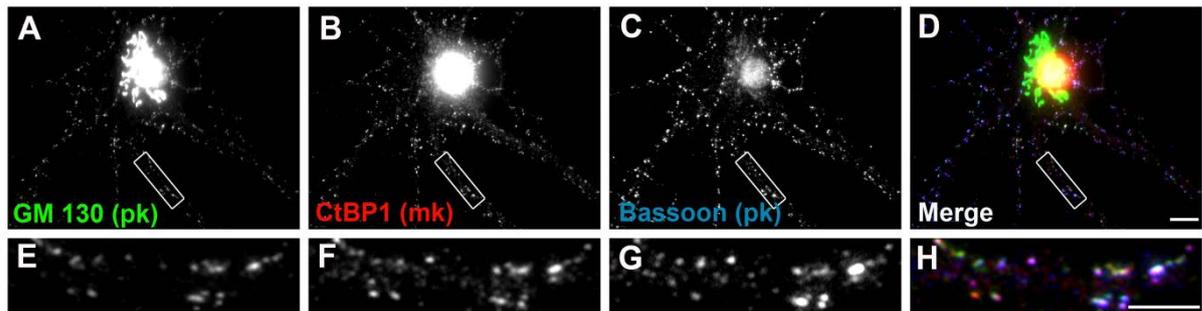


Abbildung 14: Lokalisation von CtBP1/BARS50 in hippocampalen Primärkulturneuronen

Gezeigt sind Immunfärbungen von *div 14* Neuronen.

A, E. Der GM130-Antikörper (grün) zeigt eine Färbung des *cis*-Golgi-Apparates und der *Golgi outposts* in Dendriten. Dabei ko-lokalisieren die punktförmigen Färbungen in den Dendriten zu großen Teilen mit der Färbung des CtBP1/BARS50-Antikörpers und der Färbung des Antikörpers gegen Bassoon.

B, F. Der monoklonale CtBP1/BARS50-Antikörper (rot) zeigt eine starke Färbung des Zellkerns, eine diffuse Färbung des Cytosols und punktförmige Färbungen entlang den Neuriten, die mit der Färbung des GM130-Antikörpers und des Bassoon-Antikörpers stark ko-lokalisiert.

C, G. Der Antikörper gegen Bassoon (blau) zeigt eine punktförmige synaptische Färbung entlang der Dendriten.

D, H. Gezeigt ist die Überlagerung der Immunreaktivitäten der drei verwendeten Antikörper.

Der Größenbalken entspricht in den Übersichtsbildern 10 μm , in den Ausschnitten 5 μm .

3.1.6.3. Mikroskopische Untersuchung der CtBP2-Lokalisation in hippokampalen Primärkulturneuronen

Die Immunfärbungen wurden mit dem monoklonalen GM130-Antikörper, einem polyklonalen Antikörper gegen Bassoon und dem monoklonalen CtBP2/RIBEYE-Antikörper an div 14 hippokampalen Primärkulturneuronen vorgenommen.

Der CtBP2/RIBEYE-Antikörper färbt stark den Zellkern und entlang der Zellfortsätze viele vesikel-förmige Strukturen (Abbildung 15 B, J). Ein Großteil dieser Strukturen innerhalb der Zellfortsätze ko-lokalisiert mit dem von Bassoon-Antikörper detektierten synaptischen Punkten (Abbildung 15 K). Somit kann die in den biochemischen Untersuchungen gezeigte synaptische Lokalisation von CtBP2 auch immuncytochemisch bestätigt werden. Neben der Ko-Lokalisation der CtBP2-Immunreaktivität mit der Bassoon-Immunreaktivität, ist in einigen vesikulären Spots innerhalb der Zellfortsätze auch eine Ko-Lokalisation der Immunreaktivitäten des CtBP2/RIBEYE- und Bassoon-Antikörpers mit der GM130-Immunreaktivität sichtbar (Abbildung 15 I).

Im Soma detektiert der CtBP2/RIBEYE-Antikörper genau wie in den Neuriten viele punktförmige Strukturen, die zum Teil mit den Immunreaktivitäten des GM130- und/oder Bassoon-Antikörpers ko-lokalisieren (Abbildung 15 B, F). Bei den Spots in denen die Immunreaktivitäten aller drei verwendeten Antikörper miteinander ko-lokalisieren, handelt es sich wahrscheinlich nicht um Bestandteile des *cis*-Golgi-Netzwerkes, da bis jetzt für Bassoon keine Lokalisation am *cis*-Golgi-Netzwerk gezeigt wurden ist (Dresbach et al., 2006). Bei den vesikulären Punkten im Cytosol die nur von den Antikörpern gegen CtBP2/RIBEYE und GM130 gefärbt werden (Abbildung 15 E und F), ist aufgrund der verwendeten Lichtmikroskopie-Technik keine Aussage über eine Ko-Lokalisation mit der GM130-Immunreaktivität möglich.

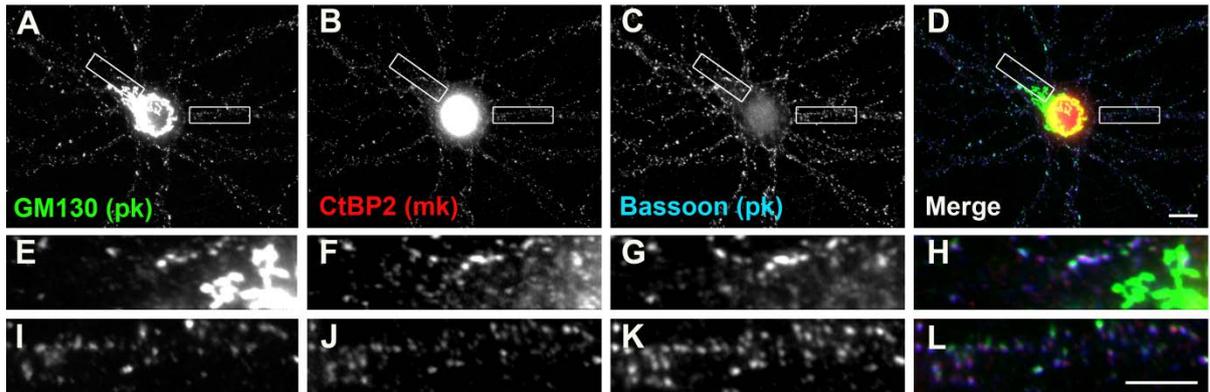


Abbildung 15: CtBP2 ist in Neuronen zum Teil synaptisch lokalisiert

Gezeigt sind Immunfärbungen von *div 14* Neuronen.

A, E, I. Der GM130-Antikörper (grün) zeigt eine Färbung des *cis*-Golgi-Apparates und der *Golgi Outposts* in Dendriten. Dabei ko-lokalisieren die punktförmigen Färbungen in den Dendriten zu großen Teilen mit der Färbung des CtBP2/RIBEYE-Antikörpers und der Färbung des Antikörpers gegen Bassoon.

B, F, J. Der monoklonale CtBP2/RIBEYE-Antikörper (rot) zeigt eine starke Färbung des Zellkerns und punktförmige Färbungen im Soma und entlang der Zellfortsätze. Die punktförmigen Färbungen in den Neuriten ko-lokalisieren zum Teil mit der Färbung des GM130-Antikörpers und mit vielen Punkten der synaptischen Färbung des Bassoon-Antikörpers.

C, G, K. Der Antikörper gegen Bassoon (blau) zeigt eine punktförmige synaptische Färbung entlang der Zellfortsätze.

D, H, L. Gezeigt ist die Überlagerung aller drei Antikörper-Färbungen.

Der Größenbalken entspricht in den Übersichtsbildern 10 μm , in den Ausschnitten 5 μm .

3.1.6.4 Mikroskopische Untersuchung der CtBP2-Lokalisation am trans-Golgi-Netzwerk hippocampaler Primärkulturneuronen

Für die Färbung des *trans*-Golgi Netzwerkes (TGN) und endosomaler Strukturen von *div* 14, Formaldehyd fixierten, hippocampalen Primärkulturneuronen wurde ein monoklonaler Antikörper gegen Syntaxin 6 verwendet. Dieser Antikörper färbt im Soma des Neurons verschiedene tubuläre Strukturen unterschiedlicher Größe und Form (Abbildung 16). Die Größe und Struktur des TGN ist stark von der Anzahl des enthaltenden exocytotischen und endocytotischen Transport-Materials abhängig (De Matteis and Luini, 2008), was die große Variabilität der mit dem Syntaxin 6-Antikörper gefärbten TGN-Strukturen erklärt. Neben dem somatischen TGN detektiert der Antikörper viele vesikel-artige Strukturen sowohl im Soma als auch in den Neuriten.

Zur Färbung des endogenen CtBP2 wurde der polyklonale CtBP2/RIBEYE-Antikörper verwendet. Dieser detektiert neben einem starken Zellkern-Signal viele punktförmige Strukturen entlang der Nervenzellfortsätze. Zusätzlich dazu ko-lokalisiert die CtBP2-Immunreaktivität im Soma stark mit der des Syntaxin 6-Antikörpers. Dabei sieht es so aus, als ob CtBP2 eher membran-assoziiert, als im Lumen des TGN, lokalisiert ist. Dies deutet möglicherweise auf eine Rolle von CtBP2 bei der Abschnürung von Vesikeln am TGN hin. Trotzdem ist CtBP2 nicht in allen Neuronen am TGN lokalisiert (nicht gezeigte Daten), was möglicherweise daraufhin deutet, dass CtBP2 nur in einigen Zelltypen oder nach bestimmten zellulären Signalen an das TGN transportiert wird.

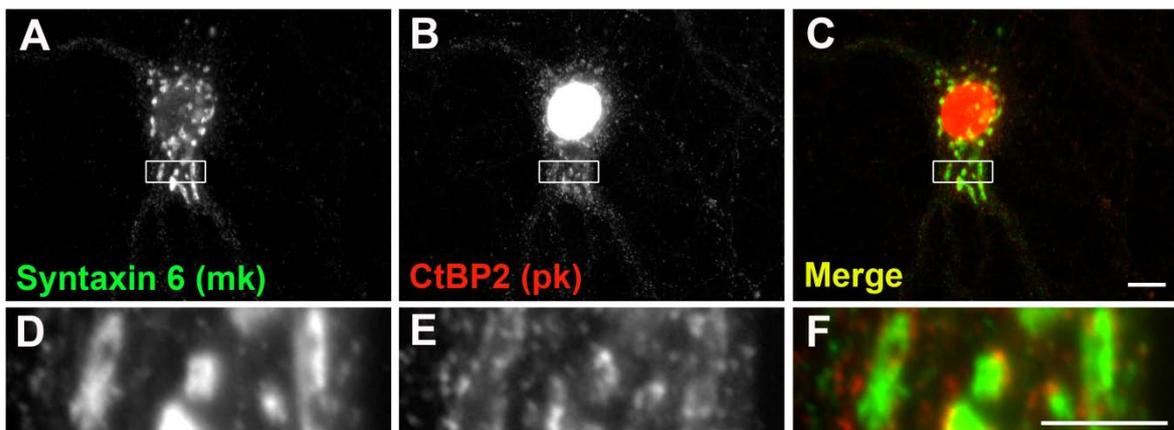


Abbildung 16: CtBP2 ist in einigen Neuronen am TGN lokalisiert.

Gezeigt sind Immunfärbungen von *div* 14 hippocampalen Primärkulturneuronen.

A, D. Der Syntaxin 6-Antikörper (grün) zeigt eine Färbung des trans-Golgi-Apparates und der Endosomen im Soma des Neurons. Zudem detektiert der Antikörper sowohl im Soma als auch den Zellfortsätzen des Neurons viele punktförmige Strukturen.

B, E. Der CtBP2/RIBEYE-Antikörper (rot) zeigt eine starke Färbung des Zellkerns und punktförmige Färbungen entlang der Zellfortsätze. Im Soma ko-lokalisiert die CtBP2-Immunreaktivität stark mit der Färbung des Syntaxin 6-Antikörpers.

C, F. Gezeigt ist die Überlagerung der Immunreaktivitäten der zwei Antikörper. Der Größenbalken entspricht in den Übersichtsbildern 10 μm , in den Ausschnitten 5 μm .

3.1.7 Immuncytochemische Untersuchungen von hippokampalen Primärkultur-Neuronen, welche ein intern Myc-markiertes CtBP1-S/BARS50-Konstrukt oder am N-Terminus mit EGFP-markierte CtBP2-Konstrukte exprimieren

3.1.7.1 CtBP1-S/BARS50-Konstrukt mit interner Myc-Markierung

Wie von Verger et al., 2006 gezeigt, beeinflusst das Anfügen einer Markierung an den N- oder C-Terminus von CtBP1/BARS50 die Lokalisation dieser CtBP1/BARS50-Konstrukte, sodass diese nicht den endogenen Lokalisationen von CtBP1/BARS50 entsprechen. Dies ist nicht verwunderlich, da die CtBP1/BARS50 N- und C-Termini beim Transport in verschiedene Zellkompartimente eine entscheidende Rolle spielen (Riefler and Firestein, 2001, Lin et al., 2003, Verger et al., 2006).

