

**Zell-spezifische, metabolische Markierung von
neu synthetisierten Proteinen
in einem Neuron-Glia-Netzwerk**

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 Anke Müller
geb. am 9. November 1980 in Potsdam

Gutachter:

Prof. Dr. D.C. Dieterich

Prof. Dr. J. Trotter

Eingereicht am 7. Juni 2012
Verteidigt am 6. Dezember 2012

Danksagung

Diese hier vorgestellte Arbeit entstand in den Jahren 2008-2012 am Leibniz Institut für Neurobiologie in Magdeburg in der Forschergruppe *Neuralomics*.

Ein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Daniela Dieterich, die mir die Möglichkeit gegeben hat dieses wunderbare Projekt zu bearbeiten und mich durch hilfreiche Anregungen und Diskussionen, durch die fast grenzenlose Bereitstellung experimenteller Mittel und nicht zuletzt durch die immerwährende Begeisterungsfähigkeit und den ewigen Optimismus fortwährend unterstützt hat.

Ein weiteres, großes Dankeschön gebührt dem LIN und der Abteilung Neurochemie unter der Leitung von Prof. Eckart Gundelfinger. Viele hilfreiche Hände und wissende Köpfe haben die Arbeit deutlich erleichtert. Ein Dank gebührt der Bereitstellung von allen notwendigen Einrichtungen, Gerätschaften, der exzellenten Organisation des Laborbetriebes und der Administration. Auch die Seminare und die vielen Vorträge haben die wissenschaftliche Arbeit im Besonderen bereichert.

Christine Freitag möchte ich besonders für die Zusammenarbeit an dem GINCAT- Projekt danken.

Ein herzliches Dankeschön geht an die Arbeitsgruppe. Besonderer Dank geht an Peter für die ständige Unterstützung, für Ratschläge zu fehlgeschlagenen Experimenten, für die Kritik an „fast“ gelungenen und für die geteilte Freude an geglückten Experimenten. Dem offenen Ohr für alle weiteren Dinge gilt ebenso Dank. Dem Rest der Arbeitsgruppe möchte ich für die unglaublich gute Zusammenarbeit, die Kuchen- und Kaffee-Gelage, den Spaß und manchmal auch den geteilten Frust danken. Besonders Nicole, Ines, Elmer, Anne, Peter, Kathi und Evi haben jeder auf ihre spezielle Weise dazu beigetragen, die Arbeit im Labor mit der ausreichenden Menge an Leichtigkeit zu versehen. Einfach ein echt gutes Team!

Ein Dankeschön gilt auch Rainer Pielot und Michał Kielbiński für die Zusammenarbeit an dem Astroprot-Datenbank-Projekt.

Dr. Karl-Heinz Smalla und Dr. Wolfgang Tischmeier, sowie Katrin Pohlmann, Anne Christin Lehmann und Nicole Reichenbach aus der Arbeitsgruppe *Molekularbiologische Techniken* sowie PD Dr. Thilo Kähne und Yvonne Ducho von der Universität Magdeburg möchte ich für die gute Zusammenarbeit danken.

Ein weiterer Dank im Besonderen geht an Anne, Ines, Evi, Nicole und Nicole, Diana und Ela für ihre Freundschaft, Gesprächsbereitschaft und Aufmunterung, die ab und an nötig war und für die nette Zeit außerhalb des LIN.

Ein ganz besonderer Dank gilt auch meinen Freunden und meiner Familie, die mich nicht vergessen haben und mir immer ein unbeschwertes Wochenende bescherten. Vielen Dank!

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	III
TABELLENVERZEICHNIS	V
ZUSAMMENFASSUNG	VI
ABSTRACT	VII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Das zentrale Nervensystem und die Rolle der Astrozyten	1
1.1.1 Zelluläre Basis für die Funktion des zentralen Nervensystems	1
1.1.2 Synaptische Aktivität und LTP	2
1.1.3 Astrozyten und neuronale Aktivität	3
1.1.4 Astrogläre Adaptation an Änderungen neuronaler Aktivität	5
1.1.5 Astrozyten und ihr Einfluss auf neuronale Entwicklung	7
1.2 Die Analyse Zell-spezifischer Proteinexpression	8
1.2.1 Methodische Ansätze für die Untersuchung Zell-spezifischer Proteinexpression	8
1.2.2 BONCAT, FUNCAT und GINCAT	9
1.2.3 Zielsetzung der Arbeit	12
2 MATERIAL UND METHODEN	14
2.1 Material	14
2.1.1 Chemikalien	14
2.1.2 Primäre Antikörper	14
2.1.3 Sekundäre Antikörper	15
2.1.4 Bakterienmedien	15
2.1.5 Versuchstiere	15
2.1.6 Molekulargewichtsmarker	16
2.1.7 Bakterienstämme	16
2.2 Methoden	16
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	16
2.2.2 Biochemische Methoden	19
2.2.3 Zellbiologische Methoden	26
3 ERGEBNISSE	35
3.1 Modifikation der Methionin-Bindetasche der <i>Mus musculus</i> Methionyl-tRNA-Synthetase	35
3.2 Nachweis von ANL-Integration in neu synthetisierte Proteine durch eine modifizierte MetRS in Hek293T	37
3.3 Optimierung von GINCAT für die Markierung Zell-spezifischer Proteinsynthese	43
3.4 Einfluss von ANL-Integration in neu synthetisierte Proteine auf	50

3.5 Zell-spezifische Expression von LtoGMetRS in GFAP-positiven Astrozyten einer Neuron-Glia-Kokultur	54
3.6 Isolation Zell-spezifischer Proteine mittels Affinitätsreinigung	59
3.7 Stimulation von Neuron-Glia-Kokulturen	62
3.8 „ <i>Bottom-up</i> “-Analyse BDNF-induzierter Proteinsynthese in Astrozyten	66
3.9 Astroprot-Datenbank	70
3.10 Subzelluläre Lokalisierung von Komponenten des Translationsapparates in Astrozyten	72
3.11 Markierung von lokaler Proteinsynthese in Astrozyten	74
3.12 Zell-spezifische Markierung von Ribosomen	78
3.13 Aufreinigung neu synthetisierter, sekretierter Proteine	83
4 DISKUSSION	88
4.1 BDNF-Stimulation erhöht astrogläre Proteinneusynthese in Neuron-Glia-Kokulturen	89
4.2 Ein Aminosäureaustausch in der MetRS ermöglicht die Aktivierung von ANL und eine metabolische Markierung neu synthetisierter Proteine	91
4.3 GINCAT erlaubt die metabolische Markierung astroglärer Proteine in einer Neuron-Glia-Kokultur	94
4.4 GINCAT: Möglichkeiten und Grenzen für die Analyse des astroglären Proteoms	95
4.5 Die Astroprot-Datenbank organisiert Informationen über das astrogläre Proteom	97
4.6 Etablierung Zell-spezifischer Marker für die Untersuchung lokaler Proteinsynthese in Astrozyten	97
4.7 Ausblick	101
5 LITERATUR	103
6 ANHANG	111
6.1 Abkürzungsverzeichnis	111
6.2 Verwendete Primer für Klonierungen	113
6.3 Vektoren und cDNA-Expressionskonstrukte	115
6.4 Struktur der Alkin-Sonden	116
6.5 Proteine/mRNA mit veränderter Expression nach BDNF-Stimulation	117
6.6 Massenspektrometrie Ergebnis GINCAT	132
6.7 Massenspektrometrie Ergebnisse sekretierte Proteine	141
Curriculum Vitae	147
Publikationen	148

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Das Modell der Trisynapse	S. 5
Abb. 1.2:	Plastische Prozesse in Astrozyten	S. 7
Abb. 1.3:	BONCAT, FUNCAT und GINCAT	S. 11
Abb. 3.1:	Modifikation der Methionin-Bindetasche von <i>Mus musculus</i> MetRS	S. 36
Abb. 3.2:	Nachweis von ANL-Einbau in neu synthetisierte Proteine durch BONCAT	S. 39
Abb. 3.3:	Nachweis von ANL-Einbau in neu synthetisierte Proteine durch FUNCAT	S. 40
Abb. 3.4:	Nachweis von ANL-Integration in Proteine durch Massenspektrometrie	S. 42
Abb. 3.5:	Optimierung der ANL-Konzentration	S. 45
Abb. 3.6:	Markierungseffizienz des Fusionsproteins EGFP _{LtoG} MetRS und L _{toG} MetRSEGFP	S. 44
Abb. 3.7:	Analyse der Markierungseigenschaften von AHA in neuronaler Zellkultur	S. 47
Abb. 3.8:	ANL Markierung für eine <i>in vivo</i> -Applikation von GINCAT	S. 49
Abb. 3.9:	Vitalität von Hek293T-Zellen und Neuronen nach ANL-Markierung	S. 51
Abb. 3.10:	Protein <i>Turnover</i> in Hek293T nach ANL Integration	S. 53
Abb. 3.11:	GFAP-Promoter für Astrozyten-spezifische Expression von Transgenen	S. 55
Abb. 3.12:	Zell-spezifische Expression der EGFP _{LtoG} MetRS in GFAP-positiven Astrozyten	S. 58
Abb. 3.13:	Aufreinigung ANL-markierter Proteine für die Massenspektrometrie	S. 61
Abb. 3.14:	Änderung der Proteinneusyntheserate durch Modulation neuronaler Aktivität in Neuronen	S. 63
Abb. 3.15	Änderung der Proteinneusyntheserate durch Modulation neuronaler Aktivität in Astrozyten	S. 65
Abb. 3.16:	Analyse von Kandidatenproteinen nach BDNF-Stimulation mittels Immunzytochemie	S. 67
Abb. 3.17:	Connexin-43 Expression nach BDNF-Stimulation	S. 69
Abb. 3.18:	Oberfläche der Astroprot-Datenbank	S. 71
Abb. 3.19:	Nachweis von Komponenten des Translationapparates in Fortsätzen der Astrozyten	S. 73
Abb. 3.20:	Ezrin-vermittelte EGFP-Lokalisation in Hek293T-Filopodia	S. 76
Abb. 3.21:	Markierung der Proteinneusynthese mit FermL _{toG} MetRSEGFP	S. 77
Abb. 3.22:	Markierung von Ribosomen durch Integration von RPL27EGFP	S. 80
Abb. 3.23:	Zell-spezifische Markierung von Ribosomen in Astrozyten	S. 82
Abb.: 3.24	BONCAT von extrazellulären Proteinen aus Astrozyten	S. 83
Abb. 3.25:	Nachweis von AHA-markierten, extrazellulären Proteinen aus Astrozyten-	

	Monokultur mittels Boncat	S. 85
Abb. 3.26:	Nachweis von extrazellulären Proteinen in Astrozyten	S. 86

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1:	Identifizierung neu synthetisierter, sekretierter Proteine aus Astrozyten	S. 84
Tabelle 6.1:	Primer für die Vektor-Klonierungen	S. 125
Tabelle 6.2:	Expressionsvektoren	S. 127
Tabelle 6.3:	Verwendete cDNA-Konstrukte	S. 127
Tabelle 6.4:	Verwendte Vektoren für den lentiviralen Gentransfer	S. 128
Tabelle 6.5:	Proteine/mRNA mit veränderter Expression nach BDNF-Stimulation	S. 129
Tabelle 6.6:	Massenspektrometrie GINCAT – CNTR	S. 145
Tabelle 6.7	Massenspektrometrie GINCAT – BDNF-Stimulation	S. 152
Tabelle 6.8	Massenspektrometrie Ergebnisse sekretierte Proteine	S. 157

Zusammenfassung

Die chemische Synapse erlaubt nicht nur eine Weiterleitung elektrischer Signale, sondern stellt durch die Fähigkeit diese Reizweiterleitung zu modulieren, die zelluläre Grundlage für Lernprozesse dar. Dabei kann die Adaptation der synaptischen Stärke auch durch die Interaktion mit Astrozyten an der sogenannten Trisynapse beeinflusst werden. Inwiefern Astrozyten sich durch plastische Mechanismen langfristig an veränderte neuronale Aktivität anpassen, ist jedoch nur unzureichend verstanden.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Etablierung von GINCAT (*Genetically introduced non-canonical amino acid tagging*) und erste Anwendungen dieser Methode im Kontext der Neuron-Astrozyten-Interaktion. GINCAT erlaubt dabei eine Markierung von Proteinsynthese mit Hilfe der nicht-kanonischen Aminosäure Azidonorleucin (ANL).

In dieser Arbeit konnte eine modifizierte Version der *Mus musculus* Methionyl-tRNA-Synthetase (MetRS), die LtoGMetRS, generiert werden, die in der Lage ist, auf Grund der Erweiterung der Methionin-Bindetasche ANL zu metabolisieren. Dabei ist die Integration von ANL in neu synthetisierte Proteine spezifisch für Zellen, die dieses Enzym exprimieren und kann sowohl direkt über Massenspektrometrie als auch indirekt über FUNCAT und BONCAT nachgewiesen werden. Eine Optimierung von GINCAT und die weitere Etablierung der Methode für verschiedene Applikationen zeigen vielseitige experimentelle Anwendungsmöglichkeiten auf. Eine Übertragung dieser Technik auf Astrozyten gelang über ein lentivirales Gentransfersystem und die Zell-spezifische Expression der LtoGMetRS über einen GFAP-Promoter erlaubt die ANL-Markierung von Proteinneusynthese in Astrozyten eines Neuron-Glia-Kokultur-Modells. Dabei ermöglicht die Verwendung verschiedenster Alkin-Sonden in der Klick-Reaktion eine Visualisierung ANL-markierter Proteine über biochemische oder Fluoreszenz-basierte Methoden und erlaubt so die qualitative und quantitative Analyse von Proteinneusynthese sowie die Identifizierung von ANL-markierten Proteinen über Massenspektrometrie. GINCAT stellt somit eine neue Methode dar, die eine Analyse von Proteinsynthese spezifisch in Astrozyten als Antwort auf veränderte neuronale Aktivität ermöglicht.

Weitere experimentelle Methoden wurden in ersten Ansätzen etabliert, die als Ergänzung zu GINCAT fungieren. So enthält die Astroprot-Datenbank bereits publizierte Daten über das astrogläre Proteom oder Transkriptom und bietet eine Basis für eine Verifizierung des zellulären Ursprungs von Proteinen. Eine Lokalisation der LtoGMetRS zu astroglären Filopodia über die Ferm-Domäne von Ezrin unterstützt zukünftig die Untersuchung lokaler Proteinsynthese des astroglären Teils der Trisynapse. Weiterhin erlaubt die Markierung von Ribosomen über RPL27EGFP die Analyse von Dynamiken und die Lokalisation der markierten Ribosomen spezifisch in Astrozyten.

Abstract

Chemical synapses enable not only the transfer of action potentials from one neuron to another, but by modulating the synaptic strength they also provide a basis for plastic processes like learning and memory. At the tripartite synapse astrocytes are able to influence synaptic strength by direct or indirect interaction with the pre- and postsynaptic site. In how far astrocytes on the other hand adapt stably to changes of neuronal activity is mostly unknown.

The notion, that astrocytic protein expression indeed can be influenced by neuronal activity is provided by a BDNF stimulation of a heterologous cell culture system, in which GFAP-positive cells show an increase in new protein synthesis that depends on the presence of neurons in the culture.

To investigate changes of the astrocytic proteome as a response to neuronal activity, we established a new method called GINCAT (genetically introduced non canonical amino acid tagging). GINCAT enables a cell-selective labeling of newly synthesized proteins using the non-canonical amino acid azidonorleucine (ANL). Integration of ANL into newly synthesized proteins requires the expression of a mutated *Mus musculus* methionyl-tRNA-synthetase (MetRS). A single amino acid exchange L274G (LtoGMetRS) enlarges the methionine-binding pocket and allows the activation of ANL and the subsequent utilisation in protein synthesis. That ANL is specifically integrated into proteins of cells expressing EGFPLtoGMetRS can be confirmed either by visualisation of the azide group within ANL using fluorescence or biotin tags in click-reaction, or by mass spectrometry. No toxic effects and no influence on the protein-turnover rate were detected, when ANL is incorporated into proteins. An additional characterisation and optimisation of this method makes GINCAT applicable for a future analysis of cell specific dynamics in protein expression and supports the use in different experimental designs.

In order to investigate changes of the astrocytic proteome in response to neuronal activity, we generated a lentiviral gene transfer system that enables the expression of the LtoGMetRS specifically in GFAP positive astrocytes. ANL integration is found in GFAP-positive cells expressing LtoGMetRS and newly synthesized proteins that are labeled with ANL can be isolated and analysed by mass spectrometry using a biotin tag in click-reaction.

Additional experimental approaches support the investigation of changes in astroglial protein expression. A database containing already published information about the astrocytic proteome can be used to confirm the cellular origin of proteins. A localisation of the LtoGMetRS to astrocytic filopodia might enable a future analysis of local protein synthesis close to the synaptic site. Moreover, the successful labeling of astrocytic ribosomes with a fluorescence tag might unravel ribosome dynamics in astrocytes in response to neuronal activity.

1 Einleitung

1.1 Das zentrale Nervensystem und die Rolle der Astrozyten

1.1.1 Zelluläre Basis für die Funktion des zentralen Nervensystems

Eine der ambitioniertesten wissenschaftlichen Forschungsprojekte ist es, die Funktion von dem zu verstehen, was nicht nur Motorik, Sprache und Emotionen eines Menschen steuert, sondern ihn auch in die Lage versetzt *Hamlet* zu schreiben oder das Auto zu erfinden: das Gehirn. Diese enorme Vielseitigkeit wird durch hoch spezialisierte Zellen, den Neuronen und den Gliazellen, realisiert. Neurone zeichnen sich morphologisch durch ihre starke Verzweigung und den bipolaren Aufbau in Dendriten und Axone aus. Über hoch spezialisierte Kontaktpunkte zwischen zwei Neuronen, den Synapsen, erfolgt dabei die Weiterleitung von Informationen, die in Form von elektrischen und chemischen Signalen kodiert sind. Die elektrischen Signale werden an den Dornfortsätzen der Dendriten (*dendritic Spines*) initiiert und über das Axon teilweise über weite Distanzen transportiert, bis sie an der Synapse prozessiert und interzellulär weitergegeben werden. Dabei bilden im menschlichen zentralen Nervensystem über 100 Milliarden Nervenzellen ca. 100 Billionen Synapsen aus.