Es sollte untersucht werden, ob das Einfügen einer internen Myc-Markierung innerhalb des unstrukturierten C-Terminus von CtBP1/BARS50 einen Einfluss auf die Lokalisation des CtBP1/BARS50-Konstrukts hat. Exemplarisch wurde eine interne Myc-Markierung in die CtBP1-S/BARS50-Isoform eingefügt und die zelluläre Lokalisation dieses Konstrukts anschließend in Hippokampus-Primärkulturen untersucht. Dazu wurden *div 3* Primärkulturneuronen mit dem Myc-markierten CtBP1-S/BARS50-Konstrukt transfiziert und an *div 14* mit Formaldehyd fixiert. Die Kulturen wurden anschließend mit einem Myc-Antikörper und einem Antikörper gegen, das Synapsen-spezifischen Proteine, Synapsin 1,2 gefärbt.

Das Myc-markierte CtBP1-S/BARS50-Konstrukt (Abbildung 17) ist neben dem Zellkern auch in punktförmigen Strukturen entlang der Zellfortsätze lokalisiert. Diese Punkte ko-lokalisieren in großen Teilen mit der synaptischen Immunreaktivität des Synapsin 1,2-Antikörpers. Auch ist das Konstrukt im Cytosol perinukleär lokalisiert, was auf eine mögliche Lokalisation am Golgi-Apparat hindeutet. Es kann also davon ausgegangen werden, dass das CtBP1-S/BARS50-Konstrukt die Lokalisationen des endogenen CtBP1/BARS50 widerspiegelt

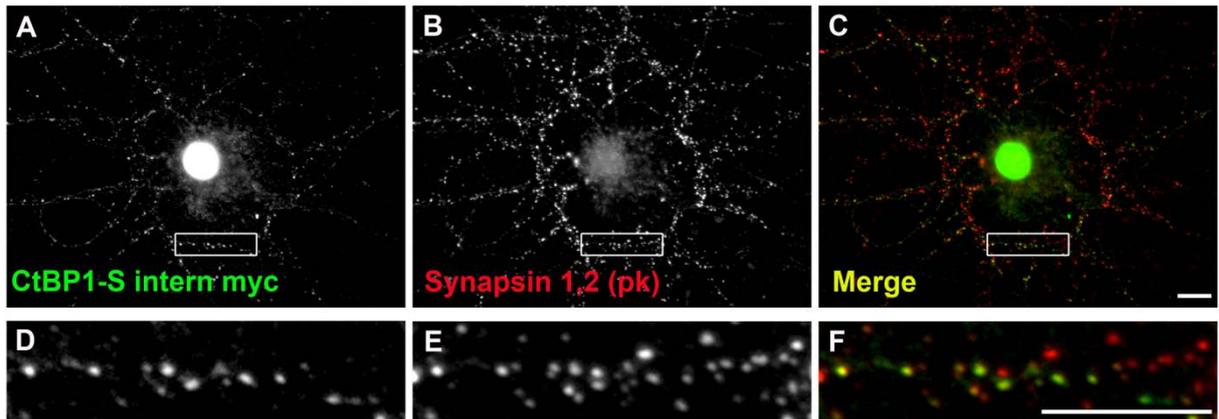


Abbildung 17: Lokalisation des intern Myc-markierten CtBP1-S/BARS50-Konstrukts in primären Hippokampus-Neuronen.

Die Neuronen wurden an *div* 3 mit dem Konstrukt transfiziert und an *div* 14 mit Formaldehyd fixiert.

A, D. Das überexprimierte intern Myc-markierte CtBP1-S/BARS50-Konstrukt (grün) lokalisiert stark in den Zellkern des transfizierten Neurons, ist aber auch in den Zellfortsätzen in vesikulären Punkten lokalisiert. Dabei ko-lokalisieren diese Punkte zu großen Teilen mit der synaptischen Färbung des Synapsin1, 2-Antikörpers (rot). Im Soma des Neurons detektiert der Myc-Antikörper zudem überexprimiertes CtBP1-S/BARS50-Konstrukt um den Zellkern herum. Das Lokalisationsmuster des Konstrukts entspricht somit dem endogenen CtBP1/BARS50s.

B, E. Der Antikörper gegen Synapsin 1,2 (rot) zeigt eine punktförmige synaptische Färbung entlang der Zellfortsätze.

C, F. Gezeigt sind die überlagerten Immunreaktivitäten beider Antikörper.

Die Größenbalken entsprechen 10 µm.

3.1.7.2 CtBP2-Konstrukte mit N-terminaler EGFP-Markierung

Wie bekannt ist, spielt der CtBP2-N-Terminus bei der Lokalisation der CtBP2-Isoformen eine entscheidende Rolle. So enthält dieser ein *Nuclear Localization Signal* (NLS), welches zu einer Anreicherung der CtBP2-Isoformen im Zellkern führt. Bei der CtBP2-S-Isoform führt ein alternativer Spleiß-Vorgang am 5' Ende zum Verlust der ersten 25 N-Terminalen Aminosäuren inklusive der NLS des Proteins (Verger et al., 2006). Dies hat eine eher cytosolische Lokalisation des Proteins zur Folge. Auch die Ergebnisse aus der quantitativen biochemischen Analyse der CtBP2-Lokalisation in Zellkernen und Synaptosomen deuten darauf hin, dass die CtBP2-S-Isoform eher synaptisch als Zellkern-ständig lokalisiert ist, wohingegen die CtBP2-Isoform hauptsächlich im Zellkern lokalisiert zu sein scheint. Diese Ergebnisse sollen hier mit Hilfe von EGFP markierten CtBP2- und CtBP2-S-Konstrukten bestätigt werden. Da gezeigt wurde, dass das Anfügen einer Markierung an den N-Terminus von CtBP2 keinen Einfluss auf die Lokalisation des Proteins hat (Verger et al., 2006), entschieden wir uns dafür, die beiden CtBP2-Isoformen am N-Terminus mit EGFP zu markieren. Die zelluläre Lokalisation dieser Konstrukte wurde anschließend in Hippokampus-Primärkulturen untersucht. Dazu wurden Primärkulturneuronen an *div* 3 mit den EGFP-markierten Konstrukten transfiziert und an *div* 14 mit Formaldehyd fixiert. Die Kulturen wurden anschließend mit dem monoklonalen CtBP2/RIBEYE-Antikörper und einem Antikörper gegen Bassoon gefärbt.

Das EGFP-CtBP2-Konstrukt ist fast vollständig im Zellkern des transfizierten Neurons lokalisiert (Abbildung 18 A) und erst nach sehr starker Überbelichtung ist vereinzelt in den Zellfortsätzen eine schwache, vesikuläre Immunreaktivität sichtbar.

Das EGFP-CtBP2-S-Konstrukt ist im Zellkern, im Soma und entlang der Zellfortsätze des transfizierten Neurons lokalisiert (Abbildung 18 B). Zudem ko-lokalisiert die EGFP-CtBP2-S-Immunreaktivität in den Neuriten zu großen Teilen mit der CtBP2/RIBEYE-Immunreaktivität und mit der synaptischen Bassoon-Immunreaktivität. Trotzdem findet sich eine CtBP2-S-Immunreaktivität nicht in allen, vom CtBP2/RIBEYE- oder Bassoon-Antikörper, detektierten Punkten entlang der Zellfortsätze. Nichts desto trotz bestätigen diese Ergebnisse die mit Hilfe der biochemischen Analyse in Abschnitt 3.1.5.1 gezeigte, synaptische Lokalisation der CtBP2-S-Isoform und die Annahme, dass der synaptische CtBP2-Pool fast ausschließlich aus der CtBP2-S-Isoform gebildet wird.

Im Soma ist das Konstrukt in vesikulären Punkten perinukleär lokalisiert. Ob es sich dabei um eine Golgi-assoziierte Lokalisation handelt ist unklar.

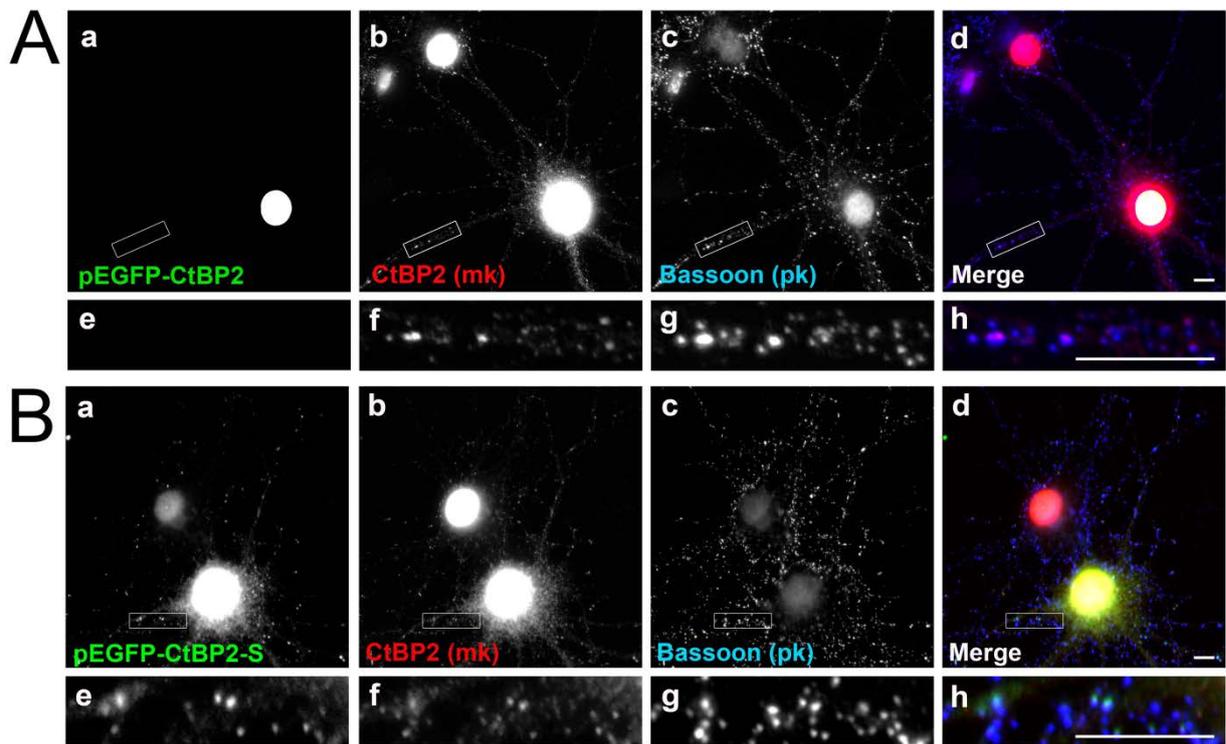


Abbildung 18: Lokalisation exprimierter EGFP-CtBP2-Konstrukte in hippocampalen Primärkulturneuronen. Gezeigt sind Immunfärbungen von an *div* 3 transfizierten und an *div* 14 mit Formaldehyd fixierten Neuronen.

A. Lokalisation des EGFP-CtBP2-Konstrukts

a, e. Das EGFP-CtBP2-Konstrukt lokalisiert exklusiv in den Zellkern des transfizierten Neurons.

b, f. Der monoklonale CtBP2/RIBEYE-Antikörper (rot) detektiert in beiden Neuronen eine CtBP2-Immunreaktivität im Zellkern, dem Soma und eine punktförmige Färbung in den Neuriten.

c, g. Der polyklonale Bassoon-Antikörper (blau) zeigt eine punktförmige, synaptische Immunreaktivität entlang der Zellfortsätze.

d, h. Gezeigt sind die überlagerten Immunreaktivitäten aller drei Antikörper. Die Größenbalken entsprechen 10 μ m.

B. Lokalisation des pEGFP-CtBP2-S-Konstrukts

a, e. Das EGFP-CtBP2-S Konstrukt (grün) lokalisiert in den Zellkern, das Soma und in die Zellfortsätze des transfizierten Neurons. In den Zellfortsätzen ko-lokalisiert die Immunreaktivität des EGFP-CtBP2-S-Konstrukts zu großen Teil mit der Immunreaktivität des CtBP2/RIBEYE- und Bassoon-Antikörpers.

b, f. Der monoklonale CtBP2/RIBEYE-Antikörper (rot) detektiert in beiden Neuronen eine CtBP2-Immunreaktivität im Zellkern, dem Soma und eine punktförmige Färbung in den Neuriten. Dabei ko-lokalisiert die Immunreaktivität in den Neuriten des transfizierten Neurons zu großen Teilen mit dem Signal des EGFP-CtBP2-S-Konstrukts.

c, g. Der polyklonale Bassoon-Antikörper (blau) färbt punktförmige, synaptische Strukturen entlang der Zellfortsätze.

d, h. Gezeigt ist die Überlagerung der Immunreaktivitäten aller drei Antikörper. Die Größenbalken entsprechen 10 μ m.

3.1.8 2D-gelelektrophoretische Analyse der CtBP1/BARS50-Isoformen in Synaptosomen und Zellkernen

Trotz der Identifizierung einer synaptischen Lokalisation von CtBP1/BARS50 ist die exakte molekulare Natur der synaptischen CtBP1/BARS50-Isoform unklar. Auch besteht, aufgrund der Vielzahl von posttranslationalen Modifikationen die an der Regulation der Lokalisationen und Funktionen von CtBP1/BARS50-Proteinen im Zellkern und Cytosol beteiligt sind, für das synaptische CtBP1/BARS50 die Möglichkeit der Modifizierung durch posttranslationale Modifikationen. Welche dadurch möglicherweise an der Verankerung von CtBP1/BARS50 an der Synapse und der synaptischen Funktion von CtBP1/BARS50 beteiligt sind.