Neben den Neuronen stellen die Gliazellen einen weiteren Zelltyp dar, der für die Funktion des zentralen Nervensystems unabdingbar ist. Zur Gruppe der Gliazellen zählt man Mikroglia, die weitgehend für die Immunabwehr im zentralen Nervensystem (ZNS) zuständig sind sowie die Oligodendrozyten, die hauptsächlich für die Isolation von neuronalen Axonen und somit für die schnelle Weiterleitung von Aktionspotentialen ausschlaggebend sind, aber auch unterstützende Funktionen in neuronaler Entwicklung und Aufrechterhaltung der neuronalen Vitalität ausüben. Den weitaus größten Anteil der Gliazellen bilden jedoch die Astrozyten oder auch Astroglia. Diese Zellen weisen eine Vielzahl von Funktionen auf. So unterstützen sie Neurone beispielsweise während der Entwicklung und der Innervation der Axone in Zielregionen, sie regulieren die Ionenzusammensetzung des extrazellulären Milieus, bilden zum Teil die Blut-Hirn-Schranke aus und unterstützen Stoffwechselforgänge von Neuronen. Diese diversen Funktionen werden zum Teil durch unterschiedliche Subtypen von Astrozyten übernommen. So werden Astroglia klassisch in radiale Gliazellen, fibröse und protoplastische Astrozyten unterteilt. Radiale Gliazellen, zu denen Bergmann-Glia des Zerebellums oder die Müller-Zellen der Retina gezählt werden, weisen typische radiale Fortsätze auf, die sich durch die Zellschichten des ZNS ziehen. Diese Zellen haben spezifische Funktionen und fungieren in der Entwicklung und zum Teil im adulten Nervensystem als Stammzellen für die Generierung von Neuronen und Gliazellen. Fibröse Gliazellen hingegen zeichnen sich durch eine starke Verzweigung aus und sind in der weißen Substanz zu finden, während protoplastische Astrozyten nur wenig verzweigt sind und in der grauen Substanz anzutreffen sind. Doch nicht nur auf morphologischer Ebene lassen sich Unterschiede feststellen. So findet sich eine starke Diversität dieser Zellen bezüglich ihrer physiologischen Eigenschaften,

ihrer Reaktion auf extrazelluläre Stimuli und ihrer molekularen Zusammensetzung (Zhang und Barres, 2010). Diese Diversität ermöglicht die Ausführung einer Vielzahl verschiedenster Funktionen der Astrozyten im ZNS (Freeman, 2010).

1.1.2 Synaptische Aktivität und LTP

Die Synapse stellt die Schnittstelle für die Übertragung von Information zwischen benachbarten Neuronen dar und wird klassisch aus einer präsynaptischen und einer postsynaptischen Endigung aufgebaut.

An der chemischen Synapse werden die elektrischen Signale, die sogenannten Aktionspotentiale, mit Hilfe von chemischen Botenstoffen, den Neurotransmittern, interzellulär übertragen. Hierbei kommt es bei Ankunft von Aktionspotentialen im präsynaptischen Teil der Synapse über kalziumvermittelte Exozytose zur Fusion von präsynaptischen Vesikeln in der aktiven Zone und zur Ausschüttung von Neurotransmittern. Die in einem hochkomplexen, molekularen Netzwerk der Postsynapse eingebetteten Rezeptoren sind in der Lage diese Botenstoffe wahrzunehmen. Die Aktivierung der Rezeptoren induziert im Folgenden sekundäre Signaltransduktionssysteme oder löst direkt einen Influx von Ionen aus und erlaubt so die Weiterleitung des Signals. Neben der Weitergabe von elektrischen Signalen ermöglicht dieses hochkomplexe System aus subzellulären Strukturen und molekularen Netzwerken eine Einflussnahme verschiedenster Signalsysteme auf die Stärke des übertragenden Signals an Schnittstellen sowohl auf präsynaptischer als auch auf postsynaptischer Seite der Synapse. Diese Integration von zusätzlicher Information erlaubt die Modulierung der übertragenden Signalstärke und trägt so entscheidend zur Funktion der Synapse bei. Auf Grund der vielseitigen Interaktion verschiedenster Zelltypen untereinander und des hochkomplexen Zusammenspiels der Signalkaskaden an der Synapse ist bis heute unverstanden, wie solch kognitive Fähigkeiten, wie Lernen und Gedächtnis ermöglicht werden können.

Durch die Leistung Eric Kandels und vieler anderer Neurowissenschaftler konnte man jedoch Modelle aufstellen, die die Fähigkeiten zum Lernen und der Bildung eines Gedächtnisses auf zellulärer Ebene beschreiben. Essenziell ist dabei die Langzeitpotenzierung (LTP) der neuronalen Synapse. Tritt dabei wiederholt eine Erhöhung der Reizstärke auf, wird über die Aktivierung von sekundären Signaltransduktionswegen die Synapse über einen längeren Zeitraum verstärkt und erleichtert so die Signalübertragung bei erneuter neuronaler Aktivität. Auch die Reduktion von neuronaler Aktivität durch die Modulation der synaptischen Stärke, auch als Langzeitdepression (LTD) bezeichnet, trägt zum Feintuning der neuronalen Aktivität bei. Der bei LTP beobachtbaren erhöhten Sensibilität der Synapse für neuronale Aktivität liegen verschiedene molekulare Prozesse zu Grunde. So führt beispielsweise die Integration von AMPA-Rezeptoren in die Membran der postsynaptischen Seite zu einem erhöhten Ladungsinflux bei der Ausschüttung des Neurotransmitters Glutamat, so dass der

Schwellenwert für die Auslösung eines Aktionspotentials verringert wird (Park *et al.*, 2004). Dabei kann man bei der Langzeitpotenzierung einer Synapse eine frühe Phase (E-LTP), die auf der Modifikation und Translokation von Proteinen basiert und bis zu einer Stunde andauert, und eine späte Phase (L-LTP), die mehrere Tage andauern kann, unterscheiden (Malenka und Bear, 2004). Maßgeblich für die Stabilität der Verstärkung der Synapse in L-LTP ist die Abhängigkeit von Proteinneusynthese (Kelleher *et al.*, 2004). Jedoch ist bis heute nur unzureichend verstanden wie Proteinneusynthese die Potenzierung von Synapsen unterstützt und nur wenige Proteine, wie z.B. Arc, konnten bisher identifiziert werden, die als Reaktion auf erhöhte neuronale Aktivität neu synthetisiert werden und durch die Organisation des Zytoskeletts eine aktive Rolle in der Verstärkung der neuronalen Synapse übernehmen (Messaoudi *et al.*, 2007).

Zusätzlich zur Proteinneusynthese, die von der Transkription entsprechender mRNA abhängig ist, häufen sich Hinweise, dass auch eine lokale Proteinneusynthese durch synaptische Aktivität in dendritischen Spines induziert werden kann. Eine lokale Bereitstellung von neu synthetisierten Proteinen kann so als rapide Antwort aktive Synapsen unterstützen (Sutton und Schuman, 2006). Die lokale Proteinneusynthese stützt sich dabei auf einen lokalen, reduzierten Proteintranslationsapparat, der mRNA, regulatorische Proteine und Polyribosomen zur Verfügung stellt und somit nicht auf die Induktion von Genexpression und damit auf lange Transportwege von mRNA aus dem Zellkern angewiesen ist. Die dabei lokal vorliegende mRNA erlaubt die Synthese einer beschränkten Zahl von Proteinen, darunter beispielsweise Arc, α CamKII oder das Neurotrophin BDNF (Tongiorgi *et al.*, 2004; Burgin *et al.*, 1990; Lyford *et al.*, 1995). Auf Grund der räumlich begrenzten Proteinsynthese ist es somit möglich, vereinzelte, aktive Synapsen initial zu markieren oder zu stabilisieren und so eine Langzeitpotenzierung dieser Synapsen zu unterstützen.

Die verschiedenen molekularen Prozesse, die aus Genexpressions-abhängigen und -unabhängigen Mechanismen bestehen und im Zusammenspiel zu einer Stabilisierung einer aktivierten Synapse führen, beschränken sich, soweit hier beschrieben, auf die neuronale prä- und postsynaptische Seite der Synapse. In den letzten Jahren verdichteten sich jedoch die experimentellen Hinweise, die zusätzlich einen Einfluss der Astrozyten auf die neuronale Aktivität und die Modulierung synaptischer Stärke beschreiben.

1.1.3 Astrozyten und neuronale Aktivität

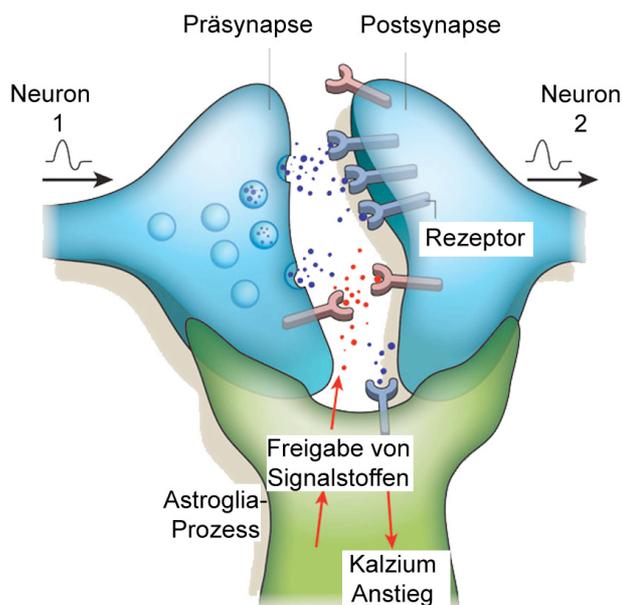
Astrozyten sind neben den Neuronen die am häufigsten anzutreffenden Zellen im zentralen Nervensystem. Die Wahrnehmung, dass Astrozyten lediglich eine unterstützende Funktion für Neurone darstellen, hat sich in den letzten Jahren weitgehend geändert, so dass diesen Zellen auch in ihrer Rolle als Modulatoren neuronaler Aktivität größeres Interesse entgegen gebracht wird.

Frühe Studien zeigten bereits deutlich die stark verzweigte Morphologie der Astrozyten in der grauen Substanz des vertebralen zentralen Nervensystems. Diese Zellen bilden feine Prozesse aus, die häufig nicht nur direkten Kontakt zu Synapsen herstellen sondern diese regelrecht umschließen, wie das beispielsweise im Zerebellum bei den Bergmann-Glia zu beobachten ist (Grosche *et al.*, 2002; Witcher *et al.*, 2007). Dass diese Kontakte zwischen Astrozyten und den neuronalen Schaltstellen funktionelle Rollen übernehmen, machten Studien deutlich, in denen die Kalzium-abhängige Aktivierung von gliären, intrazellulären Signalkaskaden durch eine Applikation neuronaler Signalmoleküle hervorgerufen wurde. Neuronale Botenstoffe, die einen Effekt auf Astrozyten zeigen, schließen z.B. Glutamat, *Gamma-aminobutyric acid* (GABA) oder Acetylcholin mit ein (Perea and Araque, 2005; Araque *et al.*, 2002). Tatsächlich weisen Astrozyten eine Reihe von Rezeptoren für neuronale Transmitter und Signalmoleküle auf, die teilweise auch in den feinen Fortsätzen gefunden wurden (Porter and McCarthy, 1997). Zudem belegen *in vivo*-Studien den Einfluss von neuronalen Botenstoffen auf die Aktivierung zellulärer Signalkaskaden durch den beobachtbaren Influx von Kalzium in Astrozyten. Dabei ist anzunehmen, dass eine Erhöhung von intrazellulärem Kalzium zum Teil lokal auf sogenannte Mikrodomänen begrenzt ist, wie das in Bergmann-Glia beobachtet wurde (Grosche *et al.*, 2002). Somit scheint es möglich, dass auch eine potentielle physiologische Antwort der Gliazellen auf eine Subpopulation von aktiven Synapsen beschränkt ist und sich funktionelle Anpassungen auf diese Synapsen fokussieren.

Tatsächlich sind Astrozyten nicht nur in der Lage neuronale Aktivität wahrzunehmen, sondern sie sekretieren auch molekulare Botenstoffe, sogenannte Gliotransmitter. Darunter finden sich sowohl Signalmoleküle, wie ATP und Adenosin, D-Serin, Glutamat, sowie Cytokine, wie TNFalpha, die zum Teil auch als Antwort auf Änderungen der neuronalen Aktivität sekretiert und von Neuronen detektiert werden und so modulierend auf neuronale Aktivität und Entwicklung wirken können (Theodosis *et al.*, 2008). Die Möglichkeit neuronale Botenstoffe wahrzunehmen und zum Teil aktivitätsabhängig wiederum Gliotransmitter auszuschütten, weist darauf hin, dass Astrozyten und Neurone bidirektional kommunizieren und sich beide Zelltypen funktionell beeinflussen können.

Auf Basis der räumlichen Nähe von Astrozyten-Fortsätzen zu neuronalen Synapsen und der Kommunikation zwischen Neuronen und Astrozyten über neuronale Transmitter und Gliotransmitter wurde ein erweitertes Modell der chemischen Synapse, die Trisynapse, die zusätzlich zur neuronalen Prä- und Postsynapse astrogläre Fortsätze mit einschließt, entwickelt (Abb. 1.1).

Wie bedeutend der Einfluss der Astrozyten an der Trisynapse auf die neuronale Signaltransduktion ist, ist jedoch bisher nur in Ansätzen analysiert und verstanden.



Allen und Barres, 2009; modifiziert

Abb. 1.1: Das Modell der Trisynapse

Dieses erweiterte Modell einer chemischen Synapse, die Kommunikation zwischen zwei Neuronen über die Ausschüttung von chemischen Botenstoffen, so genannten neuronalen Transmittern, erlaubt, integriert Fortsätze der Astrozyten. Diese können durch Rezeptoren für neuronale Transmitter, ähnlich wie die Postsynapse, neuronale Aktivität wahrnehmen. Dabei modulieren Astrozyten zum Teil durch die Sekretion von chemischen Botenstoffen, den Gliotransmittern, oder durch strukturelle Anpassungen die neuronale Aktivität. Dies macht Astrozyten zu einem wichtigen Partner bei der Signalübertragung im neuronalen Nervensystem.

Bislang konnte für einige Gliotransmitter ein transienter Einfluss auf neuronale Aktivität gezeigt werden. Beispielsweise führt die Ausschüttung von astroglärem Glutamat zu einer Erhöhung der neuronalen Erregbarkeit über eine Aktivierung von NMDA-Rezeptoren in CA1-hippokampalen Pyramidalneuronen oder einer Erhöhung synaptischer Vesikelexocytose durch die Aktivierung des metabotropen Glutamat-Rezeptors (mGluRI) (Angulo *et al.*, 2004; Fellin *et al.*, 2004; Perea und Araque, 2007). Auch die Ausschüttung von D-Serin durch Astrozyten erhöht die synaptische Aktivität durch die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren und erleichtert so z.B. die Induktion von LTP an der CA1-Synapse im Hippokampus (Yang *et al.*, 2003; Henneberger *et al.*, 2010). Auf Grund der bereits vorgenommenen Studien lässt sich vermuten, dass Astrozyten eine Rolle in der Modulation synaptischer Aktivität ausüben und so nicht nur kurzzeitige Anpassungen der Synapsen an veränderte Bedingungen unterstützen sondern auch die Stabilität der Synapse bei Prozessen, wie LTP oder LTD modulieren.

1.1.4 Astrogläre Adaptation an Änderungen neuronaler Aktivität

Inwiefern die teilweise durch neuronale Aktivität ausgelöste, Astrozyten-vermittelte Signaltransduktion neuronale Aktivität modulieren kann, ist Schwerpunkt vieler Studien und unterstreicht die komplexe Regulation der Stabilisierung neuronaler Synapsen in der neuronalen Entwicklung oder in der synaptischen Plastizität. Beschreibungen über mögliche Änderungen astroglärer Funktionen als eine Antwort auf neuronale Aktivität, beschränken sich jedoch bisher weitgehend auf morphologische Studien und die möglichen molekularen Abläufe sind weitgehend unverstanden. Dass sich die Aktivität der Astrozyten an kurzzeitige oder auch langzeitige Änderungen neuronaler Aktivität strukturell und funktionell anpasst, würde ebenso die neuronale Effizienz der Synapse beeinflussen und stellt so eine weitere Möglichkeit dar,

die Stabilisierung aktiver Synapsen zu unterstützen. So zeigen Astrozyten strukturelle Anpassungen an Änderungen der neuronalen Aktivität durch die Extension oder Retraktion gliärer Fortsätze an der Synapse und sind so in der Lage, beispielsweise die Neurotransmitterkonzentration durch die Anwesenheit gliärer Transporter zu modulieren (Jones *et al.*, 1996). Diese morphologischen Anpassungen ermöglichen weiterhin die Konzentration der Gliotransmitter an der Synapse, wie dies für D-Serin im *Nucleus supraopticus* des Hypothalamus bereits belegt werden konnte (Panatier und Oliet, 2006). Zusätzlich zu morphologischen Anpassungen verdichten sich die Hinweise darauf, dass auch plastische Prozesse, ähnlich wie die neuronale Langzeitpotenzierung in Gliazellen, ebenfalls stattfinden. So zeigen Makroglia-ähnliche NG2-Zellen, die das Chondroitin-Proteoglykan NG2 exprimieren und im Hippokampus neuronale Innervation aufweisen, eine Potenzierung des exzitatorischen, postsynaptischen Landungsinflusses (EPSC) nach tetanischer, präsynaptischer Stimulation der Neuron-Glia-Synapse (Ge *et al.*, 2006). Aber auch eine Erhöhung der Frequenz des Kalzium-Influx in Astrozyten von Neuron-Glia-Kokulturen ließ sich beispielsweise beobachten, wenn die Astrozyten wiederholt mit Glutamat stimuliert wurden. Dieser Effekt war selbst bei einem einstündigen Intervall zwischen zwei Glutamat-Pulsen nachweisbar. Diese Experimente weisen auf die Existenz von strukturellen und funktionellen Anpassungen der Astrozyten als Antwort auf neuronale Aktivität hin und deuten darauf, dass diese Anpassungen zusätzlich über einen längeren Zeitraum stabil bleiben (Abb.:1.2), (Pasti *et al.*, 1995).

Hinweise darauf, dass sich neuronale Aktivität auch auf die Expression astroglärer Proteine auswirkt, zeigte beispielsweise die Expression des extrazellulären Matrixproteins Sparc, die durch neuronale Aktivität erhöht wird, sowie die Induktion der Expression des astroglären Glutamatrezeptors GLT1 durch den Kontakt mit präsynaptischen Endigungen (Jones *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2009). Anhand dieser Beispiele lässt sich erkennen, dass auch Astrozyten mit molekularen Anpassungen als Antwort auf neuronale Aktivität in Kultur auf molekularer Ebene reagieren und so in die Lage versetzt werden, wiederum den Einfluss auf die synaptische Stärke zu modulieren. Die Entschlüsselung der plastischen Prozesse in Astrozyten auf molekularer Ebene ermöglicht somit ein verbessertes Verständnis für das Zusammenspiel dieser beiden Zelltypen in Prozessen, wie der Langzeitpotenzierung.