Diese 2D-gelelektrophoretische Analyse des synaptosomalen und nukleärer Proteomes dient dem Vergleich der CtBP1/BARS50-Isoformen und posttranslationalen Modifikationsmuster von CtBP1/BARS50 in beiden Fraktionen und gibt somit möglicherweise einen Hinweis auf Synapsen-spezifische CtBP1/BARS50-Isoformen und posttranslationale Modifikationen der CtBP1/BARS50-Proteine an Synapsen. Dazu wurden aus Maushirn-Homogenaten entweder Synaptosomen- oder Zellkern-Fraktionen präpariert und die Proteine der jeweiligen Fraktion in der ersten Dimension nach ihrem Isoelektrischen Punkt (pI) zwischen pH 3 und pH 11 aufgetrennt. In der zweiten Dimension erfolgte dann die Auftrennung der Proteine nach ihrem MW. In Abbildung 19 sind die aufgetrennten Proteine aus der Zellkern- und der Synaptosomen-Fraktion mit dem dazugehörigen Coomassie-Gelen (Abbildung 19 C und F) gezeigt. Jeweils ein Westernblot der Zellkern-Fraktion und einer Westernblot der Synaptosomen-Fraktionen wurden mit dem monoklonalen CtBP1/BARS50-Antikörper (Abbildung 19 A und D) oder mit dem selbst gereinigten CtBP1-L-Antikörper (Abbildung 19 B und E) gefärbt.

Der monoklonale CtBP1/BARS50-Antikörper detektiert in der Zellkern-Fraktion (Abbildung 19A) bei einem MW von ~50 kDa circa 10 Punkte. Dabei zeigen zwei Punkte ein leicht höheres MW als die restlichen, vom Antikörper detektierten, Punkte. Der pI der detektierten Spots liegen dabei zwischen einem pH von ca. 6,0 und 6,4. Bei den Punkten mit dem leicht niedrigeren MW ist anzunehmen, dass es sich um die CtBP1-S/BARS50-Isoform handelt, wohingegen die Spots mit dem leicht höheren MW wahrscheinlich die CtBP1-L-Isoform darstellen.

Der CtBP1-L-Antikörper detektiert in der Zellkern-Fraktion (Abbildung 19 B) drei sehr starke und einen schwachen Punkt bei einem MW von ~50 kDa, wobei der pI der Punkte ebenfalls zwischen einem pH von ca. 6,0 und 6,5 liegt. Bei einer Überlagerung der Antikörper-Signale des monoklonalen CtBP1/BARS50- und des CtBP1-L-Antikörper zeigt sich, dass die von dem monoklonalen CtBP1/BARS50-Antikörper detektierten zwei Spots mit einem höheren MW auch vom CtBP1-L-Antikörper detektiert werden. Bei diesen Punkten handelt es sich

also mit großer Wahrscheinlichkeit um CtBP1-L. Neben den Spots mit einem MW von ~50 kDa erkennt der CtBP1-L-Antikörper noch andere Spots mit einem Molekulargewicht von ~60 kDa und verschiedenen isoelektrischen Punkten.

In der Synaptosomen-Fraktion detektiert der CtBP1/BARS50-Antikörper (Abbildung 19 D) circa 7 Punkte bei ~50 kDa und einem pI zwischen pH 5,9 und 6,5. Zwei bis drei der detektierten Punkte haben auch hier ein höheres MW als der Rest der Punkte, und auch hier handelt es sich höchst wahrscheinlich um CtBP1-L, da diese Punkte auch vom CtBP1-L-Antikörper detektiert werden. Beim Vergleich des vom CtBP1/BARS50-Antikörper detektierten Punkt-Musters in beiden Fraktionen zeigt sich, dass mehrere Punkte in beiden Fraktionen zu finden sind, es aber auch einige Punkte gibt die spezifisch nur in der einen oder anderen Fraktion detektiert werden.

Der CtBP1-L-Antikörper detektiert in der Synaptosomen-Fraktion (Abbildung 19 E) 4 Punkte, zwei stark und zwei schwach, bei einem pI zwischen 6,2 und 6,5 und einem MW von ~50 kDa. Zusätzlich dazu detektiert der Antikörper noch weitere Punkte bei einem MW von ~60 und ~70 kDa mit unterschiedlichen pI. Bei diesen Punkten handelt es sich aber höchstwahrscheinlich um unspezifische Signale.

Allgemein fällt auf, dass der Antikörper in beiden Fraktionen immer zwei sehr starke Punkte detektiert, die sich in beiden Fraktionen nicht unterscheiden. Wohingegen die schwächeren, vom Antikörper detektierten, Punkte in beiden Fraktionen ihre isoelektrischen Punkte bei unterschiedlichen pH-Werten haben. Dies deutet möglicherweise auf unterschiedliche posttranslationale Modifikationen des CtBP1-L-Proteins in der jeweiligen Fraktion hin.

Prinzipiell zeigt diese Analyse, dass wahrscheinlich beide CtBP1/BARS50-Isoformen, CtBP1-L und CtBP1-S/BARS50, synaptisch und nukleär lokalisiert sind, dass sich aber das posttranslationale Modifikationsmuster beider Isoformen untereinander und in den beiden untersuchten Fraktionen unterscheidet. Zudem muß auch die Existenz weiterer

CtBP1/BARS50-Isoformen in beiden Fraktionen in Betracht gezogen werden. Auch deutet vieles auf Synapsen-spezifische posttranslationale Modifikationen beider Isoformen hin.

Für die massenspektrometrische Analyse wurden im Anschluss die Punkt-Muster auf den Westernblots mit denen auf den Coomassie-Gelen verglichen und übereinstimmende Spots wurden ausgestochen. Dabei ist zu beachten, dass Westernblot und Coomassie-Gele durch behandlungsbedingte Größenverzerrungen nicht genau in Übereinstimmung gebracht werden können. Die ausgestochenen Punkte wurden anschließend gereinigt und einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen. Die Auswertung der Massenspektren der gestochenen Proteine ergab entweder keine Übereinstimmung mit den Massenspektren aus dem theoretischen Verdau der CtBP1/BARS50-Sequenz oder die Proteinkonzentration in den ausgestochenen Punkten war zu niedrig.

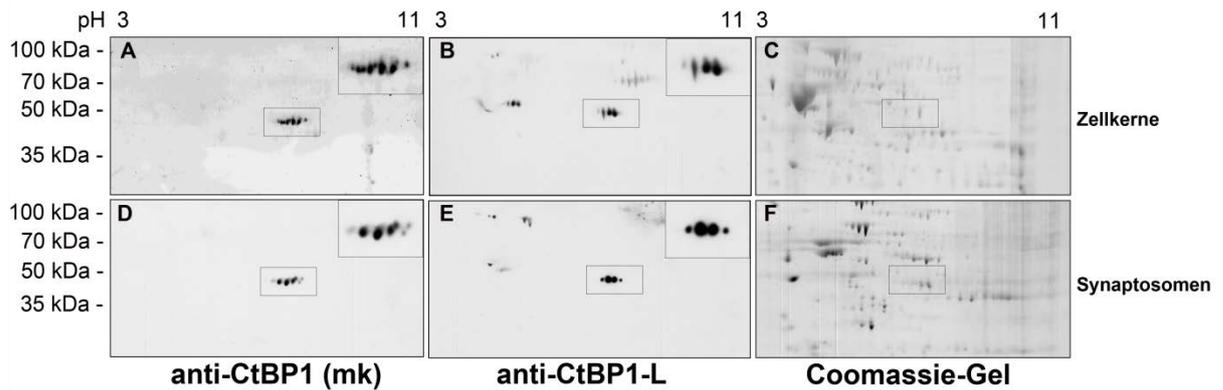


Abbildung 19: Zweidimensionale Auftrennung von Proteinen aus Zellkern- oder Synaptosomen-Fractionen.

Oben rechts ist in jedem Westernblot eine Vergrößerung der von den jeweiligen Antikörpern detektierten Punkte gezeigt.

A. Der monoklonale CtBP1/BARS50-Antikörper detektiert in der Zellkern-Fraktion circa 10 Punkte mit einem MW von ~50 kDa und pI zwischen pH 6,0 und 6,4. Zwei bis drei der detektierten Punkte haben ein leicht höheres MW, auch um die 50 kDa. Diese Punkte werden auch vom CtBP1-L N-Terminus Antikörper detektiert.

B. Der CtBP1-L-Antikörper detektiert in der Zellkern-Fraktion 4 Punkte bei einem MW von ~50 kDa und einem pI zwischen pH 6,0 und 6,5. Daneben detektiert der Antikörper noch mehrere, andere Spots mit unterschiedlichen MW und pIs.

C. Gezeigt ist das Coomassie-Gel der Zellkern-Proteine.

D. In der Synaptosomen-Fraktion detektiert der CtBP1/BARS50-Antikörper circa 7 Punkte bei 50 kDa und einem pI zwischen pH 5,9 und 6,5. Auch hier zeigen vier Punkte ein leicht höheres MW als die restlichen detektierten Punkte.

E. Der CtBP1-L-Antikörper detektiert in der Synaptosomen-Fraktion ebenfalls 4 Punkte bei einem MW von 50 kDa und einem pI zwischen pH 6,2 und pH 6,5. Zusätzlich dazu detektiert der Antikörper auch hier noch andere, wahrscheinlich unspezifische Punkte.

F. Gezeigt ist das Coomassie-Gel der Proteine aus der Synaptosomen-Präparation.

4. Diskussion

4.1 Die Proteine der CtBP1/BARS50- und CtBP2-Familie unterscheiden sich im adulten Gehirn in ihren räumlichen Expressionsmustern, ihren Expressionsniveaus und ihrer Zelltyp-spezifischen Expression

Für die in dieser Arbeit vorgenommene Untersuchung des Expressionsmusters wurden CtBP1/BARS50- und CtBP2/RIBEYE-Antikörper verwendet, welche alle Isoformen des jeweiligen Gens erkennen. Da aber mit Hilfe des RIBEYE-A-Domäne-Antikörpers eine RIBEYE-Expression im gesamten Gehirn ausgeschlossen werden kann (Abschnitt 3.1.3.2), handelt es sich bei der vom CtBP2/RIBEYE-Antikörper detektierten synaptischen Immunreaktivität höchst wahrscheinlich um CtBP2 und CtBP2-S.

Die CtBP1/BARS50- und CtBP2-mRNAs (Allen Mouse Brain Atlas [Internet]. Seattle (WA): Allen Institute for Brain Science. ©2009, <http://mouse.brain-map.org>) sind im adulten Gehirn ähnlich weit verbreitet und gleichmäßig exprimiert. Dagegen zeigen die Proteinprodukte beider Gene Unterschiede in ihren räumlichen und Zelltyp-spezifischen Expressionsmustern und in ihren Expressionsniveaus zwischen verschiedenen Hirnarealen.

So sind die Proteinprodukte des CtBP1/BARS50-Gens in allen untersuchten Hirnarealen gleichmäßig exprimiert (Abschnitt 3.1.4). Im Gegensatz dazu ist das Expressionslevel der Proteinprodukte des CtBP2-Gens in den einzelnen Hirnarealen unterschiedlich hoch, wobei vor allem im Kleinhirn und dem Bulbus olfactorius, verglichen mit den anderen Hirnarealen, die Expression von CtBP2 besonders stark ist (Abschnitt 3.1.4).

Innerhalb der verschiedenen Hirnregionen finden sich zudem überlappende und nicht-überlappende Expressionsbereiche der Proteinprodukte beider CtBP-Gene. So konnte eine überlappende CtBP1/BARS50- und CtBP2-Expression zum Beispiel in den Zellkörpern des *Stratum granulosum* des *Gyrus dentatus* im Hippokampus und im Neuropil der Molekularschicht des Kleinhirn-Cortexes (Abschnitt 3.1.4.1) festgestellt werden.

Grundsätzlich sind die Expressionsmuster der CtBP-Proteinprodukte in vielen Hirnarealen aber nicht-überlappend. Zum Beispiel detektiert der monoklonale CtBP1/BARS50-Antikörper in den Zellkörpern der Pyramidenzellschicht des Hippokampus vor allem in der CA1-Region eine CtBP1/BARS50-Immunreaktivität, wohingegen der Antikörper gegen CtBP2/RIBEYE in den Regionen CA2 und CA3 Immunreaktivität aufweist (Abschnitt 3.1.4.1). Ein weiteres Beispiel sind die Zellkörper der Körnerschicht des Cerebellums, wo der CtBP1/BARS50-Antikörper keine Immunreaktivität, der CtBP2/RIBEYE-Antikörper dagegen eine starke Immunreaktivität detektiert.