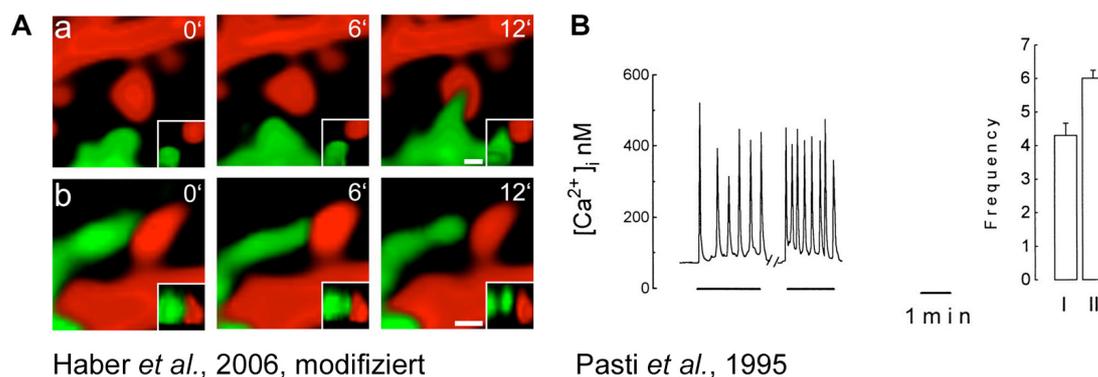


Abb. 2: Plastische Prozesse in Astrozyten

Mikroskopische *time-laps*-Aufnahmen in hippocampalen Schnitten zeigen, dass astrogläre Prozesse (in grün) innerhalb weniger Minuten Kontakt mit dendritischen *Spines* (in rot) aufnehmen (a) oder den Kontakt verlieren (b) und verdeutlichen so die hohe Motilität der astroglären Fortsätze (Haber *et al.*, 2006) (A).

Plastische Anpassungen der Astrozyten an Änderungen neuronaler Aktivität können auch über einen längeren Zeitraum stabil bleiben. So löst eine initiale Applikation von Glutamat eine Kalzium-Oszillation in Astrozyten, die in Kokultur mit Neuronen gehalten werden, aus (Pasti *et al.*, 1995). Eine wiederholte Stimulation mit 20 μ M Glutamat erhöht die Frequenz der Kalzium-Oszillation selbst noch mit einem einstündigen Zeitintervall zwischen den einzelnen Glutamat-Pulsen (B).

1.1.5 Astrozyten und ihr Einfluss auf neuronale Entwicklung

Astrozyten nehmen neben der Unterstützung neuronaler Vitalität bei der Aufrechterhaltung eine wichtige Rolle bei der Formation und der Funktion von neuronalen Synapsen ein. Dies wird anhand von Studien der Synaptogenese mit retinalen Ganglienzellen (RGC) verdeutlicht, die in Abwesenheit von Gliazellen kultiviert wurden. Dabei lässt sich eine Zunahme der synaptischen Aktivität und der Zahl der neuronalen Synapsen beobachten, wenn die Zellen mit Astrozyten kokultiviert wurden oder die Neurone in Anwesenheit von Astroglia-konditioniertem Medium gehalten wurden (Ullian *et al.*, 2001). Dieser Einfluss scheint über Signale vermittelt zu werden, die einen direkten Kontakt mit Neuronen erfordern, wie z.B. EphrinA3, das nach Interaktion mit dem neuronalen Rezeptor EphA4 die Morphologie der Postsynapse moduliert (Murai *et al.*, 2003). Auch sekretierte Signalstoffe beeinflussen die neuronale Synaptogenese. So konnte durch die Erhöhung der Zahl der exzitatorischen Synapsen eine Zunahme der synaptischen Aktivität in RGC-Kulturen beobachtet werden (Nägler *et al.*, 2001; Ullian *et al.*, 2001). Auch die Synaptogenese GABAerger Synapsen sowie die Entwicklung inhibitorischer Neurone *in vitro* kann durch Astrozyten über direkten Kontakt oder indirekt über sekretierte Botenstoffe beeinflusst werden (Hughes *et al.*, 2010). Mögliche astrogläre, sekretierte Signale, die die Entwicklung von Synapsen positiv beeinflussen, sind beispielsweise Thrombospondin 1 und 2, Glykoproteine, die nach Zugabe zu RGC-Kulturen zu einer deutlichen Erhöhung funktionsfähiger Synapsen führten (Christopherson *et al.*, 2005). Dass die neuronale Synaptogenese auch *in vivo* durch den direkten und indirekten Kontakt

von Astrozyten beeinflusst wird, untermauert beispielsweise *Knock-out*-Modelle von Thrombosponin 1 und 2, deren Neurone eine deutlich geringere Zahl an exzitatorischen Synapsen aufweisen (Christopherson *et al.*, 2005). Zusätzlich beeinflussen auch Proteine der extrazellulären Matrix, wie Sparc, die in Abhängigkeit von neuronaler Aktivität von Astrozyten exprimiert und sekretiert wird, die Stabilität von AMPA-Rezeptoren der neuronalen Synapse während der Entwicklung. Sparc trägt damit zur Fähigkeit der Astrozyten bei, die synaptische Stärke durch Mechanismen wie LTP zu modulieren (Jones *et al.*, 2011). Ein weiteres Beispiel für den Einfluss von Astrozyten auf die Synaptogenese geht aus einer Studie von Elmariah *et al.* (2005) hervor. Dabei führte auch hier die Kookultivierung von Astrozyten oder die Zugabe von Astrozyten-konditioniertem Medium zu einer Erhöhung der inhibitorischen Synapsen in neuronalen Kulturen. Dennoch ist bisher unverständlich, welche astroglialen Botenstoffe indirekt für die Induktion dieser BDNF-vermittelten Synaptogenese verantwortlich sind.

1.2 Die Analyse Zell-spezifischer Proteinexpression

1.2.1 Methodische Ansätze für die Untersuchung Zell-spezifischer Proteinexpression

Auf Grund der eingeschränkten Verfügbarkeit experimenteller Methoden, die eine Betrachtung der astroglialen Dynamik im neuronalen Netzwerk separat von neuronalen Veränderungen erlauben, zeichnen die bisher gewonnenen Erkenntnisse nur ein unscharfes Bild der plastischen Anpassungen astroglialer Zellen und den daraus resultierenden Änderungen der neuronalen Aktivität im Netzwerk. Mögliche Anpassungen an neuronale Aktivität können strukturelle und funktionelle Änderungen umfassen. Um diese Anpassungsmechanismen und ihre Regulation auf molekularer Ebene zu verstehen, ist ein breiteres Verständnis für das Set an Proteinen notwendig, das in Astrozyten exprimiert wird. Für die Untersuchung der Proteinexpression dieser Zellen unter bestimmten Bedingungen oder zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien helfen neu entwickelte experimentelle Techniken, die den molekularen Bausatz der Astrozyten beschreiben. Ein Ansatz beispielweise verfolgte die Charakterisierung der astroglialen Proteine über die Analyse des Transkriptom und des Proteoms von Astrozyten *in vitro* (Greco *et al.*, 2010). Die dabei häufig in Abwesenheit von Neuronen kultivierten Zellen ermöglichen zwar eine saubere Darstellung von glialen Proteinen, die daraus gewonnenen Erkenntnisse können jedoch nicht immer auf *in vivo*-Situationen übertragen werden. Hier ermöglicht der Einsatz von transgenen Tieren Abhilfe. So können über die Entwicklung verschiedener Gliazell-spezifischer Promotoren Proteine exprimiert werden, die z.B. eine Visualisierung von Astrozyten ermöglichen. Dabei erlaubt die Zell-spezifische Überexpression von EGFP und dessen Derivaten nicht nur die Analyse morphologischer Änderungen, sondern, in Kombination mit Fluoreszenz-basierten Zellseparationstechniken, eine Isolierung von Astrozyten und z.B. eine folgende Analyse des

Transkriptom (Cahoy *et al.*, 2008). Einen weiteren Ansatz verfolgt die *Translating Ribosome Affinity Purification* (TRAP)-Technologie. Dabei ermöglicht die Astrozyt-spezifische Expression einer ribosomalen Untereinheit die Analyse translatierter mRNA, wenn diese zusammen mit der ribosomalen Untereinheit isoliert wird (Doyle *et al.*, 2008). Ein weiterer Vorstoß, der eine Genexpressionsanalyse nahe an der *in vivo*-Situation erlaubt, wurde durch die Transkriptom-Analyse von Oldham *et al.* (2008) unternommen. Dabei ermöglicht ein Vergleich von Genexpressionsanalysen verschiedener Gehirnareale über Korrelation eine Einteilung koexprimierter Gene in einzelne Module. Anschließend lassen sich so anhand von Proteinen, die spezifisch in bestimmten Zelltypen exprimiert werden Module zum Teil zu verschiedenen Zelltypen zuordnen.

Diese Ansätze der Molekularbiologie, Biochemie oder Bioinformatik zeigen vielversprechende Wege auf, mit den gewonnenen Informationen über die Proteinexpression der Astrozyten eine Basis zu schaffen, um weitere Erkenntnisse über die Funktion dieser Zellen im ZNS zu gewinnen. Zusätzlich dazu scheint es durch die Kombination verschiedenster Ansätze möglich, die bereits existierenden Informationen über das Proteom zu komplementieren und so ein an der *in vivo*-Situation orientiertes Bild des Proteinbausatzes der Astrozyten aufzubauen.

Erste Bestrebungen für die Kombination von Zell-spezifischer Proteinanalyse mit chemischer Markierung von neu synthetisierten Proteinen wurden in *Escherichia coli* (*E.-coli*) durchgeführt (Ngo *et al.*, 2009; Abdeljabbar *et al.*, 2009). Auch hier machte man sich die Zell-spezifische Expression eines Transgens zu Nutze und kombinierte dies mit einer neu entwickelten Technik mit dem Namen BONCAT (*Bioorthogonal non-canonical amino acid tagging*), die, ähnlich wie die Aminosäureisotopmarkierung, neu synthetisierte Proteine mit einer chemischen Markierung versieht und so identifizierbar macht (Dieterich *et al.*, 2006).

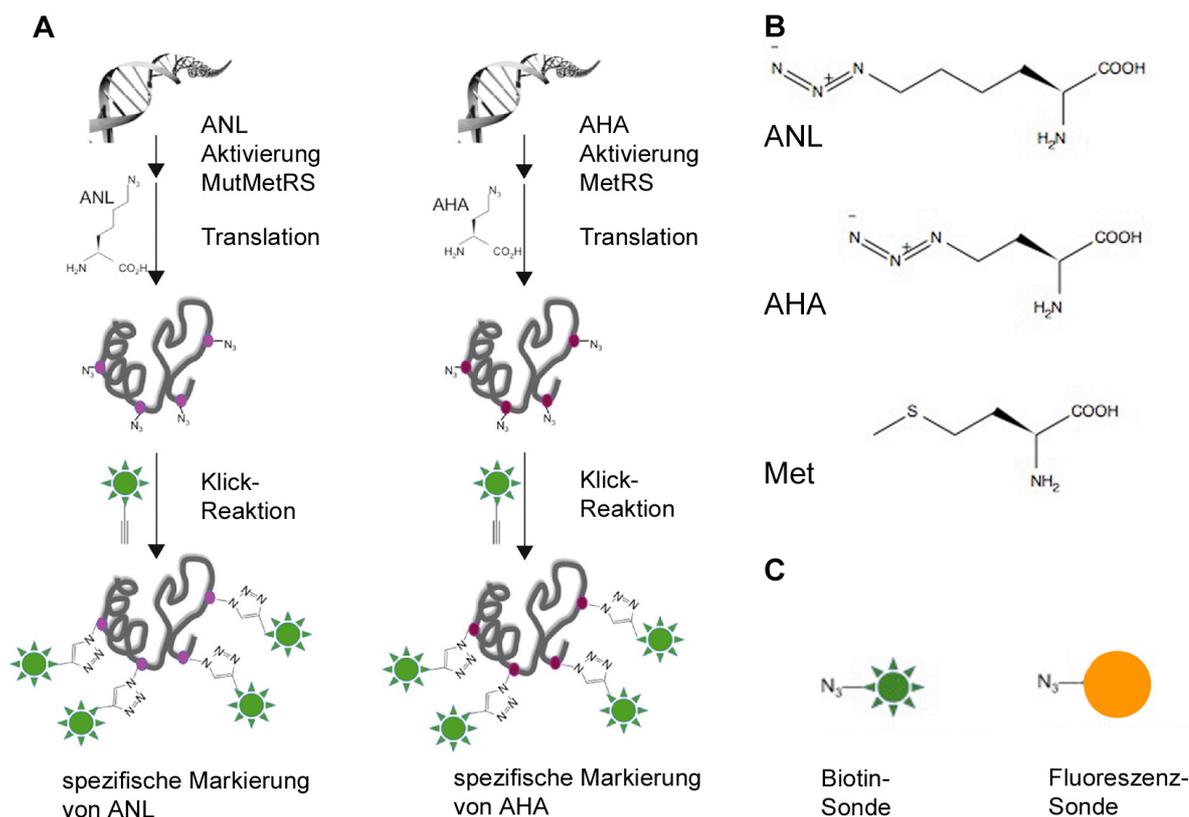
1.2.2 BONCAT, FUNCAT und GINCAT

Um dynamische Änderungen auf Proteinebene zu analysieren, wurde zusätzlich zu den konventionellen Verfahren der Aminosäureisotopmarkierung BONCAT (*Bio-orthogonal non-canonical amino acid tagging*) entwickelt (Abb.: 1.3) (Dieterich *et al.*, 2006). Bei dieser Methode macht man sich die Promiskuität der endogenen Methionyl-tRNA-Synthetase (MetRS) zu Nutze, die neben den natürlichen Aminosäuren auch artifizielle Aminosäuren wie Azidohomoalanin (AHA) oder Homopropargylglyzin (HPG) prozessiert. Diese Methode, anfänglich in *E.-coli* etabliert, lässt sich auch auf eukaryotische Modelle übertragen (Kiick *et al.*, 2002; Dieterich *et al.*, 2006). Dabei fungieren diese nicht-kanonischen Aminosäuren als Surrogat für Methionin und können nach Aktivierung durch die zelleigene MetRS über die endogene Proteinsynthesemaschinerie in neu synthetisierte Proteine eingebaut werden. Die reaktive Azid-oder Alkingruppe dieser Aminosäuren erlaubt mit Hilfe der Kupfer-katalysierten

Azid-Alkin-Cycloaddition die Bindung an eine beliebige Sonde. Bei dieser chemischen Reaktion, auch vereinfacht als Klick-Reaktion bezeichnet, reagiert eine Azidgruppe mit einer terminalen Alkingruppe, katalysiert durch einwertiges Kupfer, zu einer stabilen Triazol-Verbindung. Diese Reaktion zeichnet sich durch hohe Spezifität, Effizienz und weitgehende Unempfindlichkeit gegenüber äußeren Bedingungen aus und macht sie mittlerweile zu einem beliebten Werkzeug für die Markierung von Biomolekülen (Nwe und Brechbiel, 2009).

Mit Hilfe dieser chemischen Reaktion können neu synthetisierte Proteine, die mit AHA markiert sind, mittels Klick-Reaktion mit einer Biotin-Sonde versehen werden, die eine weitere biochemische Analyse und Aufreinigung vereinfacht (Dieterich *et al.*, 2006). In einer Abwandlung dieser Methode, genannt FUNCAT (Fluorescent noncanonical amino acid tagging), wird für die Klick-Reaktion eine Fluoreszenz-Sonde genutzt (Dieterich *et al.*, 2010). Die Verwendung dieser Sonden erlaubt somit die Analyse dynamischer Änderungen in der Proteintranslation auf zellulärer Ebene und ermöglicht nicht nur eine quantitative Einschätzung sondern lässt auch Aussagen über die Verteilung neu synthetisierter Proteine innerhalb der Zelle zu.

Diese Methoden eignen sich, ähnlich wie bei dem Verfahren der Aminosäureisotopmarkierung, dynamische Änderungen der Proteinsynthese zu analysieren, ohne gravierend die Funktion der Zelle zu verändern. Sie zeichnen sich zusätzlich durch den Vorteil aus, über die stabile Bindung an Biotin markierte Proteine aufzukonzentrieren und von nicht markierten Proteinen zu separieren. Damit ist es auch möglich weniger abundante, AHA-markierte Proteine nach einer Affinitätsaufreinigung zu identifizieren. Um eine Änderung der Proteinfunktion nach AHA-Einbau auf Grund der reaktiven Azidgruppe in der Seitenkette von AHA auszuschließen, wurden Kontrollexperimente in eukaryotischen Zellkulturen vorgenommen. Dabei konnten keine toxischen Effekte von AHA auf verschiedene Zellkultursysteme festgestellt werden und auch eine erhöhte Proteindegradation auf Grund von Proteinfehlfaltungen ist nicht erkennbar (Dieterich *et al.*, 2006). Den Nachteil, dass auf Grund der Toxizität des Kupfers die Klick-Reaktion nicht an lebenden Systemen durchgeführt werden kann, lässt sich teilweise über die Verwendung einer DIFO-Sonde (*Difluorinated cyclooctyne*) umgehen (Baskin *et al.*, 2007). Dieses Cyclooctin reagiert mit der Azidgruppe in Abwesenheit von Kupfer, so dass eine Beobachtung von Proteinsynthese von Membranproteinen in lebenden Zellkultursystemen und auch *in vivo* möglich ist. Diese Vorteile machen die Klick-Chemie-basierten Techniken zu wertvollen proteinbiochemischen Werkzeugen, die zum Verständnis von dynamischen Änderungen auf molekularer Ebene beitragen können.



Dieterich D.C. *et al.*, 2010, modifiziert

Abb. 1.3: BONCAT, FUNCAT und GINCAT

Nach Aktivierung der nichtkanonischen Aminosäure Azidohomoalanin (AHA) durch die endogene Methionyl-tRNA-Synthetase (MetRS) kann AHA an Stelle von Methionin in neu synthetisierte Proteine eingebaut werden (A, B). Bei dem BONCAT-Verfahren (*Bioorthogonal non-canonical amino acid tagging*) geht die reaktive Azidogruppe des AHA in der Klick-Reaktion mit der terminalen Alkylgruppe einer Biotin-Sonde eine kovalente Bindung ein, so dass Proteine, die eine AHA-Integration aufweisen, mit einem Biotin-Rest markiert werden. Die Verwendung der Biotin-Sonde erlaubt eine anschließende Aufkonzentrierung und Isolierung markierter Proteine, während eine Fluoreszenz-Sonde bei dem FUNCAT-Verfahren (*Fluorescence-non-canonical amino-acid-tagging*) die direkte Visualisierung von Proteinneusynthese in Zellen ermöglicht (C). Die Expression einer mutierten Form der MetRS erlaubt die Aktivierung von Azidonorleucin (ANL), das ebenso in der Proteinneusynthese Methionin ersetzen kann (A). Das, als GINCAT (*Genetically introduced non-canonical amino-acid-tagging*) bezeichnete Verfahren erlaubt eine spezifische Proteinmarkierung ausschließlich in Zellen, die eine mutierte Form der MetRS mit erweiterter Methionin-Bindetasche exprimieren. Während AHA der Molekülstruktur Methionins ähnelt, weist ANL eine längere Seitenkette auf, so dass die Aktivierung durch die endogene MetRS nicht möglich ist (B).