Einen weiteren Hinweis auf nicht-überlappende Expressionsmuster der CtBP1/BARS50- und CtBP2/RIBEYE-Proteine konnte mit Hilfe der quantitativen Analyse der nukleären CtBP1/BARS50- und CtBP2-Immunreaktivität in inhibitorischen und exzitatorischen Neuronen in hippocampalen Primärkulturneuronen gewonnen werden (Abschnitt 3.1.4.3). So wurde erstmals gezeigt, dass die Expression der CtBP2-Proteine in den Zellkernen exzitatorischer Neurone, im Vergleich zu der Expression in inhibitorischen Neuronen, deutlich höher ist. Die CtBP1/BARS50-Proteine zeigen dagegen eine leicht höhere Expression in den Zellkernen inhibitorischer Neurone. Unklar ist, ob die erhöhte CtBP1/BARS50-Expression in den Zellkernen inhibitorischer Neurone der Kompensation der verringerten CtBP2-Expression dient. Allerdings deuten die von Hildebrand und Soriano, (2002) durchgeführten Studien an Knock-out-Mäusen darauf hin, dass CtBP1/BARS50 die CtBP2-Funktionen im Zellkern nicht kompensieren kann.

Zusammenfassend zeigt sich in dieser Studie, dass die Proteine der CtBP1/BARS50- und CtBP2/RIBEYE-Familie im adulten Gehirn individuelle Expressionsmuster, mit überlappenden und nicht-überlappenden Expressionbereichen innerhalb verschiedener Hirnregionen, aufweisen. So deuten die überlappenden Expressionsbereiche der CtBP-Proteinprodukte auf gemeinsame nukleäre und synaptische Funktionen in verschiedenen Zelltypen hin. Gleichzeitig geben die nicht-überlappenden Expressionsbereiche möglicherweise einen Hinweis auf unabhängige Funktionen bei der neuronalen Differenzierung oder auf Zelltyp-spezifische Funktionen der CtBP1/BARS50- und CtBP2-Proteine.

4.2 Sind einzelne Mitglieder der CtBP-Proteinfamilie in Neuronen spezifisch für ein Zellkompartiment?

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Analyse der subzellulären Verteilung bekannter CtBP1/BARS50- und CtBP2-Isoformen zeigte, dass nur die lange CtBP2-Isoform spezifisch im Zellkern angereichert wird. Die anderen untersuchten Isoformen, CtBP1-L, CtBP1-S/BARS50 und CtBP2-S, sind dagegen sowohl im Zellkern als auch den Synapsen lokalisiert. Zudem kann eine Lokalisation von CtBP2-S am somatischen Golgi-Apparat nicht ausgeschlossen werden. Eine Golgi-assoziierte Lokalisation von CtBP1-L konnte mit dieser Studie allerdings nicht geklärt werden. In den folgenden Unterkapiteln werden die Lokalisationen der einzelnen Isoformen in den untersuchten Kompartimenten im Detail besprochen und Hinweise auf potentiell unterschiedliche Funktionen diskutiert.

4.2.1. Alle untersuchten CtBP1/BARS50- und CtBP2-Isoformen können im Zellkern vorkommen

Mit Hilfe des Myc-markierten CtBP1-S/BARS50-Konstrukts (Abschnitt 3.1.7.1) konnte erstmals gezeigt werden, dass das Einfügen einer internen Markierung in den unstrukturierten C-Terminus keinen Einfluss auf die endogene Lokalisation des CtBP1/BARS50-Konstrukts hat. So ist das Myc-markierte CtBP1-S/BARS50-Konstrukt im Cytosol und im Zellkern transfizierter Hippokampus-Neurone lokalisiert, was der endogenen Lokalisation der CtBP1-S/BARS50-Isoform entspricht.

Gleichzeitig bestätigt diese Analyse, die bereits mehrfach gezeigte ähnliche subzelluläre Verteilung der beiden CtBP1/BARS50-Isoformen, CtBP1-L und CtBP1-S/BARS50 (Verger et al., 2006, Zhao et al., 2006). Und es ist somit davon auszugehen, dass die Lokalisationen und Funktionen der CtBP1/BARS50-Isoformen vor allem durch die Bindung verschiedener Kofaktoren, die Fähigkeit der CtBP-Proteine zur Homo- und Heterodimerisierung und die Bindung von cytosolischen und nukleären Bindungspartnern bestimmt werden.

Im Einklang mit dieser Hypothese steht die Erkenntnis, dass die Bindung von Palmitoyl-CoA (p-CoA) an CtBP1-S/BARS50 für seine Funktion bei der Abschnürung der COPI-Vesikel essentiell ist und dass eine steigende NADH/NAD⁺-Konzentration zu einer Inhibierung der CtBP1-S/BARS50-Funktion am Golgi-Apparat führt (Yang et al., 2005). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass CtBP1-S/BARS50 nach Bindung des Kofaktors NADH/NAD⁺ eine geschlossene Konformation einnimmt, die es dem Protein nicht mehr erlaubt p-CoA zu binden und stattdessen die Dimerisierung von CtBP1/BARS50-Monomeren induziert (Kumar et al., 2002, Nardini et al., 2003). So kann ein CtBP1/BARS50-Monomer mit einem CtBP2-Monomer heterodimerisieren oder mit einem weiteren CtBP1/BARS50-Monomer

homodimerisieren. Bei einer Heterodimerisierung mit CtBP2 würde der Kernimport des Dimers mit Hilfe der NLS in der N-terminalen Aminosäure-Sequenz von CtBP2 erfolgen (Verger et al., 2006). Bei einer Homodimerisierung erfolgt der Kernimport des CtBP1/BARS50-Dimers höchst wahrscheinlich durch die Bindung an einen Transkriptionsfaktor beispielweise BKLf (Verger et al., 2006). Der Kernimport hat zur Folge, dass CtBP1-S/BARS50 für eine Funktion am Golgi-Apparat nicht mehr zur Verfügung steht und nukleären Funktionen zugeführt wird. Dabei ist ebenfalls eine Funktion von CtBP1-S/BARS50 als Transkriptions-Ko-Repressor wahrscheinlich. So konnten Verger und Kollegen (2006) bereits einen ersten Hinweis auf eine Transkriptions-Repression durch CtBP1-S/BARS50 geben.

Neben den Kernimport-induzierenden Prozessen sind eine Reihe weiterer posttranslationaler Modifikationen bekannt, die an der Regulation des Kernexports der CtBP1/BARS50-Proteine beteiligt sind. So führt die Bindung von nNOS an CtBP1/BARS50 zu dessen Anreicherung im Cytosol der Zelle (Riefler and Firestein, 2001). Und auch die Phosphorylierung durch PAK1 induziert den Kernexport von CtBP1/BARS50 (Barnes et al., 2003). Somit erlaubt eine Vielzahl von, die Lokalisation der CtBP1/BARS50-Proteine beeinflussenden, Mechanismen eine dynamische Regulierung der CtBP1/BARS50-Lokalisation und -Funktionen innerhalb der Zelle. Dies bedeutet auch, dass die Funktionen der CtBP1/BARS50-Proteine durch multiple zelluläre Faktoren z. B. Transkription, Redox-Status der Zelle oder dem Metabolismus von Acetyl-CoA beeinflusst werden können (Bonazzi et al., 2005, Yang et al., 2005).

Zur weiteren Untersuchung der subzellulären Verteilungen der einzelnen CtBP1/BARS50-Isoformen sollte in einem nächsten Schritt eine interne Myc-Markierung in alle bekannten CtBP1/BARS50-Isoformen eingefügt werden.

Für die beiden untersuchten Mitglieder der CtBP2-Familie, CtBP2 und CtBP2-S, konnte eine zellkernständige Lokalisation mit Hilfe von biochemischen Untersuchungen (Abschnitt 3.1.5) und EGFP-markierten-Konstrukten (Abschnitt 3.1.7.2) gezeigt werden. Für die lange CtBP2-Isoform ist diese Zellkernlokalisation zudem exklusiv. Dies konnte bereits mehrmals gezeigt werden und ist auf das NLS-Motiv im N-Terminus des Proteins zurückzuführen (Verger et al., 2006). Im Gegensatz zu den hier beschriebenen Daten wurde bei der ersten Identifikation der CtBP2-S-Isoform keine Zellkernlokalisation für diese festgestellt (Verger et al., 2006). Die hier beobachtete Zellkernlokalisation ist aber durch eine Homodimerisierung von CtBP2-S mit der langen CtBP2-Isoform (Verger et al., 2006) durchaus erklärlich. Zudem besteht im Zellkern die Möglichkeit einer SUMOylierung der CtBP2-S-Isoform durch HPC2 (Kagey et al., 2005), was zu einem Verbleib des Proteins im Zellkern beitragen könnte. Trotzdem zeigen die biochemischen und immunocytochemischen Analysen eindeutig, dass die lange CtBP2-Isoform den Hauptanteil des nukleären CtBP2 stellt. Somit ist davon auszugehen, dass vor

allem das NLS-Motiv den Zellkern-Import der CtBP2-Isoform bedingt. Dies zeigen auch Untersuchungen von einem Chimären-Konstrukt aus CtBP1 mit dem NLS von CtBP2 (Verger et al., 2006), welches in Neuronen nicht mehr synaptisch lokalisiert ist, sondern stattdessen im Zellkern akkumuliert (unveröffentlichtes Material von Dr. Anna Fejtova).

4.2.2 Ist CtBP1-S/BARS50 an Golgi-Outposts und CtBP2-S am Golgi-Apparat lokalisiert?

Die immunocytochemischen Analysen der CtBP1/BARS50-Lokalisation in hippocampalen Primärkulturneuronen (Abschnitt 3.1.6.2) deuten eine mögliche Lokalisation von CtBP1/BARS50 an dendritischen Golgi-Material, den sogenannten Golgi-Outposts (Horton and Ehlers 2003), an. Golgi-Outposts sind nach Horton and Ehlers (2003) nur in Dendriten lokalisiert und es wird angenommen, dass sie dem Transport und der posttranslationalen Modifikation von Cargo-Material innerhalb der Dendriten dienen, was eine gezielte Versorgung einzelner Synapsen mit neuen Proteinen erlaubt (Pierce et al., 2001). Die Kompartimente des dendritischen Golgi-Apparates finden sich sowohl in dendritischen Spines (raues endoplasmatisches Reticulum (RER) und *endoplasmic reticulum-to-Golgi intermediate compartment* (ERGIC)), Spine heads (*cis*-Golgi-Material) und in Dendriten (*trans*-Golgi-Material) (Pierce et al., 2001). Da der für die immunocytochemischen Analysen verwendete Antikörper gegen GM130 ein Matrixprotein des *cis*-Golgi-Apparates ist (Nakamura, 2010), müsste bei einer tatsächlichen Lokalisation von CtBP1/BARS50 an dendritischem *cis*-Golgi-Material eine CtBP1/BARS50-Immunreaktivität in Spine heads sichtbar sein. Dies kann allerdings durch die immun-elektronenmikroskopischen Aufnahmen von der Molekularschicht des Kleinhirn-Cortexes (Abschnitt 3.1.6.1) nicht bestätigt werden. Mit Hilfe dieser Aufnahmen ist kein dunkles Peroxidase-Produkt, des verwendeten CtBP1/BARS50-Antikörpers, in der postsynaptischen Endigung sichtbar. Somit ist fraglich, ob die in den immunocytochemischen Analysen in Abschnitt 3.1.6.2 gezeigte Ko-Lokalisation der CtBP1/BARS50-Immunreaktivität mit der Immunreaktivität des GM130-Antikörpers in den Zellfortsätzen des Neurons echt ist. Wahrscheinlicher ist, dass diese aufgrund der engen synaptischen Kontakte und der Auflösungsgrenzen der verwendeten Lichtmikroskopie-Technik zu Stande kommt. Letztere Annahme wird auch durch die weitere Ko-Lokalisation der CtBP1/BARS50- und GM130-Immunreaktivität mit der Immunreaktivität des Bassoon-Antikörpers bekräftigt.

Ob und in welchem Umfang CtBP1-L am somatischen Golgi-Komplex lokalisiert ist, konnte mit dieser Arbeit nicht geklärt werden. Trotzdem deutet die große Homologie zwischen den beiden CtBP1/BARS50-Isoformen (97% auf dem Aminosäuren-Level; Spano et al., 1999) auf eine mögliche funktionelle Redundanz beider Proteine hin. So konnten auch Liberali und Kollegen (2008) zeigen, dass CtBP1-L genau wie CtBP1-S eine epidermal growth factor-

induzierte Makropinocytose stimuliert und auch an anderen CtBP1/BARS-abhängigen Vesikel-Abschnürungsprozessen beteiligt ist (Corda et al., 2006). Zur weiteren Klärung der CtBP1-L-Lokalisation am Golgi-Apparat sollten biochemische Analysen der Golgi-Membran-Fractionen oder detaillierte Elektronenmikroskop-Studien mit dem CtBP1-L-Antikörper durchgeführt werden.

Mit einer immunocytochemischen Untersuchung von hippokampalen Primärkulturneuronen (Abschnitt 3.1.6.4) konnte erstmals eine mögliche CtBP2-Lokalisation am *trans*-Golgi-Netzwerk einzelner Neuronen dargestellt werden. Der dazu verwendete CtBP2/RIBEYE-Antikörper zeigt eine eindeutige Ko-Lokalisation mit dem *trans*-Golgi- und Endosomen-Marker Syntaxin 6. Gleichzeitig deutet eine Überlagerung beider Immunreaktivitäten auf eine eher Membran-assoziierte Lokalisation von CtBP2 am *trans*-Golgi-Netzwerk hin. Aufgrund der bereits gezeigten, exklusiven Zellkernlokalisierung der CtBP2-Isoform kann zudem davon ausgegangen werden, dass es sich bei der vom CtBP2/RIBEYE-Antikörper detektierten CtBP2-Immunreaktivität am TGN um CtBP2-S handelt. Des Weiteren konnte nicht in allen untersuchten Neuronen eine Golgi-assoziierte CtBP2-Immunreaktivität festgestellt werden. Wie bereits für exzitatorische und inhibitorische Neuronenpopulationen gezeigt (Abschnitt 3.1.4.3), ist dies möglicherweise auf unterschiedliche CtBP2-Expressionsmuster in den verschiedenen Neuronenpopulationen des Hippokampus zurückzuführen. Sodass nur in Neuronenpopulationen mit sehr hoher CtBP2-Expression die CtBP2-S-Isoform einer Golgi-assoziierten Funktion zur Verfügung steht. Gleichzeitig ist auch vorstellbar, dass die Lokalisation von CtBP2 am Golgi-Apparat, genau wie für die CtBP1/BARS50-Lokalisation beschrieben (Bonazzi, et al., 2005; Yang, et al., 2005), der Regulierung durch multiple zelluläre Mechanismen unterliegt. So könnte die Bindung der Kofaktoren NAD^+/NADH und Acetyl-CoA oder verschiedener cytosolischer und nukleärer Bindungspartner an der Regulation von Lokalisation und Funktion der CtBP2-S-Isoform beteiligt sein. Unter anderem könnte dann die Bindung des Kofaktors Acetyl-CoA an CtBP2-S eine Dimerisierung des Proteins mit CtBP2 und somit einen möglichen Kernimport verhindern, was CtBP2-S möglicherweise für einen Transport an den *trans*-Golgi-Komplex markiert. Andererseits ist aber auch ein aktives Ausschleusen von CtBP2-S aus dem Zellkern vorstellbar.

So konnten Dammer und Sewer (2008) zeigen, dass im menschlichen Cortex nach ACTH-Stimulierung vorrangig CtBP1/BARS50, aber auch CtBP2, durch die cAMP-abhängige Protein Kinase A und durch PAK 6 phosphoryliert werden und dass diese Phosphorylierung den Kernexport von CtBP1-CtBP2-Heterodimeren stimuliert. Somit stände dann das CtBP1-CtBP2-Heterodimer für den Transport zum Golgi-Apparat zur Verfügung.

Ein weiterer möglicher Mechanismus ist die Phosphorylierung von CtBP2-S durch PAK1. Barnes und Kollegen (2003) konnten zeigen, dass das PAK1-Bindungsmotiv in der Familie der CtBP1/BARS50- und CtBP2-Proteine konserviert ist und dass nach Phosphorylierung

eines Serins in diesem Bindungsmotiv CtBP1/BARS50 aus dem Zellkern exportiert wird. Des Weiteren konnten Liberali et al. (2008) zeigen, dass diese Phosphorylierung für die *epidermal growth factor*-stimulierte CtBP1/BARS50-regulierte Makropinocytose verantwortlich ist. Die Konservierung dieses Phosphorylierungsmotivs in der CtBP2-S-Sequenz deutet möglicherweise auf einen wichtigen regulatorischen Einfluss dieser posttranslationalen Modifikation auch für die CtBP2-S-Isoform hin.

Da die verwendete Lichtmikroskopie-Technik eine eindeutige Aussage über eine CtBP2-S Lokalisation am Golgi-Apparat nicht zulässt, sollten zur weiteren Untersuchung der CtBP2-S-Lokalisation am *cis*- und *trans*-Golgi-Netzwerk, biochemische Analysen der Golgi-Membran-Fractionen und immuncytochemische Analysen von, mit EGFP-CtBP2-S transfizierten und untransfizierten, hippokampalen Primärkulturneuronen mit hochauflösenden Lichtmikroskopie-Techniken durchgeführt werden.

Ferner sollte in weiteren Untersuchungen gezielt nach cytosolischen und nukleären Bindungspartnern oder posttranslationalen Modifikationen für die CtBP2-S-Isoform gesucht werden. Da diese möglicherweise einen Hinweis auf die Mechanismen geben, die CtBP2-S für einen Transport an den Golgi-Komplex markieren.

Was die CtBP2-S-Funktion am Golgi-Netzwerk angeht, lässt die großen Ähnlichkeit zwischen den Proteinprodukten der CtBP-Familie überlappende Golgi-assoziierte Funktionen der CtBP1-S/BARS50- und CtBP2-S-Isoformen vermuten. Einen ersten Hinweis würden dabei Ko-Lokalisations-Studien mit dem monoklonalen CtBP1/BARS50- und dem polyklonalen CtBP2/RIBEYE-Antikörper in hippokampalen Primärkulturneuronen geben. Dabei ist allerdings zu beachten, dass die von dem CtBP1/BARS50-Antikörper detektierte CtBP1/BARS50-Immunreaktivität im Cytosol eher schwach ist (Abschnitt 3.1.6.2), was möglicherweise auf eine direkte Bindung des CtBP1-S/BARS50-C-Terminus an die Lipidmembranen des Golgi-Netzwerkes (Yang et al., 2005) und einer somit verringerten Affinität des C-Terminus spezifischen Antikörpers zurückzuführen ist.

Abhilfe würde hier ein CtBP1-S/BARS50-N-Terminus spezifischer Antikörper schaffen.

4.2.3 CtBP1-L, CtBP1-S/BARS50 und CtBP2-S sind an konventionellen chemischen Synapsen lokalisiert

4.2.3.1 Gibt es Hinweise zu Synapsen-spezifischen posttranslationalen Modifikationen und deren möglichen Regulation der synaptischen CtBP1/BARS50-Funktion?

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten immunhistochemischen und biochemischen Analysen adulter Maushirnareale (Abschnitt 3.1.4.1 und 3.1.4.2) zeigen eine weit verbreitete Expression der CtBP1/BARS50-Proteine im Neuropil des Gehirns. Auch bestätigen die durchgeführten immuncytochemischen Analysen von hippokampalen Primärkulturneuronen

(Abschnitt 3.1.6.2), die bereits gezeigte Lokalisation von CtBP1/BARS50 an konventionellen chemischen Synapsen (tom Dieck et al., 2005). Zusätzlich konnte mit Hilfe der quantitativen Immun-Westernblots (Abschnitt 3.1.5.1) in der Synaptosomen-Fraktion eine stärkere Anreicherung der CtBP1/BARS50-Proteine im Vergleich zur Zellkern-Fraktion gezeigt werden. Des Weiteren zeigen die biochemischen Analysen mit dem CtBP1-L-Antikörper (Abschnitt 3.1.5.1) und die immunocytochemischen Verteilungen des Myc-markierten CtBP1-S/BARS50-Konstrukts (Abschnitt 3.1.7.1), eine Lokalisation von CtBP1-L sowie CtBP1-S/BARS50 an konventionellen chemischen Synapsen.

Die 2D-gelelektrophoretische Analyse von CtBP1/BARS50 in Zellkernen und Synaptosomen (Abschnitt 3.1.8) zeigt, dass die beiden CtBP1/BARS50-Isoformen sowohl in der Zellkern- als auch in der Synaptosomen-Fraktion höchstwahrscheinlich das Substrat verschiedener Phosphorylierungen sind. Der kalkulierte pI von CtBP1-L ist 6.28, der von CtBP1-S/BARS50 ist 6.17. Bei einer Phosphorylierung von CtBP1/BARS50 verschiebt sich der pI weiter in Richtung des sauren pH-Wertes, zum Beispiel liegt der pI von CtBP1-L nach vier Phosphorylierungen bei einem pH von 5,96. Aufgrund der Anzahl der Spots in der Zellkern-Fraktion ist anzunehmen, dass beide Isoformen dort stärker als in der Synaptosomen-Fraktion phosphoryliert vorliegen. Zudem deuten die 2D-gelelektrophoretischen Analysen auf eine stärkere Phosphorylierung der CtBP1-S/BARS50-Isoform in beiden Fraktionen hin. Gleichzeitig gibt der Vergleich der Spotmuster beider Fraktionen auch einen Hinweis auf Synapsen-spezifische Phosphorylierungen beider CtBP1/BARS50-Isoformen. Ausgehend von bereits identifizierten Kinasen, die im Zellkern für die Phosphorylierung von CtBP1/BARS50 verantwortlich sind, könnten folgende Kinasen für eine mögliche synaptische Phosphorylierung von CtBP1/BARS50 in Frage kommen:

Zum einen PAK1. PAK1 gehört zu der 1. Gruppe der *p21-activated kinases*, welche viele Aspekte verschiedener zellulärer Funktionen regulieren, u. a. die Dynamik des Zytoskeletts, Zellbewegungen und synaptische Plastizität. Zudem wurde PAK1 im Zellkern als Kinase identifiziert, die CtBP1/BARS50 an Serin-158 (CtBP1-S/BARS50 Serin-147) phosphoryliert und dadurch einen Export von CtBP1/BARS50 aus dem Zellkern verursacht (Barnes et al., 2003). Neuere Studien zeigen zudem, dass die Phosphorylierung von CtBP1/BARS50 durch PAK1 für die PAK1-abhängige Makropinocytose verantwortlich ist (Liberali et al., 2008). Da PAK1 im gesamten Gehirn, vor allem aber in den Axonen und Dendriten der Neurone des Hippokampus und des Cortexes in Zellschichten vier und fünf exprimiert wird (Kreis and Barnier, 2009), ist auch eine synaptische Phosphorylierung von CtBP1/BARS50 vorstellbar. So könnte nach Phosphorylierung durch PAK1 CtBP1/BARS50 möglicherweise an der präsynaptischen Endocytose beteiligt sein oder aus der Synapse transportiert werden. Interessant ist auch, dass Piccolo neben CtBP1/BARS50 auch das ADP-Ribosylierungs-Faktor-GTP-Aktivierungs-Protein (ARFGAP) GIT1 bindet (Kim et al. 2003). Zudem konnte

von Kim et al. (2003) gezeigt werden, dass GIT1 in der CAZ der Präsynapse Homo- und Heterodimere bilden und so neben Piccolo noch weitere Bindungspartner binden kann. Einer dieser Bindungspartner ist β -PIX. Für β -PIX ist bekannt, dass es PAK1 bindet und so PAK1 an GIT1 verankert, was es wiederum PAK1 erlaubt GIT1 und sich selbst zu phosphorylieren. Diese Phosphorylierungen haben wiederum eine Aktivierung von PAK1 zur Folge, welche es PAK1 erlaubt seine Zielproteine zu phosphorylieren und so einen Einfluss auf deren Funktionen zu nehmen (Zhao et al., 2006). So spielt die Bindung von PAK1 an GIT1 eine mögliche Rolle bei der Phosphorylierung von CtBP1/BARS50. Andererseits ist auch vorstellbar, dass die Phosphorylierung von GIT1 eine Bindung von GIT1 mit CtBP1/BARS50 zur Folge hat und das somit GIT1 mit seiner ARFGAP-Funktion an der synaptischen Endo- oder Exozytose beteiligt ist. So konnte von Yang et al. (2005) gezeigt werden, dass CtBP1/BARS50 durch die Bindung an das ARFGAP1 an der Abschnürung der COPI-Vesikel vom *cis*-Golgi-Apparat beteiligt ist. Gegen eine direkte Bindung von CtBP1/BARS50 an den GIT1-Dimer-Komplex spricht allerdings, dass bei einer Immunpräzipitation von Synaptosomen-Material mit Piccolo-Antikörpern kein CtBP1/BARS50 oder PAK1 im Präzipitat nachgewiesen werden konnte (Kim et al., 2003). Um eine mögliche synaptische Phosphorylierung von CtBP1/BARS50 durch PAK1 zu untersuchen, sollte in einem ersten Schritt ein Phosphorylierungs-spezifischer Antikörper generiert werden und wenn möglich biochemisch und immunocytochemisch untersucht werden. In einem zweiten Schritt könnten CtBP1/BARS50-PAK1-Phosphorylierungsmutanten (Liberali et al., 2008) generiert werden und deren Lokalisation ebenfalls in immunocytochemischen Analysen von hippokampalen Primärkulturneuronen untersucht werden. Diese beiden Methoden könnten dann einen ersten Hinweis auf eine synaptische CtBP1/BARS50-Phosphorylierung durch PAK1 geben. In weiteren Experimenten könnte dann der Einfluss dieser Phosphorylierung auf die präsynaptische Exo- und Endozytose untersucht werden. Aufgrund der hohen Homologie der PAK-Proteine (93%) und ihrer weit verbreiteten Expression (Kreis and Barnier, 2009), kann zudem an konventionellen chemischen Synapsen eine Phosphorylierung von CtBP1/BARS50 durch andere PAK-Mitglieder nicht ausgeschlossen werden.