Eine Abwandlung der BONCAT-Methode, die sich eine weitere nicht-kanonische Aminosäure Azidonorleucin (ANL) zu Nutze macht, erlaubt die Proteinmarkierung spezifisch in Zellen, die eine genetisch veränderte Variante der Methionyl-tRNA-Synthetase exprimieren, da ANL auf Grund der verlängerten Seitenkette als Surrogat für Methionin nicht durch die endogene MetRS aktiviert werden kann (Abb. 1.3, B). Dabei konnten Mutanten der bakteriellen MetRS in *E.-coli* identifiziert werden, die durch eine strukturelle Veränderung der Methionin-Bindetasche

in der Lage waren ANL zu aktivieren. Erste Versuche die Spezifität des ANL-Einbaus zu demonstrieren, wurden von Ngo *et al.*, (2009) unternommen. Dabei wurde ANL in Proteinen von *E.-coli*-Zellen, die Träger der mutierten MetRS sind, nachgewiesen, während in kokultivierten, eukaryotische Zellen kein ANL-Einbau in Proteine erkennbar war (Link *et al.*, 2004; Tanrikulu *et al.*, 2009). Mit Hilfe dieser genetisch veränderten MetRS und einer zielgerichteten Expression, die durch Zell-spezifische oder induzierbare Promotoren erreicht werden kann, ermöglicht GINCAT somit eine spezifische Proteinmarkierung durch ANL in unterschiedlichen Zelltypen und zu definierten Zeitpunkten und erweist sich so als ein vielseitiges Werkzeug für die Zell-spezifische Proteomanalyse.

1.2.3 Zielsetzung der Arbeit

In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass Astrozyten, denen bisher lediglich eine unterstützende Funktion zugedacht wurde, auch eine maßgebliche Rolle in der Modulation von neuronaler Aktivität einnehmen. So nehmen Astrozyten nicht nur neuronale Transmitter wahr sondern üben durch die Ausschüttung von Gliotransmittern zusätzlich einen Einfluss auf neuronale Aktivität aus und sind so in der Lage Prozesse an der Synapse, wie LTP und LTD zu beeinflussen.

Inwiefern sich Astrozyten auf molekularer Ebene den Änderungen synaptischer Aktivität anpassen, ist auf Grund limitierter methodischer Ansätze jedoch nur wenig bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zu entwickeln, die eine Zell-spezifische Markierung von neu synthetisierten Proteinen erlaubt und somit die Aufklärung der Funktion von Astrozyten in der neuronalen Entwicklung und der synaptischen Plastizität zu unterstützen. Diese Methode, die als GINCAT (*Genetically introduced non-canonical amino-acid tagging*) bezeichnet wird, basiert auf den bereits etablierten Techniken BONCAT (Dieterich *et al.*, 2006) und FUNCAT (Dieterich *et al.*, 2010). Dabei sollte die Bindetasche der *Mus musculus* MetRS durch Punktmutation so verändert werden, dass dieses Enzym in der Lage ist Azidonorleucin (ANL) zu metabolisieren. Die Spezifität der Aktivierung von ANL und den Einbau von ANL in neu-synthetisierte Proteine anstelle von Methionin für Zellen, die dieses Enzym exprimieren, sollte experimentell überprüft werden. Im Folgenden waren die Überprüfung von möglichen toxischen Effekten und eine Optimierung der Methode erforderlich. Für eine Analyse des astroglären Proteoms sollte GINCAT über eine Zell-spezifische Expression des modifizierten Enzyms in GFAP-positiven Astrozyten in einer Neuron-Astrozyten-Kokultur etabliert werden. Inwiefern GINCAT für die Untersuchung von neu synthetisierten Proteinen mittels Massenspektrometrie oder eine gezielte Analyse spezifischer Proteine ermöglicht, war ebenfalls Teil dieser Arbeit. Um GINCAT methodisch zu ergänzen sollte eine spezifische Lokalisation des modifizierten Enzyms in den Filopodia der Astrozyten erfolgen, um eine mögliche lokale Proteinneusynthese zu untersuchen. Außerdem wurden erste Ansätze der

Entwicklung einer Datenbank, die bereits beschriebene astrogläre Proteine zusammenfasst, vorgenommen. Diese breite Aufstellung verschiedener Methoden für eine Zell-spezifische Analyse von Proteinexpression ergänzt bereits vorhandene Methoden für die Untersuchung von Plastizitätsprozessen in Astrozyten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die Laborchemikalien wurden von den Herstellern Merck, Roth, Roche, Pierce, Thermo Scientific, Fluka, Invitrogen, Serva oder Sigma-Aldrich bezogen und in der Qualität pro analysis (p.a.) verwendet. Spezielle Chemikalien und Lösungen weiterer Hersteller sind je nach Verwendung im Folgenden beschrieben. Die Lösungen wurden mit bideionisiertem Wasser (TKA-GenPure, TKA) angesetzt. Für zellbiologische und molekularbiologische Arbeiten, sowie für die Klick-Chemie wurde Reinstwasser (Roth) verwendet.

Die künstlichen Aminosäuren AHA und ANL wurden von Frau Dr. rer. nat. Daniela C. Dieterich und Frau Kathrin Hartung nach Link *et al.*, (2007) synthetisiert. Für die Synthese von ANL wurde Boc-Lys-OH anstelle von Boc-Dab (Edukt von AHA) eingesetzt.

2.1.2 Primäre Antikörper

Antikörper	Spezies, Klonalität	Verwendung/ Verdünnung	Firma/Hersteller
Anti-Biotin	Kaninchen, polyklonal	WB: 1:10 000	Bethyl Laboratories
Anti-Biotin	Ziege, polyklonal	WB: 1:10 000	Bethyl Laboratories
Anti-Ubiquitin	Kaninchen, polyklonal	WB: 1:2000	Assay Designs
Anti-Ubiquitin (FK2)	Maus, monoklonal	IP: 1 µg	Assay Designs
Anti-MAP2 (HM-2)	Maus, monoklonal	IF: 1:1000 WB: 1:2000	Sigma-Aldrich
Anti-MAP2	Kaninchen, polyclonal	IF: 1:1000	Abcam
Anti-GFP (ab290)	Kaninchen, polyklonal	IF: 1:2000 WB: 1:10 000	Abcam
Anti-GFP (3E6)	Maus, monoklonal	IF: 1:200	Invitrogen
Anti-GFAP	Huhn, polyklonal	IF: 1:1000 WB: 1:10 000	Abcam
Anti-Fibronektin	Kaninchen, polyklonal	IF: 1:500 WB: 1:1000	Sigma-Aldrich
Anti-SparcL	Ziege, polyklonal	WB: 1:1000	RnD Systems
Anti-MetRS	Kaninchen, polyklonal	IF: 1:200	Abcam
Anti-Ezrin	Kaninchen, polyklonal	IF: 1:200 WB: 1:1000	Abcam
Anti-EAAT2	Kaninchen, polyklonal	IF: 1:500	Abcam
Anti-Connexin-43	Kaninchen, polyklonal	IF: 1:500 WB: 1:5000	Abcam
Anti-GM130	Maus, polyklonal	IF: 1:1000	BD transduction Laboratories
Anti-EIF4E	Kaninchen, polyklonal	IF: 1:200	Abcam
Anti-rRNA (Y10b) 5.8s	Maus, monoklonal	IF: 1:200	Abcam
Anti-S6 (5G10)	Kaninchen, monoklonal	WB: 1:1000	Cell signalling
Anti-Synapsin	Kaninchen, polyklonal	IF: 1:500	Synaptic Systems

Anti-Synaptophysin	Meerschweinchen, polyklonal	IF: 1:2000	Synaptic Systems
Anti-NCAM (0B11)	Maus, monoklonal	WB 1:2500	Sigma-Aldrich

Abkürzungen: WB: Western Blot, IP: Immunpräzipitation; IF: Immunfluoreszenz

2.1.3 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verwendung/ Verdünnung	Firma/ Hersteller
Anti-Huhn IgG, POD-gekoppelt	Ziege	WB: 1:10 000	Dianova
Anti-Huhn IgG, IgG, Dylight 649-gekoppelt	Esel	IF: 1:1000	Jackson IR
Anti-Kaninchen IgG, POD-gekoppelt	Ziege	WB: 1:10000	Jackson IR
Anti-Kaninchen IgG, Cy3-gekoppelt	Esel	IF: 1:2000	Invitrogen
Anti-Kaninchen IgG, Alexa™ 488-gekoppelt	Esel	iF: 1:2000	Invitrogen
Anti-Maus IgG, Alexa™ 488—gekoppelt	Esel	IF: 1:2000	Invitrogen
Anti-Maus IgG, POD-gekoppelt	Ziege	WB: 1:10000	Jackson IR
Anti-Meerschwein IgG, Cy5-gekoppelt	Esel	IF: 1:1000	Jackson IR
Anti-Meerschwein IgG, POD-gekoppelt	Esel	WB: 1:10 000	Jackson IR
Anti-Ziege IgG, Cy3-gekoppelt	Ziege	IF: 1:2000	Jackson IR
Anti-Ziege IgG, POD-gekoppelt	Esel	WB: 1:10000	Jackson IR

Abkürzungen: WB: Western Blot, IP: Immunpräzipitation; IF: Immunfluoreszenz, POD: Peroxydase

2.1.4 Bakterienmedien

Medium	Zusammensetzung
LB-Medium	5 g/l Hefe-Extrakt, 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l NaCl
LB-Platten	15g Agar/1000 ml LB Medium
SOC Medium	20 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefe-Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM Mg ₂ SO ₄ , 10 mM MgCl ₂ , 20 mM Glukose

Die Medien wurden durch Autoklavieren bei 121°C für 15 min sterilisiert. Die Zugabe von Antibiotika und anderen sterilen Zusätzen erfolgte nach Abkühlung der flüssigen Medien, bzw. nach Abkühlung auf 50°C und anschließendem Gießen und Aushärten der Medien in Petrischalen.

2.1.5 Versuchstiere

Für die Präparation von neuronalen glären Primärkulturen wurden Ratten (*Rattus norvegicus*) des Stammes Wistar aus der Hauszuchtung des Magdeburger Leibniz-Institut für Neurobiologie verwendet.

2.1.6 Molekulargewichtsmarker

Produkt	Hersteller
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	Fermentas
Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas
Page Ruler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas

2.1.7 Bakterienstämme

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien und allen anderen Transformationen diente der Bakterienstamm XL10-Gold (Stratagene) mit dem hier aufgelisteten Genotyp:

XI10-Gold: endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tet^R F'[proAB lacI^qZΔM15 Tn10(Tet^R Amy Cm^R)]

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

In dieser Arbeit wurden zum großen Teil Standardmethoden der Molekularbiologie eingesetzt, die ausführlich in der Fachliteratur, wie Molecular Cloning (Sambrook and Maniatis, 1989) und Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., 1990) detailliert aufgeführt sind und somit hier nur kurz beschrieben werden.

2.2.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Phusion DNA Polymerase:	2 U/μl (Finnzymes)
Phusion Puffer:	5x HF Reaction Buffer (Finnzymes)
Oligonukleotide (Primer):	gelöst in ddH₂O, 10μM, Biomers)
Deoxynucleosid-Triphosphat Set:	10 mM (Fermentas)

Für die Subklonierung von cDNA in Expressionsvektoren und für Einführung von gezielten Punktmutationen wurde die entsprechende Template-DNA mittels spezifischer Primer (Tabelle 6.1) im Anhang amplifiziert. Folgende Sequenzen wurden für Klonierungen als Vorlage genutzt: *Mus Musculus* MetRS (NM_001171582.1), *Mus musculus* RPL27 (NM_011289), *Rattus norvegicus* Ezrin (NM_019357). Der 50μl PCR-Ansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen: jew. 0,5 μM Primer, 10-50 ng Plasmid-DNA, einfach konzentrierter Reaktionspuffer, 1 U Polymerase, jeweils 12,5 μM Desoxyribonucleotid-triphosphate d(A, C, G, T)TPs. Die PCR-Reaktion wurde mit dem Eppendorf-Mastercycler Gradient bzw. mit dem TC-3000 G (Techne) durchgeführt. Dabei folgten einem einmaligen 98°C Denaturierungsschritt (2 min) 35 Zyklen Denaturierung (98°C, 30 sek.), Primerbindung (55-60°C, 30 sek, je nach Primersequenz) und cDNA-Elongation (72°C, 0,5 min-2 min, je nach Länge der zu amplifizierenden DNA) und ein abschließender DNA-Elongationsschritt (72°C, 10 min).

Die Basensubstitution erfolgte über zwei PCR-Reaktionen mit für die Einführung der Mutation veränderten Primern. Die in der Sequenz überlappenden PCR-Fragmente wurden im

Folgenden über eine weitere PCR zusammengefügt.

2.2.1.2 Primer-Alignment

2x Annealing- Puffer	200mM NaCl, 100 mM Hepes, pH=7,4
Primer	gelöst in ddH₂O, 10µM (Biomers)
Phosphatase	T4-Polynucleotide Kinase, 10 U/µl (NEB)
Puffer	10x Ligase-Puffer (Fermentas)

Für die Klonierung der lentiviralen Expressionsvektoren wurden zwei zusätzliche Schnittstellen über *Primer-Alignment* in eine vorhandene Schnittstelle im Vektor eingefügt. Für das Zusammenfügen der Primer wurde der Reaktionsansatz von 50 µl, der aus den Primern mit einer Endkonzentration von 5 µM und dem 1x Annealingpuffer bestand, mit dem Eppendorf-*Mastercycler Gradient* für 4 min bei 90°C denaturiert und danach für 10 min bei 70°C inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde anschließend schrittweise um 1°C mit einer Geschwindigkeit von 0.5°C/s auf 4°C abgekühlt. Der Ansatz wurde mit 40 µl reinem Isopropanol versetzt, 10 min bei RT inkubiert und anschließend bei 20 000g für 10 min zentrifugiert. Nach einem erneuten Waschschrift mit 70%igem Ethanol und einem Zentrifugationsschritt von 5 min bei 20 000 g wurde das DNA-Pellet getrocknet und in bideionisiertem Wasser gelöst. Für die Phosphorylierung der Oligos wurde zu den Oligos 10 U T4-PNK und Puffer zugegeben und weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Die Phosphatase wurde bei 65°C inaktiviert und der Ansatz mit dem Eppendorf-*Mastercycler Gradient* schrittweise um 1°C mit einer Geschwindigkeit von 0.3°C/s auf 4°C abgekühlt. Die so gewonnenen Oligonukleotide wurden im Folgenden direkt für die Klonierung weiterverwendet.

2.2.1.3 Restriktion von DNA

Restriktionsenzyme	Fermentas,
Puffer	Fermentas

Alle zum Verdau von cDNA-Fragmenten und Plasmiden verwendeten Restriktionsenzyme wurden nach Herstellerangaben eingesetzt.

2.2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Agarose :	Biozym
1XTAE:	40 mM Tris-Acetate, 1 mM EDTA
Ethidiumbromid-Lösung:	1 mg/ml Roth
6x DNA-Probenpuffer:	30% (Volumenprozent, v) Glycerol, 0,25% (Gewichtsprozent, w) Xylencyanol, 50 mM EDTA, pH8.0

Die Trennung von DNA-Fragmenten für analytische und präparative Zwecke erfolgte anhand der Größe mittels Gelelektrophorese in 0.8-1%igen (w) Agarosegelen und 0,5 µg/ml Ethidiumbromid in 1x TAE-Laufpuffer bei 75 V in *mini sub cell*-Kammern (Biorad). Die Dokumentation erfolgte über UV-Licht-angeregte Fluoreszenz an der Geldokumentationseinheit *Eagle Eye* (Stratagene).

2.2.1.5 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Gelextraktionskit: Nucleo-Spin® Extract II (Macherey Nagel)

Zu extrahierende DNA-Fragmente wurden nach Trennung durch Agarose-Gelelektrophorese mittels UV-Licht angeregter Fluoreszenz an der *Gel Doc*-Einheit (BioRad) sichtbar gemacht und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA erfolgte nach Herstellerangaben des Extraktionskits. Die DNA wurde im Elutionspuffer des Kits aufgenommen.

2.2.1.6 Klonierung von Expressionsvektoren

Phosphatase: Antarctic Phosphatase 5U/µl (NEB)
Puffer: 10x Antarctic phosphatase buffer (NEB)
Ligase: Ligase 5 U/µl (Fermentas)
Puffer: 10x Ligase buffer (Fermentas)

Für die Klonierung von PCR-Fragmenten und für die Subklonierung von DNA-Fragmenten in Expressionsvektoren wurde die durch Restriktionsenzyme verdaute Vektor-DNA nach Extraktion aus Agarose-Gelen mittels 5 U Phosphatase in 40 µl Ansätzen bei 37°C für 30 min in 1x Phosphatasepuffer dephosphoryliert und anschließend bei 65°C für 20 min inaktiviert.

Für die Ligation wurden die DNA-Fragmente und die Vektor-DNA in einem molaren Verhältnis von 3:1 mit 5 U Ligase pro 10 µl Reaktionsansatz für zwei Stunden bei 22°C inkubiert. Anschließend wurde der Ligationsansatz in chemisch kompetente *E.-coli* XL10-Gold transformiert. Nach Inkubation der DNA mit den Bakterien auf Eis (5 min) erfolgte ein Hitzeschock (45 sek) bei 42°C. Die Bakterien wurden für eine Stunde in SOC-Medium bei 37°C inkubiert und daraufhin auf LB-Agarplatten mit einem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert.

2.2.1.7 Plasmid-DNA-Präparation aus *E.-coli*

P1-Puffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml, RNase A:
(Fermentas)
P2-Puffer: 200 mM NaOH, 1% (Gew.%) SDS
P3-Puffer: 3 M Kaliumacetat, pH 5,5
Kit zur Midi-Präparation: Quiagen

Um die Insertion von DNA-Fragmenten in Vektoren zu analysieren, wurden 2 ml Kulturen einer Bakterienkolonie in LB-Medium über Nacht bei 37°C angesetzt. Die Plasmid-DNA-Extraktion erfolgte mittels alkalischer Lyse (modifiziertes Protokoll nach Birnboim, Doly 1979). Die Bakterien wurden bei 20 000 g für 1 min pelletiert und in 200 µl P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl P2 und mehrmaligem Schwenken erfolgte eine Inkubation für 5 min bei RT. Nach Zugabe von 200 µl eiskaltem P3 Puffer, mehrmaligem Schwenken und einer Inkubation von 10 min auf Eis, wurde die Probe durch Zentrifugation bei 20 000 g für 10 min pelletiert. Nach Zugabe von 400 µl 100%igem Isopropanol zu 500 µl des Überstandes und

einer weiteren Zentrifugation bei 20 000 g für 10 min, gefolgt von einem Waschschrift mit 70%igem Ethanol bei 20 000 g wurde das DNA-Pellet für 5 min getrocknet und anschließend in 50 µl bideionisiertem Wasser gelöst.

Plasmid-DNA, die mit Hilfe des Midi-Extraktionskits gewonnen wurde, wurde für Transfektion von primären und sekundären Zellkulturen verwendet. Dabei wurden 100-150 ml Übernacht-LB-Kulturen nach Herstellerangaben verarbeitet. Die Resuspension gewonnener Plasmid-DNA erfolgte in bideionisiertem Wasser. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte über die Absorption bei 260 nm mit Hilfe des *Nanodrop 1000* (Peqlab)

2.2.1.8 Herstellung von Expressionskonstrukten und Sequenzierung

Die in der Arbeit verwendeten Expressionskonstrukte sind im Anhang in Tabelle 6.2 und Tabelle 6.3 aufgelistet.

Die verwendeten DNA-Fragmente, die über PCR gewonnen wurden, wurden nach Klonierung vollständig mittels Sequenzierung überprüft (SeqLab). Expressionsvektoren, die über Subklonierung gewonnen wurden, wurden über eine Teilsequenzierung überprüft. Die Vergleiche der erhaltenen Sequenzen mit den *in-silico* erstellten Vektorkarten der Konstrukte (*ApE A plasmid Editor*, *Geneious*) erfolgte über die Blast-Funktion (bl2seq) von NCBI.

2.2.2 Biochemische Methoden

2.2.2.1 Protein-Sequenzvergleich

Für den Vergleich der Protein Sequenzen wurden folgende Sequenzen aus der NCBI-Datenbank verwendet: *E.-coli* MetRS (NP_416617.1), *Mus musculus* MetRS (NP_001003913.1), *Rattus norvegicus* MetRS (NP_001121131.1), *Homo sapiens* MetRS (NP_004981.2), *Drosophila melanogaster* MetRS (NP_611382.1) . Der Sequenzvergleich wurde mit der Software *Geneious* (www.geneious.com) erstellt.

2.2.2.2 Proteinbestimmung

Färbereagens: **BCA-Protein Assay Kit (Pierce)**

Für die Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde das BCA Protein Assay Reagent Kit (IPierce) verwendet. Die Ermittlung der Konzentration erfolgte anhand einer BSA-Eichreihe. Die Proteinkonzentration errechnete sich als Mittelwert dreier gemessener Einzelwerte. Die Färbereaktion wurde wie vom Kit-Hersteller empfohlen durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des *VERSAmax microplate reader* (Molecular Devices) bei 562 nm.

2.2.2.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

4 x Trenngelpuffer:	1,5 M Tris-HCl, 0,4% (Gew.%) SDS, pH 8.8
4 x Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris-HCl, 0,4% (Gew.%) SDS, pH 6.8
Rotiphorese 30:	30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid (Carl Roth)

25 ml 9,5% Trenngel-Gießlösung für 5 Gele:

6,25 ml 4 x Trenngelpuffer, 7,92 ml Rotiophorese 30, 8,75 ml Bideest, 10,42 µl 0,5% (Gew.%) Bromphenolblau (Merck), 1,88 ml 87% Glycerol, 166,67 µl 10% APS, 16,67 µl TEMED (AppliChem)

13 ml 5% Sammelgel-Gießlösung für 5 Gele:

3,25 ml Sammelgelpuffer, 2,14 ml Rotiophorese 30, 4,53 ml Bideest, 11,56 µl Phenolrot (2000x von Sigma-Aldrich), 2,96 ml 87% Glycerol, 74 µl 10% APS, 18,5 µl TEMED (AppliChem)

4x SDS-Probenpuffer:

250 mM Tris, 20% (Vol.%) β-Mercaptoethanol (Sigma), 1% (Gew.%) SDS, 40% (Vol.%) Glycerol, 0,004% Bromphenolblau (Merck), pH 6.8

4xSDS-Probenpuffer- β ME:

250 mM Tris, 1% (Gew.%) SDS, 40% (Vol.%) Glycerol, 0,004% Bromphenolblau (Merck), pH 6.8

Elektrophorese-Puffer:

192 mM Glycin, 0,1% (Gew.%) SDS, 25 mM Tris, pH 8.3

Die Proteingelelektrophorese wurde nach der von Laemmli als SDS-Page entwickelten Methode durchgeführt (Laemmli, 1970). Dabei wurden die zu analysierenden Proben mit Probenpuffer versetzt und bei 95°C für 5 min gekocht und dann auf 9,5 %ige SDS-Gele aufgetragen. Bei Verwendung der DST-Biotin-Alkin-Sonde wurde Probenpuffer ohne β-Mercaptoethanol verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in dem *Hoefler Mighty Small System SE250* (Amersham Biosciences) bei konstanten 12 mA in 1x Elektrophoresepuffer. Anschließend wurden die Gele für Western-Blotting (3.2.2.6) oder für das Färben von Proteinen mittels Coomassie (3.2.2.4) oder Silber (3.2.2.5) verwendet.

2.2.2.4 Coomassie Brilliantblau R250 Färbung

Coomassie-Färbelösung: 50% (Vol.%) Methanol, 10% (Vol.%) Essigsäure, 0,05% (Gew.%) Coomassie-Brilliantblau R250

Coomassie-Entfärbelösung: 5% (Vol.%) Methanol, 7% (Vol.%) Essigsäure

Nach erfolgter SDS-Page wurde das Gel für 1h in Coomassie -Färbelösung und daraufhin über Nacht in Entfärbelösung geschwenkt. Das gefärbte Gel wurde mit Hilfe des Densitometers *GS-800* (Biorad) digitalisiert.

2.2.2.5 Silber-Färbung

Fixierlösung: 30% (Vol.%) Ethanol, 10% (Vol.%) Essigsäure

Waschlösung: 10% (Vol.%) Ethanol

Silberlösung: 0,1% (Vol.%) AgNO₃ (Fluka)

Entwicklerlösung: 3% (Vol.%) Na₂CO₃, 0,02% (Vol.%) Formaldehyd

Lösung A: 1% (Vol.%) Essigsäure

Konservierer: 10% (Vol.%) Methanol, 1% (Vol.%) Eisessig

Die Silberfärbung wurde nach dem Prokokoll von (Heukeshoven *et al.*, 1985) durchgeführt. Die Fixierung der Gele erfolgte in Fixierlösung über Nacht mit zweimaligem Austausch der Lösung. Nach erfolgter Färbung wurde das Gel mit Hilfe des Densitometers *GS-800* (Biorad) digitalisiert.

2.2.2.6 Western Blot Analyse und Immundetektion

Western Blot-Puffer:	192 mM Glycin, 0,2% (Gew. %) SDS, 20% (Vol.%) Methanol, 25 mM Tris-Base, pH 8.3
Ponceau S-Färbelösung:	0,5% (Gew.%) Ponceau S (Roth) in 3% (Vol.%) Essigsäure
10x TBS:	1,4 M NaCl, 0,25 M Tris-HCl, pH 7.6
TBS-T:	0,1% (Vol.%) Tween-20 in 1x TBS
TBS-TA:	0,02% (Gew.%) Natriumazid in 1x TBS-T
Blockierlösung:	5% (Gew.%) Magermilchpulver in TBS-T
Nitrocellulose-Membran:	Protran[®], Whatman[®], 0,45 µm
ECL-Reagenz	ECL Western Blotting Substrate (Pierce)
Film	Hyperfilm Amersham

Diese Methode wurde anhand des Protokolls von (Towbin *et al.*, 1992) durchgeführt. Dabei erfolgte der Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran (NC-Membran) bei 200 mA und 10°C in Blotkammern von Hoefer für 1.5 h. Nach kurzem Spülen mit bideionisiertem Wasser wurden die Membranen für 10 min in Ponceau-S Färbelösung inkubiert.

Für die Immundetektion wurde die Membran für 1-1.5 h in Blockierlösung bei RT inkubiert. Nach dreimaligen Waschschritten von 10 min mit TBS-T erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C. Mit Ausnahme der Biotin-Antikörper, die in der Blockierlösung angesetzt wurden, wurden alle anderen Primärantikörper in TBS-TA gelöst und mehrmals verwendet. Die Zugabe von Sekundärantikörpern nach dreimaligen Waschschritten mit TBS-T für 10 min erfolgte für 1.5 h. Sekundärantikörper wurden in Blockierlösung verdünnt. Zwei weitere Waschschrritte mit TBS-T und ein Waschschrtritt mit TBS für jew. 10 min erfolgten vor der Entwicklung der Membranen nach Herstellerangaben mit dem ECL-Reagenz. Die Dokumentation erfolgte mit chemilumineszenz-sensitiven Filmen von Amersham und der Entwicklermaschine *Agfa Curix 60* oder mit dem *ChemoCam Imager* (Intas).

Für die Quantifizierung des Anteils an Biotin-markierten Proteinen wurden die Proteinextrakte direkt nach Klick-Reaktion mit der Biotin-Alkin-Sonde auf gleiche Proteinkonzentrationen angeglichen und gleiche Proteinmengen für die Western-Blot-Analyse geladen. Die Detektion der Biotin-markierten Proteine mittels ECL-Reagenz erfolgte mit dem *ChemoCam Imager* (Intas). Die mittels ImageJ ermittelte Intensität der Lumineszenz wurde gegen eine nachfolgende Aktin-Färbung normalisiert und Mehrfachbestimmungen einer Probe relativ zur Kontrolle zusammengefasst.

2.2.2.7 Immunpräzipitation (IP)

Puffer A:	20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl
Lysepuffer:	918 µl Puffer A, 80 µl 25x Complete EDTA-free Protease Inhibitor (Roche), 2 µl MG-132 (50 mM Calbiochem)
Protein A/G PLUS-Agarose:	(Santa Cruz)
Waschpuffer A1:	50 mM Tris, 0,15 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% (Vol.%) Igepal CA-630 (Sigma), pH 7,5
Waschpuffer A2:	50 mM Tris, 0,15 M NaCl, 0,1% (Vol.%) Igepal CA-630 (Sigma), pH 7,5
Waschpuffer A3:	50 mM Tris, 0,1% (Vol.%) Igepal CA-630 (Sigma), pH 7,5
4x SDS-Probenpuffer:	250 mM Tris, 20% (Vol.%) β-Mercaptoethanol (Sigma), 1% (Gew.%)

SDS, 40% (Vol.%) Glycerol, 0,004% Bromphenolblau (Merck), pH 6.8

HEK293T-Zellen wurden mittels Kalziumphosphat-Präzipitation mit EGFP_{toGMetRS} bzw. pEGFP-C1 transfiziert (Abschnitt 2.2.3.1) und nach 24 h in 4 mM Methionin bzw. ANL für 2 h inkubiert. Nach Inkubation wurden die Zellen mit 1x PBS-MC gewaschen, in 1x PBS-PI aufgenommen, pelletiert und in 1 ml Lysepuffer homogenisiert. Dem Zusatz von 900 µl Puffer A und 100 µl 20% Triton X-100 folgte die Zentrifugation des Homogenats bei 5000 g. Die Proteinkonzentration wurde mit dem BCA-Assay bestimmt und auf 1,1-1,2 µg/µl Konzentrat angeglichen. Anschließend wurde der Extrakt mit 50 µl äquilibrierter Protein A/G PLUS Agarose vorgereinigt.

Nach einer einstündigen Inkubation mit 1 µg Antikörper erfolgte die erneute Zugabe von 50 µl äquilibrierter Protein A/G PLUS Agarose und die Inkubation über Nacht rotierend bei 4°C.

Nach kurzer Zentrifugation wurde die ungebundene Fraktion von den sedimentierten Agarose-Partikeln getrennt. Die Agarose-Partikel wurden mehreren 20-minütigen Waschschritten bei 4°C unterzogen (2x Waschpuffer A1, 1x Waschpuffer A2, 1x Waschpuffer A3), und anschließend erfolgte die Elution der gebundenen Proteine mit 30 µl 4x SDS-Probenpuffer bei 95°C (5 min).

2.2.2.8 Koimmunpräzipitation (CoIP)

µMACS™	Epitope Tag Protein Isolation Kit: (Mitenyi Biotec)
10x PBS:	1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 43 mM Na₂HPO₄, 14 mM KH₂PO₄, pH 7.4
PBS-MC	1xPBS, 1 mM MgCl, 0,1 mM CaCl
Protease-Inhibitor (PI):	Complete EDTA-free Protease Inhibitor cocktail tablets (Roche)

Hek293T-Zellen wurden 48h nach Transfektion von RPL27EGFP oder EGFP mit kaltem PBS-MC gewaschen, in kaltem 1xPBS gesammelt und bei 1000 g für 5 min pelletiert. Die Lyse erfolgte in 500 µl Lysepuffer des Kits, versetzt mit 1x Protase-Inhibitor. Ungelöste Zellfraktionen wurden durch Zentrifugation bei 10 000 g für 5 min bei 4°C entfernt. Die Bindung des Fusionsproteins an die magnetischen Partikel erfolgte nach Herstellerangaben des Kits. Die Elution erfolgte mit 50 µl Elutionspuffer nach Herstellerangaben.

2.2.2.9 Herstellung von Proteinlysaten

10x PBS:	1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 43 mM Na₂HPO₄, 14 mM KH₂PO₄, pH 7.
Protease-Inhibitor (PI):	Complete EDTA-free Protease Inhibitor cocktail tablets (Roche)
4x SDS-Probenpuffer:	250 mM Tris, 20% (Vol.%) β-Mercaptoethanol (Sigma), 1% (Gew.%) SDS, 40% (Vol.%) Glycerol, 0,004% Bromphenolblau (Merck), pH 6.8
Benzonase	Benzonase® Nuclease 250 U/µl (Sigma-Aldrich)
PBS-MC	1xPBS, 1 mM MgCl, 0,1 mM CaCl

Für biochemische Untersuchungen wurden die Zellen mit kaltem PBS-MC gewaschen und anschließend in kaltem 1xPBS suspensiert und bei 2000g, 4°C für 5 min pelletiert. Die Pellets

wurden direkt für die Herstellung des Proteinextraktes verwendet, oder bei -20°C bzw. bei -80°C kurzzeitig gelagert.

Die folgende Herstellung von Proteinextrakten wurde für die weitere Verwendung in BONCAT oder für eine direkte Analyse mittels Western-Blot angewandt. Pelletierte Hek293T-Zellen wurden nach Inkubation mit AHA, ANL oder Methionin in PBS pH 7,8, versetzt mit 1x PI (PBS-PI), 125 U Benzonase und 0,2 % SDS gelöst und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Das Lysat wurde mit PBS-PI pH 7,8 auf 0,1% SDS verdünnt und mit TritonX100 mit einer Endkonzentration von 0,2 % versetzt. Das Lysatvolumen betrug bei Hek293T-Zellen 0,5 ml für 1 well einer 6-well-Zellkulturschale oder 2,5 ml für eine 75 cm² Zellkulturflasche. Proteinlysate von Primärkulturen wurden durch direkte Lyse in der Kulturflasche bzw. Kulturplatte in 1 ml mit dem entsprechenden Lysepuffer gewonnen. Nach Denaturierung bei 95 °C für 5 min wurden die Proben aus Primärkultur für 1 h rotierend bei 4 °C inkubiert. Ungelöste Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 3000 g für 5 min entfernt. Für den Nachweis der LtoGMetRS-Expression in Neuron-Glia-Kokultur und in Astrozyten Monokultur und für den Nachweis der SparcL1-Expression bzw. Fibronectin Expression in Neuron-Glia-Kokultur und in Astrozyten Monokultur wurden Kulturen aus einer Kulturflasche (75 cm²) pelletiert und in 200 µl Lysepuffer wie oben beschrieben lysiert.

2.2.2.10 BONCAT

Biotin-Alkin-Sonde:	25 mM in 1x PBS pH 7,8 (Synthese: Dr. Peter Landgraf)
DST-Biotin-Alkin-Sonde	25 mM in 1xPBS pH 7,8 (Synthese: Dr. Peter Landgraf)
Kupfer(I)Bromid-Suspension:	10 mg/ml in ultrapure H₂O (Sigma)
Triazol-Ligand	(Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazo-4-yl)methyl]amine) 200 mM in DMSO (beide Sigma-Aldrich)
Immobilisiertes TCEP	immobilized TCEP Disulfide Reducing Gel (Fischer Scientific)
NeutrAvidin-Agarose	Iodacetamide 92,5 mg/ml in ultrapure H₂O (Sigma-Aldrich)
PBS-NP40	High capacity NeutrAvidin Agarose Resin (Fischer Scientific) 1xPBS, 1% Igepal CA-630

Das BONCAT-Verfahren wurde bereits durch Dieterich *et al.* beschrieben und wurde analog dazu ausgeführt (Dieterich *et al.*, 2007).

Bei der Verwendung der DST-Biotin-Alkin-Sonde ist eine Reduktion und Alkylierung des Proteinlysats notwendig. Hierfür werden 0.3 ml/ 1 ml Proteinlysat Agarose-Partikel-Suspension mit immobilisiertem TCEP jeweils 5 x mit 5 ml PBS pH 7,8 durch mischen und anschließende dreiminütige Zentrifugation bei 1000g pelletiert. Nach Zugabe des Proteinlysats erfolgt eine 75 minütige Inkubation rotierend bei RT. Der Zugabe von frisch gelöstem Iodacetamid auf eine Endkonzentration von 10 mM folgt ein weiterer Inkubationsschritt für 30 min rotierend und abgedunkelt bei RT.

Nach Zentrifugation (3 min, 1000 g) und Transfer des Proteinlysats in ein neues Reaktionsgefäß wird mit der Entsalzung, wie in 2.2.2.11 beschrieben, fortgefahren.

Für die Klick-Reaktion wurden Proteinlysate direkt (für die Biotin-Alkin-Sonde) oder reduziert

und alkylierte Proben (für die DST-Biotin-Alkin-Sonde) in möglichst kurzer Zeit mit Triazol-Ligand (1:1000) versetzt, für 10 sek mit dem Vortexer gemischt, anschließend mit der Biotin-Alkin-Sonde oder der DST-Biotin-Alkin-Sonde (1:1000) durch 10 sek mit dem Vortex gemischt und daraufhin mit einer frisch gelösten Kupfer(I)Bromid-Suspension (1:50) versetzt und für 30 sek sorgfältig mit dem Vortex gemischt. Das Proteinlysate wurde rotierend bei 4 °C über Nacht inkubiert. Präzipitate wurden am folgenden Tag durch fünfminütige Zentrifugation bei 5000 g entfernt.