Ein weiterer möglicher Kandidat für eine synaptische Phosphorylierung von CtBP1/BARS50 ist die AKT1-Kinase. Diese Phosphorylierung um Threonin-176 in CtBP1-L markiert CtBP1/BARS50 für eine Poly-Ubiquitinierung, was zu einem Abbau des Proteins führt (Merrill et al., 2010). Wie in dem Artikel von Merrill und Kollegen (2010) beschrieben, wird die AKT1-Kinase an der Plasmamembran aktiviert und wandert dann in Richtung des Zellkerns, wo sie unter anderem als Kinase für CtBP1/BARS fungiert. Möglicherweise bindet und phosphoryliert AKT1 CtBP1/BARS50 auch an der Plasmamembran der Präsynapse und vermittelt so nach bestimmten zellulären Signalen, z. B. veränderter synaptischer Aktivität,

einen Abbau von synaptischen CtBP1/BARS50. Zu beachten ist allerdings, dass die AKT1-Kinase erst durch die SUMO-E3-Ligase PC2 (sumoyliert u. a. auch CtBP1/BARS50) an CtBP1/BARS50 gebunden werden muss, damit sie CtBP1/BARS50 phosphorylieren kann. Bisher ist eine Lokalisation von PC2 an der Präsynapse jedoch noch nicht beschrieben worden und auch eher unwahrscheinlich. Möglicherweise können aber auch andere SUMO-E2- und -E3-Ligasen das AKT1-Protein an CtBP1/BARS50 rekrutieren. Allerdings sind im Gegensatz zur Postsynapse (Scheschonka et al., 2007) für die Präsynapse noch keine SUMO-Ligasen identifiziert wurden.

Neben der Phosphorylierung spielt die SUMOylierung ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Lokalisations- und Funktions-Änderung der CtBP1/BARS50-Proteine. Allerdings wurde bis jetzt für CtBP1/BARS50 nur eine nukleäre und cytosolische SUMOylierung beschrieben (Lin et al., 2003; Kagey et al., 2003; Corda et al., 2006). Bei den von mir durchgeführten 2D-gelelektrophoretischen Analysen detektiert der CtBP1-L-Antikörper in der Zellkern-Fraktion neben den erwarteten Punkten bei einem MW von ~50 kDa, weitere Punkte bei einem MW von ~60 kDa und pIs von 4,5-5,0. In der Synaptosomen-Fraktion detektiert der Antikörper ebenfalls bei ~60 kDa und ähnlichem pI mehrere schwache Punkte. Da SUMO1 ein kalkuliertes MW von 11,11 kDa hat, könnte es sich bei den vom CtBP1-L-Antikörper detektierten Punkten bei ~60 kDa möglicherweise um ein Dimer aus CtBP1/BARS50 und SUMO1 handeln. Dagegen spricht, dass Martin et al. (2007) zeigen konnten, dass in Hirnhomogenaten ohne Zugabe des *Cystein Protease Inhibitors* NEM die SUMOylierung der Kainat-Rezeptor-Untereinheit GluR6 sehr instabil ist und schnell wieder entfernt wird (Martin et al., 2007). Entsprechend würde auch die SUMOylierung der CtBP1-L-Isoform in Gegenwart von SDS und reduzierenden Agenzien vermutlich nicht stabil sein.

Auch detektiert der monoklonale CtBP1/BARS50-Antikörper in beiden Fraktionen bei einem MW von ~60 kDa keine weiteren Punkte. Somit ist davon auszugehen, dass es sich bei den vom CtBP1-L-Antikörper detektierten Spots bei einem MW von ~60 kDa um ein unspezifisches Signal des Antikörpers handelt.

Da aber durchaus eine synaptische SUMOylierung von CtBP1/BARS50 vorstellbar ist, sollte zur weiteren Klärung mit NEM in-kubiertes Synaptosomen-Material mit dem CtBP1-L-Antikörper biochemisch untersucht werden. Des Weiteren könnte mit Hilfe einer Immunpräzipitation von NEM in-kubiertem Synaptosomen-Material mit einem SUMO1-Antikörper eine Bindung von SUMO1 an synaptisches CtBP1/BARS50 nachgewiesen werden. Falls sich eine synaptische SUMOylierung von CtBP1/BARS50 bestätigen sollte, wirft das die Frage auf, welchen Einfluss dies auf die Lokalisation und Funktion von CtBP1/BARS50 hat. Aufgrund der bereits vorhandenen Daten ist dabei vorstellbar, dass eine synaptische SUMOylierung von CtBP1/BARS50 dessen retrograden Transport von der

Synapse zum Zellkern zur Folge hat. Somit würde eine synaptische SUMOylierung zur Funktion von CtBP1/BARS50 als synaptisches Signalmolekül beitragen.

4.2.3.2 CtBP2 ist ein synaptisches Protein, dass möglicherweise an der präsynaptischen Endocytose oder der Kommunikation von der Synapse zum Zellkern beteiligt ist

Die Identifizierung von CtBP2 in gereinigten Synaptosomen-Material (Abschnitt 3.1.2), im Neuropil der Molekularschicht des Kleinhirn-Cortex und in geringerem Maße ebenfalls im Moosfasertrakt des Hippokampus und des zerebralen Cortex (Abschnitt 3.1.4.1) war unerwartet und entsprach nicht der bisher gezeigten exklusiv nukleären Lokalisation von CtBP2 (tom Dieck et al., 2005). Trotzdem konnte die synaptische CtBP2-Lokalisation durch eine teilweise Ko-Lokalisation der CtBP2-Immunreaktivität mit der Immunreaktivität eines Antikörpers gegen das CAZ-Protein Bassoon in hippokampalen Primärkulturneuronen bestätigt werden (Abschnitt 3.1.6.3). Auch zeigten die immun-elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abschnitt 3.1.6.1) eine Lokalisation des dunklen Peroxidase-Produkts des CtBP2/RIBEYE-Antikörpers in enger Nähe zur CAZ in der präsynaptischen Endigung. Die biochemischen Analysen der Homogenat- und P2-Fractionen einzelner Maushirnareale (Abschnitt 3.1.4.2) zeigen zudem eine stärkere CtBP2-Immunreaktivität in den synaptischen Fractionen des Kleinhirns und des Bulbus olfactorius, verglichen mit den anderen untersuchten Hirnarealen. Dieses Ergebnis bestätigt die immunhistochemischen Daten aus Abschnitt 3.1.4.1. Gleichzeitig deuten die quantitativen Immun-Westernblots der Zellkern- und Synaptosomen-Fractionen des Cortex und des Cerebellums (Abschnitt 3.1.5.2) darauf hin, dass die verstärkte synaptische CtBP2-Immunreaktivität im Kleinhirn nicht auf einem verstärkten Transport zu den Synapsen beruht, sondern durch die sehr hohe Expressionsrate von CtBP2 in diesem Hirnareal zu erklären ist.

Des Weiteren zeigen die quantitativen Immun-Westernblots (Abschnitt 3.1.5.1), dass in neuronalen Zellen CtBP2, genau wie CtBP1/BARS50, eine duale Lokalisation an Zellkernen und Synapsen aufweist. Auch konnte erstmals eine unterschiedliche subzelluläre Verteilung der beiden CtBP2-Isoformen, CtBP2 und CtBP2-S, beschrieben werden. So ist die kürzere Isoform CtBP2-S, der die ersten 25 N-terminalen Aminosäuren inklusive des NLS-Motivs fehlen, vor allem synaptisch lokalisiert. Wie bereits beschrieben, ist die lange CtBP2-Isoform dagegen hauptsächlich im Zellkern angereichert. Diese unterschiedliche subzelluläre Verteilung beider CtBP2-Isoformen konnte des Weiteren mit Hilfe immuncytochemischer Analysen überexprimierten EGFP-CtBP2-Konstrukte (Abschnitt 3.1.7.2) bestätigt werden. Diese zeigen ebenfalls eine synaptische Lokalisation des überexprimierten EGFP-CtBP2-S-Konstrukts, wohingegen das EGFP-CtBP2-Konstrukt hauptsächlich in den Zellkern transfizierter Neurone transportiert wird.

Unklar ist allerdings, wie CtBP2-S an die Synapse transportiert wird. Aufgrund der hohen Homologie der CtBP-Proteinfamilie und der Fähigkeit von CtBP2 ebenfalls Bassoon zu binden (tom Dieck et al., 2005) ist aber wahrscheinlich, dass CtBP2-S ein Bestandteil der PTVs ist und so an die sich entwickelnde Synapse transportiert wird. Zur Überprüfung einer Lokalisation von CtBP2-S an PTVs sollten biochemische Untersuchungen von leichten Membranen-Fractionen und immunocytochemische Untersuchungen von jungen Hippokampus-Primärkulturneuronen (Div 3-7) mit CtBP2-, Bassoon- und Piccolo-Antikörpern durchgeführt werden.

Des Weiteren ist die synaptische Funktion von CtBP2-S völlig unklar.

Zum einen deuten die immun-elektronenmikroskopischen Aufnahmen möglicherweise eine Lokalisation der CtBP2-Proteine am Rand der CAZ, möglicherweise in der periaktiven Zone, an. Die periaktive Zone der Präsynapse ist der Bereich, indem die synaptischen Vesikel-Membranen nach der Exozytose wieder endozytiert werden (Haucke et al., 2011). Diese Lokalisation deutet somit möglicherweise auf eine Funktion von CtBP2-S bei der Vesikel-Membran-Endozytose oder der molekularen Kopplung der Exo- und Endozytose hin. Dabei ist aufgrund der Tatsache, dass die synaptische Endozytose zu großen Teilen durch Clathrin und Dynamin und deren Bindungspartner vermittelt wird (Haucke et al., 2011) eine direkte Funktion von CtBP2-S bei der Endozytose eher unwahrscheinlich. Trotzdem ist eine durch die Bindung an Piccolo und Bassoon vermittelte Beteiligung von CtBP2-S an der molekularen Verbindung der Exo- und Endozytose vorstellbar. In weiteren Untersuchungen sollte eine direkte Interaktion von Bassoon und Piccolo mit CtBP2-S durch Pulldown-Experimente mit gereinigten GST-CtBP2-S- und GST-Bassoon oder Piccolo-Fusionsproteinen nachgewiesen werden. Zudem sollte mit Hilfe von immunocytochemischen Analysen eine mögliche Lokalisation von CtBP2-S an der periaktiven Zone überprüft werden. Es wird angenommen, dass die spezifische Regulation der Genexpression für die Prozesse der synaptischen Plastizität benötigt werden (West and Greenberg, 2011) und dass die Kommunikation der Synapsen mit dem somatischen Zellkern durch spezifische Signalmoleküle, die von den Synapsen retrograd ins Soma zum Zellkern transportiert werden, gewährleistet wird (Jordan and Kreutz, 2009, Ch'ng and Martin, 2011). Zudem sind die Mitglieder der CtBP-Proteinfamilie in der Transkriptions-Repression der Wnt- und TGF- β /BMP-Signalwege (Brannon et al., 1999, Izutsu et al., 2001) beteiligt, welche entscheidenden Einfluss auf die Synaptogenese und die synaptische Plastizität in Neuronen haben (Inestrosa and Arenas, 2010, Kriegstein et al., 2011). Möglicherweise deutet die hier gezeigte nukleäre und synaptische Lokalisation von CtBP2-S somit auch auf eine Funktion von CtBP2-Proteinen als Synapsen-Zellkern-Signalmolekül hin.

Zudem ist anzunehmen, dass auch CtBP2-S, genau wie CtBP1/BARS50, das Substrat synaptischer Phosphorylierungen ist. Auch hier ist PAK1 als Haupt-Kandidat zu nennen, da

das PAK1-Phosphorylierungsmotiv auch in der CtBP2-Proteinfamilie konserviert ist. Die in Abschnitt 4.2.3.1 beschriebenen weiteren Experimente zur Aufklärung einer synaptischen Phosphorylierung durch PAK1 sollten also auch auf die CtBP2-S Isoform ausgeweitet werden. Dazu würde eine 2D-gelelektrophoretische Analyse der CtBP2-Isoformen in der Zellkern- und Synaptosomen-Fraktion weitere Hinweise auf möglicherweise Synapsenspezifische posttranslationale Modifikationen geben.

Interessant ist auch die Frage, ob CtBP2-S ebenfalls ein Bestandteil der Bandsynapsen ist. Die Überprüfung dieser Hypothese ist allerdings schwierig, da die beiden zur Verfügung stehenden CtBP2/RIBEYE-Antikörper immer auch RIBEYE erkennen würden. Gleichzeitig ist die Herstellung eines CtBP2-S-spezifischen Antikörpers nicht möglich, da sich das CtBP2-S-Protein außer den fehlenden ersten 25 N-terminalen Aminosäuren nicht von der CtBP2-Isoform unterscheidet. Einen ersten Hinweis auf eine CtBP2-Lokalisation an den Bandsynapsen der Retina könnte allerdings mit der Expression des EGFP-markierten CtBP2-S-Konstrukts in organotypischen-Kulturen und einer Immunpräzipitation von Bandsynapsen-Material mit einem Bassoon- oder CtBP2-Antikörper gewonnen werden.