2.2.2.11 Probenentsalzung

PD10 Säule:	GE Healthcare
10x PBS:	1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 43 mM Na₂HPO₄, 14 mM KH₂PO₄, pH 7.8
1xPBS-SDS:	1xPBS pH 7,8, 0,05% SDS
1xPBS-PI:	1x PBS pH 7,8, 1x Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche)
1xPBS-A:	1xPBS pH 7,4, 0,1% Natriumazid

Proben, die nach Klick-Reaktion für eine Aufreinigung über NeutrAvidin-Agarose oder nach Reduktion und Alkylierung für die Klick-Reaktion mit dem DST-Biotin-Alkin-Tag vorgesehen waren, wurden nach folgendem Verfahren entsalzt. PD10 Säulen wurden mit jew. 5 ml PBS-SDS 5 x gewaschen. Der Zugabe von 2.5 ml der Probe folgte die Elution mit 3,5 ml PBS-SDS. Das Eluat wurde im Anschluss mit PI (1x Endkonzentration) versetzt und wie in 2.2.2.10 bzw 2.2.2.12. weiter behandelt. Für die Generierung der Massenspektrometrie-Proben wurden unbenutzte PD10-Säulen verwendet. Die übrigen Ensalzungen wurden zum Teil mit regenerierten Säulen durchgeführt. Rückstände wurden dabei durch Spülen mit 100 ml ddH₂O pro Säule entfernt. Die Säulen wurden in 1x PBS-A gelagert.

2.2.2.12 NeutraAvidin-Aufreinigung Biotin-markierter Proteine

NeutrAvidin™ Agarose-Resin

Ammoniumbicarbonat :	50 mM (Fluka) in ultrapure H₂O (Roth)
Protease Inhibitor (PI) :	Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche)
10x PBS:	1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 43 mM Na₂HPO₄, 14 mM KH₂PO₄, pH 7.8
Igepal-630	(Sigma)
1xPBS-SDS:	1xPBS pH 7,8, 0,05% SDS
β-Mercaptoethanol:	(Sigma)

Die NeutraAvidin-Suspension wurde 3 x mit PBS-SDS versetzt und anschließend für 5 min bei 3000 g pelletiert. Der Proteinextrakt wurde mit Igepal-CA630 (Endkonzentration 1%), Protease Inhibitor (Endkonzentration 1x) versetzt und zum Agarose-Pellet gegeben. Für die Aufreinigung von ANL-markierten Proteinen wurden 0.4 ml Suspension pro 2,5 ml Proteinextrakt verwendet, für die Aufreinigung sekretierter Proteine 0.8 ml pro 10 ml Medium. Die Bindung erfolgte über Nacht bei 4 °C rotierend. Nach Pelletierung der Agarose und Abnahme des Überstandes wurde die Agarose wie folgt mit einer Reihe von Waschpuffern versetzt, 5 min rotierend inkubiert und 5 min bei 3000 g und 4 °C zentrifugiert: 5 x 10 ml PBS-

NP40, 3 x 10 ml PBS pH 7,8. Für Proteine, die mit der DST-Biotin-Alkin-Sonde markiert sind erfolgte ein weiterer Waschschriff mit Ammoniumbicarbonat-Lösung. Nach Abnahme des letzten Waschpuffers wurde die Agarose mit Ammoniumbicarbonat-Lösung versetzt, um eine 50%ige Suspension zu erhalten. Die Elution der Proteine erfolgte durch Zugabe von β -Mercaptoethanol mit einem Endgehalt von 5 % und 30 min rotierender Inkubation. Die Elution wurde 2 x wiederholt. Für Proteine, die über die Biotin-Alkin-Sonde gebunden sind, erfolgte die Elution mit 4 x SDS. Nach Auffüllen mit 4 x SDS auf eine 50%ige Suspension folgte die Denaturierung bei 95°C für 5 min und einer Pelletierung der Agarose durch Zentrifugation bei 5000 g für 5 min.

2.2.2.13 Prozessierung der Proteinproben für die Massenspektrometrie und Auswertung der Daten

H ₂ O	ultra pure H ₂ O (Roth)
μ MACS™	Epitope Tag Protein Isolation Kit: (Mitenyi Biotec)
Ammoniumbicarbonat:	50 mM (Fluka) in ultrapure H ₂ O (Roth)
Entsalzungssäulen	Zeba™ Desalting Columns 7k MWCO, 0,5 ml

Für den direkten Nachweis der ANL-Integration in EGFPLtoGMetRS wurden die Zellpellets (siehe Abschnitt 2.2.3.7) lysiert und mit Hilfe von Antikörper-gekoppelten, magnetischen Partikeln laut Herstellerangaben des Kits aufgereinigt. Der Puffer des Eluats wurde gegen 50 mM Ammoniumbicarbonat mit Hilfe von Entsalzungssäulen ausgetauscht und die Proteinprobe durch mehrmalige Trocknung in einer Vakuum-Eindampfungszentrifuge und Lösung in ultra- reinem H₂O gereinigt.

Die in Ammoniumbicarbonat aufgenommenen Proteineluate, die wie in Abschnitt 2.2.2.12 gewonnen wurden, wurden ebenfalls dreimalig getrocknet und in ultra-reinem H₂O gelöst.

Die weitere Verarbeitung der Proben wurde von PD Dr. Thilo Kähne (Institut für Experimentelle Innere Medizin, Universität Magdeburg) durchgeführt. Die Prozessierung der Proben erfolgte wie in Kähne, Kolodziej *et al.*, (2012) beschrieben und wird im Folgenden nur kurz umrissen. Die getrockneten Proteine wurden nach Aufreinigung in 8 M Urea gelöst, mit Hilfe von 2,5 mM TCEP bestehende Disulfidbrücken für 1 h reduziert und mit 10 mM Iodacetamid für 30 min alkyliert. Der Proteinverdau erfolgte durch die Zugabe von 2 μ g Trypsin für 2x 24 h. Für die Identifizierung von ANL in EGFPLtoGMetRS wurden zusätzliche Einzelverdaue oder Doppelverdaue mit jew. 1 μ g der Endopeptidasen Trypsin, Asp-N, Glu-C, Lys-C für 40 h durchgeführt (Einzelverdau: AspN, LysC, Trypsin; Doppelverdau: AspN+Trypsin, GluC+Trypsin). Mit Ausnahme der Probe für die direkte Identifizierung von ANL in EGFPLtoGMetRS erfolgte eine Separierung der Peptide über eine Isoelektrische Fokussierung mit 10 Fraktionen (in press: Kähne, Kolodziej *et al.*, 2012). Die Identifizierung der Peptide erfolgte analog zu Kähne, Kolodziej *et al.* (2012) mit dem ETDII-Ionenfallenmassenspektrometer (*HTC Ultra PTM Discovery System*, Bruker). Der Nachweis

von AHA- bzw. ANL-Integration in Peptiden gelang über die Massedifferenz der nicht-kanonischen Aminosäuren (AHA: M=143,1; ANL: M=172,2) zu Methionin (M=149,2) mit einer Toleranz von 1,5 Dalton. Zusätzlich wurden die nach Klick-Reaktion und Spaltung der DST-Biotin-Alkin-Sonde veränderten Seitenketten von AHA und ANL, sowohl mit Sulfidgruppe (M(AHA)=274,3; M(ANL)=332,3), als auch mit Carbamidomethylgruppe (M(AHA)=203,6; M(ANL)=361,4) nach Alkylierung für eine positive Identifizierung der Aminosäuren mit einbezogen (siehe Struktur DST-Biotin-Alkin-Sonde: Anhang 7.8).

Die MS/MS-Daten wurden mittels *DataAnalysis* (Bruker) prozessiert, über die *Mascot*-Suchmaschine gegen die Swissprot/Uniprot-Datenbank abgeglichen und mit Hilfe von *ProteinScape* (Bruker) verwaltet. Soweit nicht anders angegeben wurden Proteine als positiv identifiziert bewertet, die mind. 1 Peptid mit einem Score über 40 und mind. ein weiteres Peptid mit einem Score von mind. 15 aufweisen. AHA und ANL-positive Peptide wiesen mind. einen Score von 25 auf. Die Identifizierung von Keratin wurde als Kontamination bewertet und nicht aufgeführt. Die weitere Analyse der Daten erfolgte mit *IPA* (Ingenuity Systems).

2.2.2.14 Aufbereitung des konditionierten Mediums

Dialyseschläuche	ZelluTransRoth 3,5 MWCO (Roth)
10x PBS:	1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 43 mM Na ₂ HPO ₄ , 14 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.8
PI:	50x Complete EDTA-free Protease Inhibitor in ddH ₂ O (Roche)
SDS	20% in ddH ₂ O (Roth)

Das durch Astrozyten konditionierte Medium wurde abgenommen, mit Protease-Inhibitor auf eine 1x Endkonzentration versetzt und bei 1000g für 5 min zentrifugiert. Pro Kondition wurden 21 ml von insgesamt drei 75 cm² Zellkulturflaschen gesammelt. Das Medium wurde mit 0,5 x PBS pH7,8 vorbehandelte Dialyseschläuche gefüllt und für 24 h gegen 3 x 3 l 0,5 x PBS pH 7,8 dialysiert und anschließend durch Vakuumtrocknung auf das halbe Volumen reduziert. Nach einer weiteren Zugabe von Protease-Inhibitor und SDS mit einer Endkonzentration von 0,05%, wurde wie in 2.2.2.10 beschrieben mit der Reduktion und Alkylierung und der folgenden Klick-Reaktion mit der DST-Biotin-Alkin-Sonde fortgefahren.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Kultivierung und transiente Transfektion von Hek293T

Lösung A:	500 mM CaCl ₂ (Roth)
Lösung B:	140 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1,5 mM Na ₂ PO ₄ (Roth), pH 7.05
Lipofectamine™ 2000	(Invitrogen)
Optimem	(Gibco)
Kulturmedium:	DMEM, 10% (Vol.%) fötales Kälberserum (FKS), 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (alles Gibco)
TrypLE™ Express:	1x (Gibco)
Poly-D-Lysin:	100 mg/ml in 0,15 M Borsäure, pH 8.4
HBSS:	(Gibco)
10x PBS:	1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 43 mM Na ₂ HPO ₄ , 14 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.4
1x PBS-MC:	1x PBS, pH 7.4, 0,5 mM CaCl ₂ , 5 mM MgCl ₂
Kulturflaschen:	Nunc

Geneticin **150 mg/ml (Gibco)**

Die humane Nieren-Fibroblasten Zelllinie Hek293T wurde für Überexpressionsstudien genutzt. Für die Generierung der stabilen Zelllinie wurden Hek293-Zellen verwendet. Die Erhaltung der Kulturen erfolgte bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % H₂O-gesättigter Atmosphäre in einem Zellkultur-Inkubator (Heraeus oder Thermo Scientific). Die Kulturen wurden zweimal pro Woche passagiert. Dabei wurden die Zellen nach einem Waschschrift mit warmen HBSS für 3 min mit 1 x TrypLE gelöst und ein Zehntel der Zellen in neues Kulturmedium überführt. Für immunzytochemische Untersuchungen wurden die Zellen auf Poly-D-Lysin beschichteten Deckgläschen in 12- bzw. 24-*well*-Kulturplatten kultiviert.

Für die Überexpression von Konstrukten wurden die Hek293T-Zellen mit ca. 80 %iger Konfluenz am Tag nach der Passage mittels Kalziumphosphat-Präzipitaten mit der entsprechenden DNA transfiziert (siehe Tabelle 6.2, Tabelle 6.3). Dabei wurde für eine 75 cm²-Kulturflasche 1 ml Lösung A mit 25 µg DNA gemischt und nach Zugabe von 1 ml Lösung B und einer Wartezeit von einer Minute in das Kulturmedium getropft. Nach vier Stunden wurde das Medium durch frisches Kulturmedium ersetzt. Für 6-*well* bzw. 24-*well* Platten wurde die entsprechende Menge von DNA und Lösung A/B in Bezug auf die Kultivierungsfläche herunterskaliert. Für den Nachweis der Lokalisation der MetRS-Mutanten und für den Nachweis der ANL-Markierung mittels FUNCAT wurden Hek293T-Zellen mit Lipofectamin 2000 nach Herstellerangaben transfiziert.

Für die Generierung einer stabilen Integration von EGFP_LtoGMetRS in eine Hek293-Zelllinie wurden Hek293-Zellen transient über Kalziumphosphat-Präzipitate transfiziert und für 5 Tage mit Hilfe von 500 ng/ml Geneticin auf positive Integration selektiert. Die Erhaltung der Zelllinie erfolgte unter 100 ng/ml Geneticin.

2.2.3.2 Herstellung und Kultivierung von primären kortikalen und hippocampalen Neuronenkulturen aus Ratte

Kulturmedium 1:	DMEM, 10% (Vol.%) fötales Kälberserum (FKS), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml, Streptomycin, 2 mM L-Glutamin (alles Gibco)
Kulturmedium 2:	NeurobasalTM, 1x B27, 0,8 mM L-Glutamin (alles Gibco)
Waschpuffer	HBSS, HBSS+CaCl₂+MgCl₂, Phenolrot (Gibco)
Trypsin:	10x Trypsin (-EDTA), (Gibco)
DNase I:	0,1% (200U) in HBSS (Roche), 2,4 mM MgSO₄
Poly-D-Lysin:	100 mg/l in 0,15 M Borsäure, pH 8.4

Die Präparation von neuronalen Kulturen erfolgte nach der Methode von Goslin und Banker (Goslin *et al.*, 1998). Dabei wurden Rattenembryonen im Alter von E18 dekapitiert und das Gehirn freigelegt. Die Isolierung des Hippokampus und der Kortices erfolgte in kaltem HBSS. Die Zellsuspension wurde durch die Inkubation mit 1 x Trypsin für 20 min bei 37°C und anschließender Separation durch Kanülen mit einem Durchmesser von 0.9 mm und 0.45 mm (Brandt), zusammen mit 0,4 ml einer 0,1%igen DNaseI-Lösung hergestellt. Nach dem

Filtrieren durch einen 0.45 µm Membran wurde die Zellen im Kulturmedium I verdünnt. Für immunzytochemische Untersuchungen wurden *low density* Kulturen mit einer Zelldichte von 20 T Zellen hippokampaler oder kortikaler Neurone pro *well* in einer 24 *well*-Platte mit Poly-D-Lysin beschichteten Deckgläschen ausplattiert. Für biochemische Untersuchungen wurden *high density*-Kulturen verwendet, mit Zelldichten von 3 Mio Zellen pro 75 cm²-beschichteten Zellkulturflaschen bzw. 300 T Zellen/*well* einer beschichteten 6 *well*-Platte.

Am Tag nach der Präparation wurde Kulturmedium I gegen Kulturmedium II getauscht. Für *low density*-Kulturen wurde das Kulturmedium II eins zu eins mit Kulturmedium II gemischt, das für 3 Wochen durch kortikale Neurone konditioniert wurde. Einmal wöchentlich wurden die Kulturen mit einem Zehntel frischem Kulturmedium II gefüttert.

2.2.3.3 Herstellung von Lentiviren

Medium I:	DMEM, 10% fötales Kälberserum (FKS), 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (alles Gibco)
Medium II:	DMEM, 4% fötales Kälberserum (FKS), 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (alles Gibco)
Sterilfilter:	(Corning)
Zentrifugenröhrchen:	Beckmann Ultra clear

Die Herstellung der Lentiviralen Expressionsvektoren erfolgte durch Integration von DNA Fragmenten, die mittels PCR gewonnen wurden, bzw, durch Subklonierung von DNA-Fragmenten in den durch (Lois *et al.*, 2002) beschriebenen Vektor FUGW. Die verwendeten Konstrukte sind im Anhang gelistet (Tabelle 6.3).

Die Herstellung der Lentiviren erfolgte wie bei Dittgen (Dittgen *et al.*, 2004) beschrieben unter Bedingungen der Sicherheitsstufe S2. Dabei wurden der Transfervektor zusammen mit den Helferplasmiden VSVg und pSpax2 mit einer Ratio von 10 µg/ 5 µg/ 7.5 µg in Hek293T mit der Kalziumphosphat-Methode transfiziert (2.2.3.1) (Zufferey *et al.*, 1997). Der Austausch mit frischem Medium I beendet die Transfektion nach 6h. An beiden Folgetagen wurde auf frisches Medium II für die Virenernte gewechselt. Das Medium wurde gesammelt und gegebenenfalls bei 4°C gelagert. Zelldebris wurde über Zentrifugation bei 2000g für 5 min und anschließende Filtration durch, mit Medium I blockierte, 0.45 µm Sterilfilter entfernt. Die Lentiviren wurden bei 19 700 g für zwei Stunden pelletiert. Die Lagerung der Lentiviren erfolgte in Aliquots bei -80 °C bzw. kurzzeitig bei -20 °C.

Der Virustiter des FUGW-Virus wurde durch die Infektion von Hek293T, plattiert mit einer 50%igen Konfluenz in 96-well-Zellkulturplatten bestimmt. Dabei wurde der Virus in Medium I verdünnt und für 24h zu den Zellen gegeben. Die Zahl der Viruspartikel errechnete sich aus der Zahl der EGFP-positiven Hek-Zellen. Der Virustiter der Lentiviren, die mit dem GFAP-Promoter konstruiert waren, wurden in Neuron-Glia- Kokulturen überprüft. Die Neuron-Glia Kokulturen (2.2.3.2), kultiviert auf Poly-D-Lysin beschichteten 24- *well*-Kulturplatten, wurden mit dem in Medium I seriell verdünntem Virus infiziert. Die EGFP-Expression wurde 5 Tage

nach Infektion beurteilt, schwache EGFP-Expression gegebenenfalls mittels Immunzytochemie verstärkt (siehe 2.2.3.10) und die Zahl der infektiösen Partikel (IU) bei einer angemessenen Virus-Verdünnung ausgezählt.

Für die Infektion von hippokampalen Neuronen wurden die Viren in dem Kulturmedium der Zellen entsprechend verdünnt und zu den Kulturen (DIV16) zugegeben. Vor der Fixierung der Zellen mit 4% PFA oder der Inkubation von nicht-kanonischen Aminosäuren wurden die Zellen zwei Mal mit warmem HBSS gewaschen.

2.2.3.4 Präparation von primären Gliazell-Kulturen aus Ratte

Medium I:	DMEM, 10% (Vol.%) fötales Kälberserum (FKS), 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (alles Gibco)
Waschpuffer	HBSS, HBSS+CaCl₂+MgCl₂, Phenolrot (Gibco)
Trypsin:	10x(-EDTA), (Gibco)
DNaseI:	0,1% (200U) in HBSS (Roche), 2,4 mM MgSO₄
Lipofectamine™ 2000	(Invitrogen)
Optimem	(Gibco)

Die Präparation der Gliazellen erfolgte nach Guizzetti und Costa (Guizzetti und Costa, 1996). Dabei wurden das Hirngewebe von 2-3 Tage alten Ratten freigelegt, die kortikalen Hemisphären in kaltem HBSS separiert, von den Meningen befreit, mechanisch zerkleinert und durch eine 1 x Trypsinlösung für 20 min bei 37 °C verdaut. Nach dreimaligen Waschschritten mit HBSS+ wurde die Zellsuspension mit DNaseI versetzt und die Zellen mit Hilfe von Kanülen (0,9 mm und 0,45 mm Durchmesser) vereinzelt, mit Medium I versetzt und in 75cm²-Zellkulturflaschen ausplattiert. Ein Mediumwechsel erfolgte am Tag nach der Präparation, sowie 2-3 mal wöchentlich mit Medium I. Mikroglia wurden durch kräftiges Schlagen entfernt. Nach zwei Wochen bei Erreichen vollständiger Konfluenz, wurden die Zellen durch Inkubation mit Trypsin gelöst und auf Zellkulturflaschen bzw. in 24-well-Zellkulturplatten auf Deckgläschen ausplattiert. Kulturen, die einen hohen Gehalt an Mikroglia bzw. Oligodendrocyten enthielten, wurden nicht für weitere Experimente verwendet.

Die transiente Transfektion der Astrozyten in Monokultur erfolgte in 24-well-Zellkulturschalen mit Lipofectamine™ 2000 in Optimem nach Herstellerangaben.

2.2.3.5 Herstellung von konditioniertem Medium aus Gliazellkultur

HBSS:	(Gibco)
Kulturmedium-Met:	DMEM 21013 ohne L-Methionin, ohne Cystein, 48 µg/ mlCystein 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (alles Gibco)
AHA	200 mM AHA in 1xPBS pH7.4

Völlständig konfluente Gliazellkulturen in 75 cm² Zellkulturflaschen wurden mit warmen HBSS gewaschen und in Kulturmedium-Met mit 4 mM AHA kultiviert. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen, bei 3000 g für 5 min zentrifugiert und mit Protease-Inhibitor versetzt.

2.2.3.6 Propidium-Iodid-Färbung

Propidium-Iodid	1mg/ ml (Fluka)
10x PBS	1,4 M NaCl, 83 mM Na₂HPO₄, 17 mM NaH₂PO₄, pH 7.4
4% PFA	4g in PBS pH 7,5-8,0
Einbettungslösung:	Mowiol

Hek293T-Zellen, die mit EGFP-LtoGMetRS oder EGFP allein mittels Kalziumphosphat-Präzipitaten transfiziert wurden, wurden am Tag nach der Transfektion wie in 3.2.3.7 beschrieben für 4 h mit 4 mM ANL oder Methionin inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen für 5 min mit 2 µg/ml Propidium-Iodid in 1 x PBS pH 7,4 schwenkend inkubiert und anschließend mit 4% PFA für 5 min bei RT fixiert. Der Fixierung folgten zwei 5 minütige Waschschrte mit 1x PBS bei RT und der Einbettung der Deckgläschen auf Objektträgern. Für die Kontrolle der Färbung wurden zusätzlich Zellen nach Fixierung mit 4 % PFA für 5 min mit Propidium-Iodid gefärbt und ebenfalls in Mowiol eingedeckelt. Das Auszählen der Zellen erfolgte zeitnah nach Trocknung der Einbettungsmasse. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von *Prism* (Graphpad) durch einen nicht-parametrischen *One way*-Anova-Test ($\alpha=0.05$).

2.2.3.7 Aminosäureinbau in neu synthetisierte Proteine in Zellkultur

2x HBS:	20 mM HEPES, 238 mM NaCl, 4 mM CaCl₂, 4 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 60 mM Glucose, pH 7.35
L-Methionin:	200 mM (Sigma) in ddH₂O
Azidonorleucin:	200 mM (Dr. rer. nat. Daniela C. Dieterich) in 1 x PBS pH 7.4
Azidohomoalanin:	200 mM (Dr. rer. nat. Daniela C. Dieterich) in 1 x PBS pH 7.4
Kulturmedium-Met:	DMEM 21013 ohne L-Methionin, ohne Cystein, 10% fötales Kälberserum (FKS), 48 µg/ml Cystein, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (alles Gibco)
HBSS	1x HBSS (Gibco)
Hibernate-Medium	nach Brewer und Price, 1996, (Sigma, Roth, Serva)
10x PBS:	1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 43 mM Na₂HPO₄, 14 mM KH₂PO₄, pH 7.8
1x PBS-MC:	1x PBS, pH 7.4, 0,5 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂
1x PBS-PI:	1x PBS, pH 7.4, 1x Complete EDTA-free Protease Inhibitor (Roche)
Anisomycin:	40 mM in DMSO (Sigma)
Cycloheximid:	100 mg/ml in DMSO (Sigma)

Für den Einbau von Aminosäuren in neusynthetisierte Proteine von Hek293T, wurden die Zellen am Tag nach dem Splitten bzw. einen Tag nach Transfektion mit einer Konfluenz von 60-80 % dreimalig mit warmem 1 x HBS gewaschen. Zu dem letzten Waschgang wurde in DMSO gelöstes Anisomycin und Cycloheximid oder DMSO allein gegeben und bei 37 °C und 5% CO₂ für 20 min inkubiert. Der Zugabe der Aminosäuren mit einer Endkonzentration von 4 mM folgte eine weitere Inkubation für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂. Bei Inkubationszeiten von 2h oder länger erfolgte die Markierung mit AHA bzw. ANL in Kulturmedium-Met nach zweimaligem Waschen mit HBSS. Die Zellen wurden anschließend mit kaltem 1 x PBS-MC gewaschen und für die BONCAT-Reaktion lysiert (siehe 2.2.2.10) oder für FUNCAT mit 4% PFA fixiert (siehe 2.2.3.9).

Für den direkten Nachweis von ANL mittels Massenspektrometrie wurden Hek293T-Zellen wie in Abschnitt 2.2.3.1 beschrieben mit Hilfe der Kазiumphosphatpräzipitation transient transfiziert. Nach zweistündiger Inkubation folgte ein Wechsel auf Medium I, das mit 4mM ANL und 100 µM SAM versetzt wurde. Die Zellen wurden nach 24 h mit 1 x PBS-MC gewaschen, für 5 min bei 1000 g pelletiert und wie in Abschnitt 2.2.2.13 beschreiben weiter prozessiert.

Für den Einbau von nicht-kanonischen Aminosäuren in Primärzellkultur wurden die Kulturen (DIV21) einmal mit warmem HBSS gewaschen und für 20 min bei 37°C und 5% CO₂ in HiB-Medium (-Met) inkubiert. Das Medium wurde nach dem Rezept des Herstellers selbst angesetzt (Brewer und Price, 1996). Die Zugabe der Aminosäuren zu den Zellen erfolgte für 2 h bzw. 4 h. Nach einmaligem Waschen mit HBSS wurden die Zellen wie oben beschrieben für BONCAT (2.2.2.10) bzw. FUNCAT (2.2.3.9) prozessiert.

2.2.3.8 Stimulation kortikaler, neuronaler Kulturen

BDNF	100 ng/µl in ultrapure H₂O, aliquotiert in 0,5 ml Eppendorf tube (ProteinLoBind), (Alomone Labs), gelagert für max. 2 Monate bei -20°C
TTX	2 mM in PBS pH 5.2, gelagert bei -20°C in Aliquots (Tocris)
Anisomycin	40 mM in DMSO (Sigma)

Für die Stimulation kortikaler Kulturen in 24 *well*-Platten wurden TTX und BDNF 1:10 mit dem entsprechenden Kulturmedium vorverdünnt und BDNF mit einer Endkonzentration von 50 ng/ml oder TTX mit 2 µM Endkonzentration zu den *wells* pipettiert und für 4h inkubiert. Für die Analyse von Proteinneusynthese wurden BDNF und TTX zusammen mit den Aminosäuren zu den *wells* oder 75 cm²-Zellkulturflaschen gegeben und über die gesamte Markierungszeit belassen. Gegebenenfalls erfolgte die Zugabe von Anisomycin (1:1000) parallel zur Stimulation. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit kaltem PBS-MC gewaschen und je nach Experiment mit der Fixierung der Zellen wie in 2.2.3.10 beschrieben oder mit BONCAT, wie in 2.2.2.10 beschrieben, fortgefahren.

2.2.3.9 FUNCAT

10x PBS:	1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 43 mM Na₂HPO₄, 14 mM KH₂PO₄, pH 7.8
4% PFA	4g in PBS pH 7,5-8,0
TAMRA-Aikn-Sonde:	200 mM in DMSO (Invitrogen)
Kupfersulfat:	200 mM (Sigma) in ultrapure H₂O
Triazol-Ligand	200mM in DMSO (Sigma)
(Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazo-4-yl)methyl]amine)	
TCEP	400 mM (Sigma) in ultrapure H₂O
B-Block:	10% Horse Serum (Gibco), 5% Sucrose, 2% BSA in 1x PBS pH7.4
Waschpuffer:	0.5 mM EDTA, 1% Tween-20 in 1xPBS pH 7.8
Mowiol:	10% Mowiol, 25% Glycerol, 100 mM Tris-HCl, pH 8.5, 2,5% (DABCO)

Nach erfolgter Aminosäureinkubation (siehe 2.2.3.7) wurden die Zellen bei RT für 5 min mit 4 % PFA für 5 min fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1 x PBS pH 7,4 für 10 min bei RT

wurden die Zellen mit B-Block für 1,5 h schüttelnd bei RT inkubiert und anschließend dreimalig mit 1x PBS pH 7,8 für 10 min bei RT gewaschen.

Für die Klick Reaktion wurde der Triazol-Ligand 1:1000 in 1x PBS pH7,8 durch kurzes, starkes Mischen mit dem Vortexer gelöst. Nach der Zugabe von TCEP (1:1000) und einem Mischschritt von 10 sek mit dem Vortexer folgte die Zugabe des Tamra-Tags (1:10 000) mit einem Mischschritt. Der Reaktionsansatz wurde nach Zugabe von Cu_2SO_4 -Lösung (1:1000) und einem Mischschritt für 30 sek in eine 24 well Platte, mit 400 μl Ansatz pro well, verteilt. Die Deckgläschen wurden kopfüber auf vier kleine Paraffinpunkte in die wells gelegt, um das Absetzen von Präzipitaten zu verhindern und anschließend bei RT über Nacht inkubiert. Nach der Klick-Reaktion wurden die Deckgläschen dreimalig mit Waschpuffer und zweimalig mit 1 x PBS pH 7,4 für jeweils 10 min bei RT gewaschen. Danach wurde gegebenenfalls mit der Primärantikörperinkubation (siehe 2.2.3.10) fortgefahren oder die Deckgläschen einmalig mit Wasser gewaschen und in 7 μl Einbettungslösung auf Objektträgern fixiert. Die Analyse erfolgte analog zu 2.2.3.10.

2.2.3.10 Immunzytochemie

4 % PFA	4g in PBS pH 7,5-8,0
Bisbenzimid	10 mg/ml in H_2O (Invitrogen)
B-Block:	1x PBS, pH 7.4, 10% Pferdenormalserum, 5% Saccharose, 2% BSA
10x PBS:	1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 43 mM Na_2HPO_4, 14 mM KH_2PO_4, pH 7.4
Mowiol:	10% Mowiol, 25% Glycerol, 100 mM Tris-HCl, pH 8.5, 2,5% (DABCO)

Nach erfolgter Inkubation mit den nicht-kanonischen Aminosäuren (siehe 2.2.3.7) wurden die Zellen bei RT für 5 min mit 4% PFA für 5 min fixiert, gefolgt von drei Waschschritten mit PBS pH 7,4 für 10 min bei RT. Unspezifische Bindestellen wurden für 1,5 h mit B-Block unter Schwenken bei RT blockiert. Anschließend wurden die Deckgläschen in eine feuchte Kammer auf einen Parafilm gelegt und mit 50 μl der Antikörperlösung bedeckt und für 2 h bei RT inkubiert. Die Antikörperlösungen wurden mit der in 2.1.2 angegebenen Verdünnung der Antikörper in B-Block angesetzt.

Der Antikörperinkubation folgten drei Waschschrritte mit PBS pH 7,4 von jeweils 10 min bei RT und der Inkubation von 50 μl der zweiten Antikörperlösung für 1 h. Nach dreimaligem Waschen mit PBS pH 7,4 wurden die Deckgläschen kurz in ddH_2O getaucht, getrocknet und in 7 μl Einbettungslösung auf Objektträgern fixiert. Die je nach Experiment verwendete Bisbenzimidfärbung wurde anstelle des zweiten Waschschrittes nach der Sekundärantikörperinkubation vorgenommen. Bisbenzimid wurde 1:5000 in PBS pH 7,4 verdünnt und für 10 min bei RT mit den Deckgläschen inkubiert. Die Fluoreszenzaufnahmen der Komponenten des Translationsapparates wurden mit dem Konfokalmikroskop TCS SP5 (Leica) erstellt. Alle weiteren Fluoreszenzaufnahmen wurden mit Hilfe des Mikroskops Axio

Observer.Z1 (Zeiss) unter Nutzung folgender Filtersets erstellt:

Fluorophor	Zeiss Filterset
EGFP/Alexa [®] 488	ET Filterset (Bandpass) F46-002
Cy3	HC Filterset (Bandpass) F36-502
Cy5/ Dylight	HC Filterset (Bandpass) F36-523
Bisbemzimid	HC Filterset (Bandpass) F36-500

Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe der *AxioCam MRm* und des Programms *AxioVision Rel. 4.8* (beides Zeiss). Die Bildbearbeitung wurde mit der Software *ImageJ* oder *Photoshop CS3* (Adobe) durchgeführt.

Die Quantifizierung EGFP-positiver Neurone nach Infektion mit LVpGfa-ABC1DEGFP erfolgte an zwei bzw. drei unabhängigen Experimenten mit jeweils vier Deckgläschen. Neurone wurden anhand des MAP2-Signals identifiziert und auf EGFP-Expression überprüft.

Die Quantifizierung des Anteils an Connexin-43 nach Stimulation mit BDNF oder TTX erfolgte mit der Software *ImageJ*. Die dabei verwendeten Bilder wurden unter den Bedingungen, wie oben beschrieben, erstellt. Pro Experiment wurden gleiche Aufnahmezeiten und gleiche Bearbeitungen der Bilder vorgenommen. Die Zellmaske wurde anhand der EGFP-Expression erstellt. Nach Abzug des Hintergrunds (*rolling ball radius*: 300 Pixel) wurde ein Schwellenwert gewählt, der EGF-Fluoreszenz einschließt und unspezifische Hintergrundfärbung entfernt, die Maske auf den zu quantifizierenden Kanal übertragen und der Mittelwert der Fluoreszenz innerhalb der Markierung bestimmt. Die Connexin-43 positiven Aggregate, die *gap-junction*-Kanäle repräsentieren, wurden auf Grund der hohen Fluoreszenzintensität mit einer Begrenzung der zu messenden Intensität mit Hilfe eines entsprechenden Schwellenwertes ausgeschlossen. Die statistische Auswertung erfolgte mit *Prism* (Graphpad) mit Hilfe eines zweiseitigen T-Tests ($\alpha=0.05$).

2.2.3.11 Quantifizierung der Proteinneusynthese mittels FUNCAT

Die Quantifizierung der Proteineusynthese in Astrozyten von Kokultur oder Monokultur erfolgte mit *ImageJ*. Die dabei verwendeten Bilder wurden unter den Bedingungen, wie in 2.2.3.10 beschrieben, erstellt. Pro Experiment wurden gleiche Aufnahmezeiten und gleiche Bearbeitungen der Bilder vorgenommen. Die Zellmaske wurde, wie in Abschnitt 2.2.3.10 beschrieben, erstellt. Die Maske wurde auf den Tamra-Kanal übertragen und der Mittelwert der Fluoreszenz innerhalb der Markierung bestimmt. Mögliche Überlagerungen von neuronalen Fortsätzen wurden vor der Quantifizierung manuell entfernt. Die Ergebnisse wurden pro Experiment relativ zur Kontrolle bestimmt und die Ergebnisse von drei bzw. zwei Experimenten zusammengefasst. Die statistische Auswertung erfolgte mit *Prsim* (Graphpad) mit Hilfe eines zweiseitigen T-Tests ($\alpha=0.05$).

2.2.3.12 Astroprot-Datenbank

Folgende Publikation wurden bisher für die Generierung der Astroprot-Datenbank genutzt: (Dowell *et al.*, 2009), (Cahoy *et al.*, 2008; Doyle *et al.*, 2008; Greco *et al.*, 2010; Keene *et al.*, 2009; McBee *et al.*, 2007; Moore *et al.*, 2009; Seyfried *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2005). Die Proteine wurden anhand der Uniprot-Bezeichnung in der Datenbank gelistet und Duplikate automatisch entfernt. Die Oberfläche der Astroprot-Datenbank ist in das SynProt Web-Portal integriert (in Präparation: Pielot *et al.*, 2012) und steht bisher noch nicht für einen öffentlichen Zugang zur Verfügung.

Für den Vergleich der BDNF-Expressionsstudien mit der Astroprot-Datenbank wurden folgende Publikationen verwendet: (Liao *et al.*, 2007), (Schratt *et al.*, 2004), (Manadas *et al.*, 2009) und anhand des Gennamens in Excel (*Microsoft Office*) mit den Einträgen der Astroprot-Datenbank verglichen.

3 Ergebnisse

3.1 Modifikation der Methionin-Bindetasche der *Mus musculus* Methionyl-tRNA-Synthetase

Für massenspektrometrische Analysen lassen sich neben den konventionellen Aminosäureisotopen auch nicht-kanonische Aminosäuren, die durch den endogenen Translationsapparat prozessiert werden können, für die Markierung von neu synthetisierten Proteinen einsetzen. Die Verwendung von Aminosäureisotopen oder von nicht-kanonischen Aminosäuren wie Azidohomoalanin (AHA) und Homopropargylglycin (HPG) ermöglicht jedoch keine Unterscheidung der Proteine unterschiedlichen zellulären Ursprungs, wenn Proteine aus Mixkulturen oder Geweben markiert werden. Um eine Zell-spezifische Markierung von Proteinneusynthese zu erreichen, verwendeten Link *et al.* (2006) und Tamrikulu *et al.* (2009) in *E.-coli* eine weitere nicht-kanonische Aminosäure, das Azidonorleucin (ANL). Auf Grund einer strukturell längeren Seitenkette der Aminosäure lässt sich ANL lediglich durch eine Methionyl-tRNA-Synthetase (MetRS) aktivieren, die eine erweiterte Bindetasche für Methionin aufweist. Die Expression einer so modifizierten MetRS ermöglicht somit eine Verwendung von ANL durch den endogenen Translationsapparat, während Zellen, die lediglich die endogene MetRS exprimieren, nicht in der Lage sind ANL zu prozessieren.