4.3 Ausblick

Zusammenfassend zeigt diese Studie ein individuelles Expressionsmuster der CtBP-Proteine, wobei sich die CtBP1/BARS50- und CtBP2-Proteine durch ihr Expressionsniveau in den einzelnen Hirnregionen und ihr räumliches bzw. Zelltyp-spezifisches Expressionsmuster unterscheiden. Des Weiteren zeigen die Untersuchungen der subzellulären Verteilungen der CtBP1/BARS50- und CtBP2-Proteine, dass fast alle bisher identifizierten Mitglieder eine nukleäre und synaptische Lokalisation einnehmen können. Eine Ausnahme stellt die lange CtBP2-Isoform dar, da sie hauptsächlich im Zellkern lokalisiert ist. Für die CtBP2-S-Isoform konnte erstmals eine synaptische Lokalisation im Gehirn und in Zellkultur gezeigt werden, wobei immun-elektronenmikroskopische Aufnahmen eine Lokalisation in der Nähe der CAZ der präsynaptischen Endigung bestätigen. Zudem deutet Vieles auch auf eine Lokalisation von CtBP2-S am somatischen Golgi-Apparat hin. Die hier gewonnenen Daten lassen den Schluss zu, dass die CtBP1-L-, CtBP1-S/BARS50- und CtBP2-S-Isoformen zwischen den Kompartimenten der Zelle transportiert und ausgetauscht werden können. Somit würde die Regulation des interkompartimentellen Transports einen entscheidenden Einfluss auf die verschiedenen Funktionen der CtBP-Proteine ausüben. Aufgrund der hohen Homologie innerhalb CtBP-Proteinfamilie ist zudem davon auszugehen, dass einige der posttranslationalen Mechanismen die an der Regulation des CtBP1/BARS50-Transports innerhalb der Zelle beteiligt sind (Riefler and Firestein, 2001, Barnes et al., 2003, Lin et al., 2003, Corda et al., 2006, Verger et al., 2006) möglicherweise auch bei der Regulation des interkompartimentellen Transports der CtBP2-Proteine mitwirken. In weiteren Untersuchungen sollte der Transport der CtBP2-S-Isoform im Neuron, der Einfluss verschiedener posttranslationaler Modifikationen auf den interkompartimentellen CtBP2-S-Transport und die synaptische CtBP2-S-Funktion untersucht werden. Für die CtBP1/BARS50-Proteine deutet die Lokalisation beider Isoformen an der Synapse möglicherweise auf mehrere synaptische Funktionen hin. So könnten sie u.a. an der Endozytose bzw. der Kopplung der Exo- und Endozytose beteiligt sein, als Redoxsensor oder als retrogrades Signalmolekül fungieren. Diese Arbeit ist der erste Ansatz einer systematischen Analyse der Expression der CtBP-Proteine im gesamten Gehirn und dient dem Verständnis der einzigartigen und überlappenden Funktionen der CtBP-Proteine in Neuronen. Gleichzeitig bildet diese Arbeit die Grundlage für weiterführende Untersuchungen der synaptischen Funktionen und des interkompartimentellen Transports der Mitglieder der CtBP-Proteinfamilie.

5. Literatur

- Achouri Y, Noel G, Van Schaftingen E (2-Keto-4-methylthiobutyrate, an intermediate in the methionine salvage pathway, is a good substrate for CtBP1. *Biochem Biophys Res Commun* 352:903-906.2007).
- Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidman J, Smith J, Struhl K (Current protocols in molecular biology. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, New York.1990).
- Balasubramanian P, Zhao LJ, Chinnadurai G (Nicotinamide adenine dinucleotide stimulates oligomerization, interaction with adenovirus E1A and an intrinsic dehydrogenase activity of CtBP. *FEBS Lett* 537:157-160.2003).
- Banker G, Goslin K (Culturing nerve cells. MIT Press.1998).
- Barnes CJ, Vadlamudi RK, Mishra SK, Jacobson RH, Li F, Kumar R (Functional inactivation of a transcriptional corepressor by a signaling kinase. *Nat Struct Biol* 10:622-628.2003).
- Bergman LM, Morris L, Darley M, Mirnezami AH, Gunatilake SC, Blaydes JP (Role of the unique N-terminal domain of CtBP2 in determining the subcellular localisation of CtBP family proteins. *BMC Cell Biol* 7:35.2006).
- Birnboim HC, Doly J (A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1523.1979).
- Bonazzi M, Spano S, Turacchio G, Cericola C, Valente C, Colanzi A, Kweon HS, Hsu VW, Polishchuck EV, Polishchuck RS, Sallese M, Pulvirenti T, Corda D, Luini A (CtBP3/BARS drives membrane fission in dynamin-independent transport pathways. *Nat Cell Biol* 7:570-580.2005).
- Boyd JM, Subramanian T, Schaeper U, La Regina M, Bayley S, Chinnadurai G (A region in the C-terminus of adenovirus 2/5 E1a protein is required for association with a cellular phosphoprotein and important for the negative modulation of T24-ras mediated transformation, tumorigenesis and metastasis. *EMBO J* 12:469-478.1993).
- Brannon M, Brown JD, Bates R, Kimelman D, Moon RT (XCtBP is a XTcf-3 co-repressor with roles throughout *Xenopus* development. *Development* 126:3159-3170.1999).
- Brose N, Rosenmund C, Rettig J (Regulation of transmitter release by Unc-13 and its homologues. *Curr Opin Neurobiol* 10:303-311.2000).
- Cases-Langhoff C, Voss B, Garner AM, Appeltauer U, Takei K, Kindler S, Veh RW, De Camilli P, Gundelfinger ED, Garner CC (Piccolo, a novel 420 kDa protein associated with the presynaptic cytomatrix. *Eur J Cell Biol* 69:214-223.1996).
- Ch'ng TH, Martin KC (Synapse-to-nucleus signaling. *Curr Opin Neurobiol* 21:345-352.2011).
- Chinnadurai G (CtBP, an unconventional transcriptional corepressor in development and oncogenesis. *Mol Cell* 9:213-224.2002).
- Chinnadurai G (Transcriptional regulation by C-terminal binding proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 39:1593-1607.2007).
- Colanzi A, Hidalgo Carcedo C, Persico A, Cericola C, Turacchio G, Bonazzi M, Luini A, Corda D (The Golgi mitotic checkpoint is controlled by BARS-dependent fission of the Golgi ribbon into separate stacks in G2. *EMBO J* 26:2465-2476.2007).
- Corda D, Colanzi A, Luini A (The multiple activities of CtBP/BARS proteins: the Golgi view. *Trends Cell Biol* 16:167-173.2006).
- Criqui-Filipe P, Ducret C, Maira SM, Wasylyk B (Net, a negative Ras-switchable TCF, contains a second inhibition domain, the CID, that mediates repression through interactions with CtBP and de-acetylation. *EMBO J* 18:3392-3403.1999).
- Dahiya A, Wong S, Gonzalo S, Gavin M, Dean DC (Linking the Rb and polycomb pathways. *Mol Cell* 8:557-569.2001).
- Dammer EB, Sewer MB (Phosphorylation of CtBP1 by cAMP-dependent protein kinase modulates induction of CYP17 by stimulating partnering of CtBP1 and 2. *J Biol Chem* 283:6925-6934.2008).

- De Matteis MA, Di Girolamo M, Colanzi A, Pallas M, Di Tullio G, McDonald LJ, Moss J, Santini G, Bannykh S, Corda D, et al. (Stimulation of endogenous ADP-ribosylation by brefeldin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:1114-1118.1994).
- De Matteis MA, Luini A (Exiting the Golgi complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:273-284.2008).
- Di Girolamo M, Silletta MG, De Matteis MA, Braca A, Colanzi A, Pawlak D, Rasenick MM, Luini A, Corda D (Evidence that the 50-kDa substrate of brefeldin A-dependent ADP-ribosylation binds GTP and is modulated by the G-protein beta gamma subunit complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7065-7069.1995).
- Dick O, tom Dieck S, Altmann WD, Ammermuller J, Weiler R, Garner CC, Gundelfinger ED, Brandstätter JH (The presynaptic active zone protein bassoon is essential for photoreceptor ribbon synapse formation in the retina. *Neuron* 37:775-786.2003).
- Drecktrah D, Chambers K, Racoosin EL, Cluett EB, Gucwa A, Jackson B, Brown WJ (Inhibition of a Golgi complex lysophospholipid acyltransferase induces membrane tubule formation and retrograde trafficking. *Mol Biol Cell* 14:3459-3469.2003).
- Dresbach T, Torres V, Wittenmayer N, Altmann WD, Zamorano P, Zuschratter W, Nawrothki R, Ziv NE, Garner CC, Gundelfinger ED (Assembly of active zone precursor vesicles: obligatory trafficking of presynaptic cytomatrix proteins Bassoon and Piccolo via a trans-Golgi compartment. *J Biol Chem* 281:6038-6047.2006).
- Dunah AW, Hueske E, Wyszynski M, Hoogenraad CC, Jaworski J, Pak DT, Simonetta A, Liu G, Sheng M (LAR receptor protein tyrosine phosphatases in the development and maintenance of excitatory synapses. *Nat Neurosci* 8:458-467.2005).
- Fjeld CC, Birdsong WT, Goodman RH (Differential binding of NAD⁺ and NADH allows the transcriptional corepressor carboxyl-terminal binding protein to serve as a metabolic sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9202-9207.2003).
- Gallop JL, Butler PJ, McMahon HT (Endophilin and CtBP/BARS are not acyl transferases in endocytosis or Golgi fission. *Nature* 438:675-678.2005).
- Garner CC, Kindler S, Gundelfinger ED (Molecular determinants of presynaptic active zones. *Curr Opin Neurobiol* 10:321-327.2000).
- Garriga-Canut M, Schoenike B, Qazi R, Bergendahl K, Daley TJ, Pfender RM, Morrison JF, Ockuly J, Stafstrom C, Sutula T, Roopra A (2-Deoxy-D-glucose reduces epilepsy progression by NRSF-CtBP-dependent metabolic regulation of chromatin structure. *Nat Neurosci* 9:1382-1387.2006).
- Haucke V, Neher E, Sigrist SJ (Protein scaffolds in the coupling of synaptic exocytosis and endocytosis. *Nat Rev Neurosci* 12:127-138.2011).
- Hidalgo Carcedo C, Bonazzi M, Spano S, Turacchio G, Colanzi A, Luini A, Corda D (Mitotic Golgi partitioning is driven by the membrane-fissioning protein CtBP3/BARS. *Science* 305:93-96.2004).
- Hildebrand JD, Soriano P (Overlapping and unique roles for C-terminal binding protein 1 (CtBP1) and CtBP2 during mouse development. *Mol Cell Biol* 22:5296-5307.2002).
- Horton AC, Ehlers MD (Dual modes of endoplasmic reticulum-to-Golgi transport in dendrites revealed by live-cell imaging. *J Neurosci* 23:6188-6199.2003).
- Inestrosa NC, Arenas E (Emerging roles of Wnts in the adult nervous system. *Nat Rev Neurosci* 11:77-86.2010).
- Inoue H, Nojima H, Okayama H (High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96:23-28.1990).
- Izutsu K, Kurokawa M, Imai Y, Maki K, Mitani K, Hirai H (The corepressor CtBP interacts with Evi-1 to repress transforming growth factor beta signaling. *Blood* 97:2815-2822.2001).
- Jimenez CR, Huang L, Qiu Y, Burlingame AL (Sample preparation for MALDI mass analysis of peptides and proteins. *Curr Protoc Protein Sci Chapter 16:Unit 16* 13.2001).
- Jordan BA, Kreutz MR (Nucleocytoplasmic protein shuttling: the direct route in synapse-to-nucleus signaling. *Trends Neurosci* 32:392-401.2009).
- Kagey MH, Melhuish TA, Powers SE, Wotton D (Multiple activities contribute to Pc2 E3 function. *EMBO J* 24:108-119.2005).

- Katsanis N, Fisher EM (A novel C-terminal binding protein (CTBP2) is closely related to CTBP1, an adenovirus E1A-binding protein, and maps to human chromosome 21q21.3. *Genomics* 47:294-299.1998).
- Kim S, Ko J, Shin H, Lee JR, Lim C, Han JH, Altmann WD, Garner CC, Gundelfinger ED, Premont RT, Kaang BK, Kim E (The GIT family of proteins forms multimers and associates with the presynaptic cytomatrix protein Piccolo. *J Biol Chem* 278:6291-6300.2003).
- Knoll D (Identifizierung und Charakterisierung von CtBP1/BARS50-Isoformen. Diplomarbeit.2007).
- Koipally J, Georgopoulos K (Ikaros interactions with CtBP reveal a repression mechanism that is independent of histone deacetylase activity. *J Biol Chem* 275:19594-19602.2000).
- Kreis P, Barnier JV (PAK signalling in neuronal physiology. *Cell Signal* 21:384-393.2009).
- Kriegstein K, Zheng F, Unsicker K, Alzheimer C (More than being protective: functional roles for TGF-beta/activin signaling pathways at central synapses. *Trends Neurosci* 34:421-429.2011).
- Kumar V, Carlson JE, Ohgi KA, Edwards TA, Rose DW, Escalante CR, Rosenfeld MG, Aggarwal AK (Transcription corepressor CtBP is an NAD(+)-regulated dehydrogenase. *Mol Cell* 10:857-869.2002).
- Laemmli UK (Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.1970).
- Lazarevic V (Mechanisms of assembly and activity-dependent remodelling of the presynaptic cytomatrix at the active zone. Doktorarbeit.2009).
- Liberali P, Kakkonen E, Turacchio G, Valente C, Spaar A, Perinetti G, Bockmann RA, Corda D, Colanzi A, Marjomaki V, Luini A (The closure of Pak1-dependent macropinosomes requires the phosphorylation of CtBP1/BARS. *EMBO J* 27:970-981.2008).
- Lin X, Sun B, Liang M, Liang YY, Gast A, Hildebrand J, Brunnicardi FC, Melchior F, Feng XH (Opposed regulation of corepressor CtBP by SUMOylation and PDZ binding. *Mol Cell* 11:1389-1396.2003).
- Martin S, Nishimune A, Mellor JR, Henley JM (SUMOylation regulates kainate-receptor-mediated synaptic transmission. *Nature* 447:321-325.2007).
- Meloni AR, Smith EJ, Nevins JR (A mechanism for Rb/p130-mediated transcription repression involving recruitment of the CtBP corepressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:9574-9579.1999).
- Merrill JC, Kagey MH, Melhuish TA, Powers SE, Zerlanko BJ, Wotton D (Inhibition of CtBP1 activity by Akt-mediated phosphorylation. *J Mol Biol* 398:657-671.2010).
- Nakamura N (Emerging new roles of GM130, a cis-Golgi matrix protein, in higher order cell functions. *J Pharmacol Sci* 112:255-264.2010).
- Nardini M, Spano S, Cericola C, Pesce A, Massaro A, Millo E, Luini A, Corda D, Bolognesi M (CtBP/BARS: a dual-function protein involved in transcription co-repression and Golgi membrane fission. *EMBO J* 22:3122-3130.2003).
- Nardini M, Svergun D, Konarev PV, Spano S, Fasano M, Bracco C, Pesce A, Donadini A, Cericola C, Secundo F, Luini A, Corda D, Bolognesi M (The C-terminal domain of the transcriptional corepressor CtBP is intrinsically unstructured. *Protein Sci* 15:1042-1050.2006).
- Ohtsuka T, Takao-Rikitsu E, Inoue E, Inoue M, Takeuchi M, Matsubara K, Deguchi-Tawarada M, Satoh K, Morimoto K, Nakanishi H, Takai Y (Cast: a novel protein of the cytomatrix at the active zone of synapses that forms a ternary complex with RIM1 and munc13-1. *J Cell Biol* 158:577-590.2002).
- Okabe S (Molecular anatomy of the postsynaptic density. *Mol Cell Neurosci* 34:503-518.2007).
- Phillips GR, Huang JK, Wang Y, Tanaka H, Shapiro L, Zhang W, Shan WS, Arndt K, Frank M, Gordon RE, Gawinowicz MA, Zhao Y, Colman DR (The presynaptic particle web: ultrastructure, composition, dissolution, and reconstitution. *Neuron* 32:63-77.2001).

- Piatigorsky J (Dual use of the transcriptional repressor (CtBP2)/ribbon synapse (RIBEYE) gene: how prevalent are multifunctional genes? *Trends Neurosci* 24:555-557.2001).
- Pierce JP, Mayer T, McCarthy JB (Evidence for a satellite secretory pathway in neuronal dendritic spines. *Curr Biol* 11:351-355.2001).
- Popov N, Schmitt M, Schulzeck S, Matthies H ([Reliable micromethod for determination of the protein content in tissue homogenates]. *Acta Biol Med Ger* 34:1441-1446.1975).
- Quinlan KG, Nardini M, Verger A, Francescato P, Yaswen P, Corda D, Bolognesi M, Crossley M (Specific recognition of ZNF217 and other zinc finger proteins at a surface groove of C-terminal binding proteins. *Mol Cell Biol* 26:8159-8172.2006a).
- Quinlan KG, Verger A, Kwok A, Lee SH, Perdomo J, Nardini M, Bolognesi M, Crossley M (Role of the C-terminal binding protein PXDLS motif binding cleft in protein interactions and transcriptional repression. *Mol Cell Biol* 26:8202-8213.2006b).
- Richter K, Langnaese K, Kreutz MR, Olias G, Zhai R, Scheich H, Garner CC, Gundelfinger ED (Presynaptic cytomatrix protein bassoon is localized at both excitatory and inhibitory synapses of rat brain. *J Comp Neurol* 408:437-448.1999).
- Riefler GM, Firestein BL (Binding of neuronal nitric-oxide synthase (nNOS) to carboxyl-terminal-binding protein (CtBP) changes the localization of CtBP from the nucleus to the cytosol: a novel function for targeting by the PDZ domain of nNOS. *J Biol Chem* 276:48262-48268.2001).
- Schaeper U, Boyd JM, Verma S, Uhlmann E, Subramanian T, Chinnadurai G (Molecular cloning and characterization of a cellular phosphoprotein that interacts with a conserved C-terminal domain of adenovirus E1A involved in negative modulation of oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:10467-10471.1995).
- Scheschonka A, Tang Z, Betz H (Sumoylation in neurons: nuclear and synaptic roles? *Trends Neurosci* 30:85-91.2007).
- Schmitz F, Konigstorfer A, Sudhof TC (RIBEYE, a component of synaptic ribbons: a protein's journey through evolution provides insight into synaptic ribbon function. *Neuron* 28:857-872.2000).
- Schoch S, Gundelfinger ED (Molecular organization of the presynaptic active zone. *Cell Tissue Res* 326:379-391.2006).
- Serra-Pages C, Medley QG, Tang M, Hart A, Streuli M (Liprins, a family of LAR transmembrane protein-tyrosine phosphatase-interacting proteins. *J Biol Chem* 273:15611-15620.1998).
- Shi Y, Sawada J, Sui G, Affar el B, Whetstone JR, Lan F, Ogawa H, Luke MP, Nakatani Y (Coordinated histone modifications mediated by a CtBP co-repressor complex. *Nature* 422:735-738.2003).
- Smigielski S (Charakterisierung der Bindung der präsynaptischen Cytomatrixproteine Bassoon und Piccolo an das C-terminale Bindungsprotein 1 und RIBEYE mittels Hefe-zwei-Hybrid-Systems und Affinitätschromatographie. Bachelorarbeit.2005).
- Spano S, Silletta MG, Colanzi A, Alberti S, Fiucci G, Valente C, Fusella A, Salmona M, Mironov A, Luini A, Corda D (Molecular cloning and functional characterization of brefeldin A-ADP-ribosylated substrate. A novel protein involved in the maintenance of the Golgi structure. *J Biol Chem* 274:17705-17710.1999).
- tom Dieck S, Altmann WD, Kessels MM, Qualmann B, Regus H, Brauner D, Fejtova A, Bracko O, Gundelfinger ED, Brandstätter JH (Molecular dissection of the photoreceptor ribbon synapse: physical interaction of Bassoon and RIBEYE is essential for the assembly of the ribbon complex. *J Cell Biol* 168:825-836.2005).
- tom Dieck S, Sanmarti-Vila L, Langnaese K, Richter K, Kindler S, Soyke A, Wex H, Smalla KH, Kampf U, Franzer JT, Stumm M, Garner CC, Gundelfinger ED (Bassoon, a novel zinc-finger CAG/glutamine-repeat protein selectively localized at the active zone of presynaptic nerve terminals. *J Cell Biol* 142:499-509.1998).
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350-4354.1979).

- Turner J, Crossley M (The CtBP family: enigmatic and enzymatic transcriptional co-repressors. *Bioessays* 23:683-690.2001).
- Verger A, Quinlan KG, Crofts LA, Spano S, Corda D, Kable EP, Braet F, Crossley M (Mechanisms directing the nuclear localization of the CtBP family proteins. *Mol Cell Biol* 26:4882-4894.2006).
- Wang X, Kibschull M, Laue MM, Lichte B, Petrasch-Parwez E, Kilimann MW (Aczonin, a 550-kD putative scaffolding protein of presynaptic active zones, shares homology regions with Rim and Bassoon and binds profilin. *J Cell Biol* 147:151-162.1999).
- Wang Y, Liu X, Biederer T, Sudhof TC (A family of RIM-binding proteins regulated by alternative splicing: Implications for the genesis of synaptic active zones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:14464-14469.2002).
- Wang Y, Okamoto M, Schmitz F, Hofmann K, Sudhof TC (Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion. *Nature* 388:593-598.1997).
- Wang Y, Sugita S, Sudhof TC (The RIM/NIM family of neuronal C2 domain proteins. Interactions with Rab3 and a new class of Src homology 3 domain proteins. *J Biol Chem* 275:20033-20044.2000).
- Weigert R, Silletta MG, Spano S, Turacchio G, Cericola C, Colanzi A, Senatore S, Mancini R, Polishchuk EV, Salmona M, Facchiano F, Burger KN, Mironov A, Luini A, Corda D (CtBP/BARS induces fission of Golgi membranes by acylating lysophosphatidic acid. *Nature* 402:429-433.1999).
- West AE, Greenberg ME (Neuronal activity-regulated gene transcription in synapse development and cognitive function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.2011).
- Yang JS, Lee SY, Spano S, Gad H, Zhang L, Nie Z, Bonazzi M, Corda D, Luini A, Hsu VW (A role for BARS at the fission step of COPI vesicle formation from Golgi membrane. *EMBO J* 24:4133-4143.2005).
- Zhai RG, Bellen HJ (The architecture of the active zone in the presynaptic nerve terminal. *Physiology (Bethesda)* 19:262-270.2004).
- Zhai RG, Vardinon-Friedman H, Cases-Langhoff C, Becker B, Gundelfinger ED, Ziv NE, Garner CC (Assembling the presynaptic active zone: a characterization of an active one precursor vesicle. *Neuron* 29:131-143.2001).
- Zhang Q, Nottke A, Goodman RH (Homeodomain-interacting protein kinase-2 mediates CtBP phosphorylation and degradation in UV-triggered apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:2802-2807.2005).
- Zhang Q, Piston DW, Goodman RH (Regulation of corepressor function by nuclear NADH. *Science* 295:1895-1897.2002).
- Zhang Q, Yoshimatsu Y, Hildebrand J, Frisch SM, Goodman RH (Homeodomain interacting protein kinase 2 promotes apoptosis by downregulating the transcriptional corepressor CtBP. *Cell* 115:177-186.2003).
- Zhao LJ, Subramanian T, Zhou Y, Chinnadurai G (Acetylation by p300 regulates nuclear localization and function of the transcriptional corepressor CtBP2. *J Biol Chem* 281:4183-4189.2006).

6. Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
2D	Zweidimensional
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AraC	1- [®] -D-Arabinofuranosylcytosin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	base pair(s)
BSA	bovine serum albumin
BFA	Brefeldin A
CAZ	Cytomatrix der aktiven Zone
CtBP	C-terminales Bindungsprotein
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid
div	days in vitro
D-MEM	Dulbecco's modified eagle medium
DNA	desoxyribonucleic acid
DNase	Desoxyribonuclease
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERGIC	reticulum-to-Golgi intermediate compartment
FKS	fetales Kälberserum
GFP	grünfluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HB	Homogenisations-Puffer
h/min/sec	Stunde/Minute/Sekunde
HBSS	Hank's balanced salt solution
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IgG	Immunoglobulin G
IP	Immunpräzipitation

K	Kaninchen
Kb	kilo base pairs
kDa	Kilo Dalton
LPAAT	Lysophosphatidsäuren-Acetyltransferase
LPA	Lysophosphatidsäure
M	Maus
Ms	Meerschweinchen
M	molar
mM	millimolar
MW	Molekulargewicht
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamid Dinucleotid
NBD	NAD ⁺ /NADH-Bindungsdomäne
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
nNOS	Neuronale Stickstoffmonoxid Synthase
PAK	p21-aktivierte Kinase 1
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PA	Phosphatidsäure
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PSD	postsynaptische Dichte
POD	Peroxidase
PTV	Piccolo/Bassoon-Transport-Vesikel
rpm	Umdrehungen pro Minute
RNA	ribonucleic acid
RNase	Ribonuclease
RT	Raumtemperatur
SBD	Substrat-Bindungsdomäne
SDS	sodium dodecyl sulfate
SUMO	Small Ubiquitin-like Modifier
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
UE	Untereinheit
U	unit(s)
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent

7. Erklärung zur eigenständigen Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation zum Thema

“Untersuchungen der räumlichen Expression und subzellulären Lokalisation von CtBP1/BARS50- und CtBP2-Isoformen im adulten Nagerhirn

selbständig verfasst, nicht schon als Dissertation verwendet habe und die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben wurden.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) an anderen Einrichtungen eingereicht habe.

Magdeburg, 18.06.2012.

Diana Hübler

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Diana Hübler (geb. Knoll)

Geburtstag: 21.12.1982

Geburtsort: Magdeburg

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet

Eltern: Uwe Knoll

Sylvia Knoll geb. Simon

Ehemann: André Hübler

Kinder: Jack Hübler, geb. 25.03.2009

Schulbildung: 1995 - Juli 2002

Humboldt Gymnasium, Magdeburg, Abitur

Studium: Oktober 2002 - 2004

Studium der Biologie an der technischen Universität CAROLO-WILHELMINA zu Braunschweig, Vordiplom-Biologie

Oktober 2004-2007

Hauptstudium der Biologie (Neurobiologie) an der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg, Diplom

Oktober 2006 - Juni 2007

Diplomarbeit am Leibniz-Institut für Neurobiologie, in der Abteilung Neurochemie & Molekularbiologie

Oktober 2007 - Oktober 2011

Anfertigung der Promotion am Leibniz-Institut für Neurobiologie, in der Abteilung Neurochemie & Molekularbiologie in Magdeburg

Magdeburg, den 18.06.2012

Diana Hübler

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

In Druck befindliche Arbeit

Hübler D*, Rankovic M*, Richter K, Altrock W, Lazarevic V, Fischer KD, Gundelfinger E, Feltova A (2012) Differential spatial expression and subcellular localization of CtBP family members in rodent brain. *PLoS ONE*

* geteilte Erstautorenschaft