Durch randomisierte Mutation von bis zu vier bzw. drei Aminosäuren der Bindetasche der *E.-coli* Methionyl-tRNA-Synthetase gelang die Aktivierung von ANL, eine folgende Verknüpfung mit der Methionin-tRNA und ein Einbau der Aminosäure in neu synthetisierte Proteine (Link *et al.*, 2006; Tanrikulu *et al.*, 2009). Dabei fanden sich verschiedene Kombinationen ausgetauschter Aminosäuren, die zu einer ANL-Bindung und -Aktivierung führten. Lediglich der Austausch eines Leucins (L13) zu Glycin war in allen MetRS-Mutanten auffindbar. Unter den MetRS-Mutanten zeigte sich besonders die L13G-Mutante effizient in der Aktivierung von ANL, während die PLL-Mutante sich besonders durch die hohe Selektivität gegenüber Methionin auszeichnete (Link *et al.*, 2006; Tanrikulu *et al.*, 2009).

Da die *E.-coli*-MetRS strukturell den Enzymen anderer eukaryotischer Spezies sehr ähnelt, scheint es möglich die Strategie anhand der in *E.-coli* erzielten Ergebnisse auf das eukaryotische System zu übertragen (Abb. 3.1, B). Hierfür wurden die *E.-coli* Mutanten L13G, NLL, sowie PLL auf Grund der Effizienz des ANL-Einbaus und der Selektivität gegenüber Methionin als besonders geeignet eingestuft und auf konservierte Aminosäuren in der *Mus musculus* MetRS untersucht. Dabei zeigt sich eine hohe Übereinstimmung in den Aminosäuresequenzen im Bereich der Methionin-Bindetasche des Enzyms über verschiedenste Spezies, wie *Ceanorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* oder *Mus musculus* (Abb. 3.1, D). Dies schließt die Aminosäuren His301, Leu13 und Tyr260 ein, die

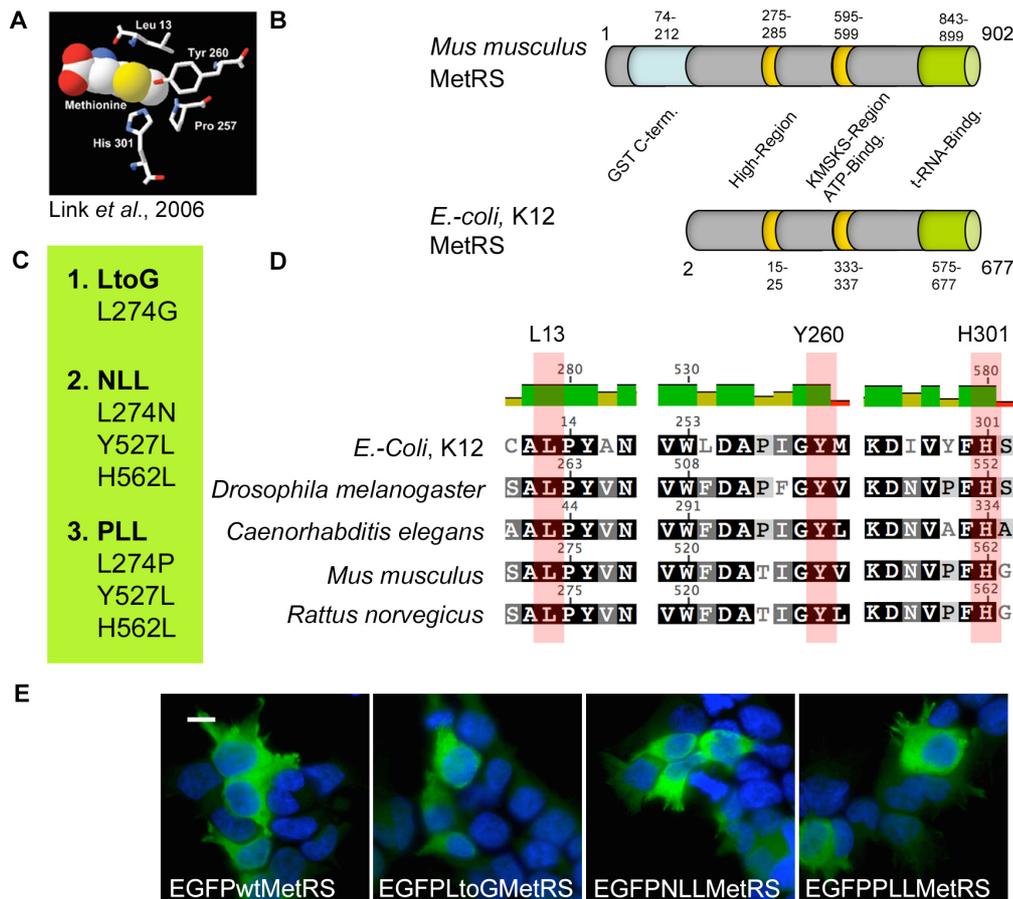


Abb. 3.1: Modifikation der Methionin-Bindetasche von *Mus musculus* MetRS

Anhand der Modellierung der *E.-coli*-MetRS-Bindetasche lassen sich die Aminosäuren His301, Leu13 und Tyr260 identifizieren, die sich auf Grund der Nähe ihrer Seitenketten zum Substrat als entscheidend für eine mögliche Modulation der Bindetasche erweisen (Link *et al.*, 2006) (A). Da sich die *E.-coli*-MetRS strukturell nur wenig von der *Mus musculus*-MetRS unterscheidet (B) und die für die Größe der Bindetasche verantwortlichen Aminosäuren über verschiedenste Spezies konserviert sind, kann eine potentielle Übertragung der entsprechenden Mutationen auf ein Maus-Modell durchgeführt werden (D).

Anhand von PCR-vermittelten Punktmutationen konnte ein Austausch von Aminosäuren in der Bindetasche der *Mus musculus*-MetRS erfolgen. Analog zu MetRS-Mutanten, die in *E.-coli* bereits eine effiziente Aktivierung von ANL zeigten, wurden drei verschiedene *Mus musculus*-MetRS-Mutanten mit den in (C) dargestellten Kombinationen von Aminosäureaustauschen ausgewählt und als EGFP-Fusionsproteine generiert (C).

Die Überexpression der *Mus musculus*-MetRS-Mutanten in Hek293T als EGFP-Fusionsproteine zeigt die erwartete zytoplasmatische Lokalisation sowohl des Wildtyp-Enzyms als auch der Mutanten LtoG, NLL und PLL.

(Maßstab entspricht 10 μ m)

unter den MetRS-Mutanten von Link *et al.* als ausgetauscht vorgefunden wurden (Abb. 3.1, A). Um eine Integration von ANL an Stelle von Methionin in neu synthetisierten Proteinen ebenfalls im eukaryotischen Zellsystem zu ermöglichen, wurden analog zu den bereits identifizierten *E.-coli*-MetRS-Mutanten Aminosäureaustausche in der *Mus musculus*-MetRS durchgeführt (Link *et al.*, 2006; Tanrikulu *et al.*, 2009). Für diese Mutanten wurde zum einen der Austausch des Leucins zu Glycin (L274G) analog zur L13G-Mutante der *E.-coli*-MetRS

ausgewählt, da sie durch die hohe Aktivierungseffizienz besonders geeignet scheint. Zudem weist die wiederholte Identifizierung dieses Aminosäureaustausches in den MetRS-Mutanten, die diesen Austausch allein oder in Kombination mit weiteren Mutationen zeigten, auf eine besondere Bedeutung bei der Formation der Bindetasche hin.

Zusätzlich wurden zwei weitere Kombinationen ausgewählt, die jedoch ähnlich wie in *E.-coli* den Austausch des Leucins mit einschlossen (Abb 3.1, C). Dabei zeigt auch hier die NLL-MetRS-Mutante in *E.-coli* eine hohe Aktivierungseffizienz, während die *E.-coli*-PLL-MetRS-Mutante eine hohe Selektivität gegenüber ANL aufweist und somit eine konkurrierende Bindung und Aktivierung von Methionin nur bedingt zulässt (Tanrikulu *et al.*, 2009).

Für die Generierung des mutierten Enzyms wurden mittels PCR Punktmutationen in die cDNA der *Mus musculus* MetRS eingefügt und die kodierende Sequenz in den Expressionsvektor pEGFP-C1 oder pEGFP-N2 subkloniert. Die Überexpression der EGFP-Fusionsproteine zeigt wie erwartet eine zytoplasmatische Lokalisation in Hek293T. Dabei kann bei Lipid-vermittelter Transfektion kein signifikanter Unterschied zwischen der Expression der Wildtyp-MetRS und den MetRS-Mutanten EGFP_{LtoG}MetRS, EGFP_{NLL}MetRS und EGFP_{PLL}MetRS, sowie zwischen der Morphologie und Vitalität der überexprimierenden Zellen festgestellt werden (Abb. 3.1). Bei einer starken Expression, die durch Kalziumphosphat-Transfektion erreicht werden kann, sind vereinzelt jedoch Proteinaggregate in Hek293T-Zellen, die die EGFP_{LtoG}MetRS oder die EGFP_{NLL}MetRS verstärkt exprimieren, zu beobachten. Zellen, die EGFP_{LtoG}MetRS weniger stark exprimieren sind jedoch nicht von der Kontrolle in ihrer zytoplasmatischen Lokalisation zu unterscheiden. Da bei Lipid-vermittelter Transfektion eine Überexpression der MetRS-Mutanten in Hek293T-Zellen keine Auffälligkeiten zeigt, wurden die Mutanten in diesem Zellsystem auf ihre Fähigkeit ANL zu aktivieren, überprüft.

3.2 Nachweis von ANL-Integration in neu synthetisierte Proteine durch eine modifizierte MetRS in Hek293T

Für eine Analyse der Fähigkeit der modifizierten MetRS-Fusionsproteine ANL zu aktivieren und so einen Einbau in neu synthetisierte Proteine zu ermöglichen, kann man sich die Azid-Gruppe in der Seitenkette der nicht-kanonischen Aminosäuren ANL zu Nutze machen. Mit Hilfe der Klick-Reaktion lassen sich so neu synthetisierte Proteine, die ANL anstelle von Methionin integriert haben, mit einer Sonde markieren. Diese Sonde erlaubt die Begutachtung der ANL-Integration in Proteine durch die Visualisierung über eine Fluoreszenzsonde (FUNCAT) oder eine Biotinsonde (BONCAT).

Um die Effizienz der ANL-Aktivierung durch die MetRS-Mutanten zu überprüfen, wurden die MetRS-Mutanten LtoG, NLL und PLL, sowie das Wildtyp-Enzym als EGFP-Fusionsprotein in Hek293T-Zellen überexprimiert. Anhand der EGFP-Fluoreszenz zeigt sich eine vergleichbare

Expressionsrate mit ca. 75% an transfizierten Zellen. Im Folgenden wurden die Zellen mit 4 mM ANL bzw. AHA in Abwesenheit von Methionin für 1 h inkubiert, um die Aktivierung von AHA durch die endogene MetRS, oder die Aktivierung von ANL durch die überexprimierte MetRS und den anschließenden Einbau in neu synthetisierte Proteine zu ermöglichen.

Nach Inkubation mit den nicht-kanonischen Aminosäuren kann keine erhöhte Zellsterberate festgestellt werden und auch die Qualität und Konzentration der gewonnenen Proteine im Coomassie-Gel weist keine auffälligen Unterschiede zwischen ANL- bzw. AHA-markierten Proteinextrakten auf (Abb. 3.2).

Der nach Zellyse gewonnene Proteinextrakt wurde der Kupfer-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition (Klick-Reaktion) unterzogen, um die Biotin-Alkin-Sonde an die Azidgruppe der Aminosäureseitenkette des ANL bzw. AHA kovalent zu binden. Die so markierten, neu-synthetisierten Proteine konnten im Folgenden mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden. Hierbei zeigt sich, dass der Proteinextrakt der Hek293T-Zellen, die mit EGFP-LtoGMetRS transfiziert und mit ANL inkubiert wurden, deutlich Biotin-markierte Proteine enthält (Abb. 3.2). Dabei lassen sich Proteine unterschiedlichster Größe von nur ca. 10 kDa bis hin zu hochmolekularen Proteinen über die Biotin-Alkin-Sonde nachweisen. Die geringe Markierungseffizienz der niedrigmolekularen Proteine ist auf eine geringere Zahl an Methionin-Resten in den Proteinsequenzen zurückzuführen, da dies mögliche Integrationsseiten für ANL begrenzt. In den Extrakten der NLLMetRS- und der PLLMetRS-Mutanten zeigen sich im Vergleich nur wenige Biotin-markierte Proteine im Western-Blot nach Inkubation mit ANL. Parallel dazu ist in den Extrakten der Zellen, die die Wildtyp-MetRS überxprimieren und mit 4mM AHA inkubiert wurden, ein deutlich höherer Anteil an Biotin-markierten Proteinen nachweisbar. Inwiefern dies auf eine verringerte Aktivierungseffizienz der EGFP-LtoGMetRS zurückzuführen ist, lässt sich jedoch nicht beurteilen, da ANL-markierte Proteine lediglich von den Zellen beigesteuert werden, die das modifizierte Enzym exprimieren, während AHA nicht nur durch das wildtypische Fusionsprotein, sondern auch durch die zelleigene, endogene MetRS aktiviert wird.

Der spezifische Einbau von ANL ist abhängig von Proteinneusynthese. So zeigt sich durch die Behandlung der Zellen während der ANL-Inkubation mit den Proteinsyntheseinhibitoren Anisomycin und Cycloheximid eine deutliche Verringerung von Biotin-markierten Proteinen (Abb. 3.2). Dass der Einbau von ANL in Proteine spezifisch für Zellen ist, die das modifizierte Enzym exprimieren, belegt die Inkubation von Hek293T-Zellen mit 4 mM ANL, die lediglich EGFPwtMetRS überexprimieren. Hier lassen sich nur wenige bis keine Biotin-markierten Proteine detektieren.

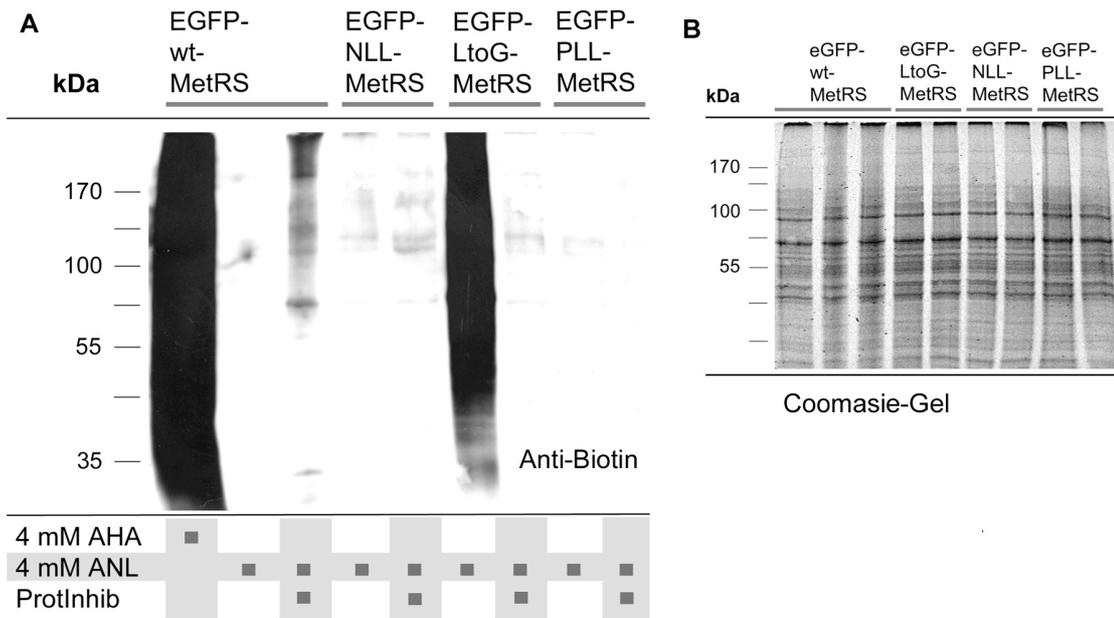


Abb 3.2.: Nachweis von ANL-Einbau in neu synthetisierte Proteine durch BONCAT

Hek293T-Zellen, die EGFP_{LtoG}-/NLL-/PLL_{MetRS} oder EGFP_{wt}_{MetRS} überexprimieren, wurden für 1 h mit 4 mM AHA bzw. ANL in Abwesenheit von Methionin inkubiert. Nach Zellyse und Proteinextraktion kann der Einbau von ANL in neu synthetisierte Proteine nach Klick-Reaktion mit der Biotin-Alkin-Sonde im Western-Blot mit Hilfe von Antikörpern gegen Biotin nachgewiesen werden.

Zellen, die EGFP_{LtoG}_{MetRS} exprimieren, zeigen ein positives Biotin-Signal als Nachweis für die ANL-Integration in neu synthetisierte Proteine, wohingegen die Proteinextrakte der EGFP_{NLL}_{MetRS}- und EGFP_{PLL}_{MetRS}-überexprimierenden Zellen keine oder nur geringe Mengen an biotinylierten Proteinen aufweisen (A). Die Zugabe von Proteinsyntheseinhibitoren oder die Zugabe von ANL zu Wildtyp-MetRS (EGFP_{wt}_{MetRS}) überexprimierenden Zellen verhindert den Einbau von ANL in neu synthetisierte Proteine. Das dazugehörige Coomassie-Gel zeigt gleiche Menge und Qualität der verglichenen Proteinextrakte (B).

Ein weiterer Nachweis des Einbaus von ANL in neu synthetisierte Proteine kann anhand der Fluoreszenzsonde erfolgen, die zusätzlich eine Aussage über die Lokalisation von markierten Proteinen innerhalb der Zelle erlaubt. Dabei wurden analog zum BONCAT-Verfahren, EGFP_{LtoG}_{MetRS}, EGFP_{NLL}_{MetRS}, EGFP_{PLL}_{MetRS} oder EGFP_{wt}_{MetRS} überexprimierende Hek293T-Zellen mit 4 mM ANL oder AHA für 1 h in Methionin-freiem Medium inkubiert. Nach Fixierung der Zellen wird durch Klick-Reaktion eine Tamra-Alkin-Sonde kovalent an die Azidgruppe des ANL gebunden, so dass eine Analyse des ANL-Einbaus in neu synthetisierte Proteine mittels Fluoreszenzmikroskopie möglich ist.

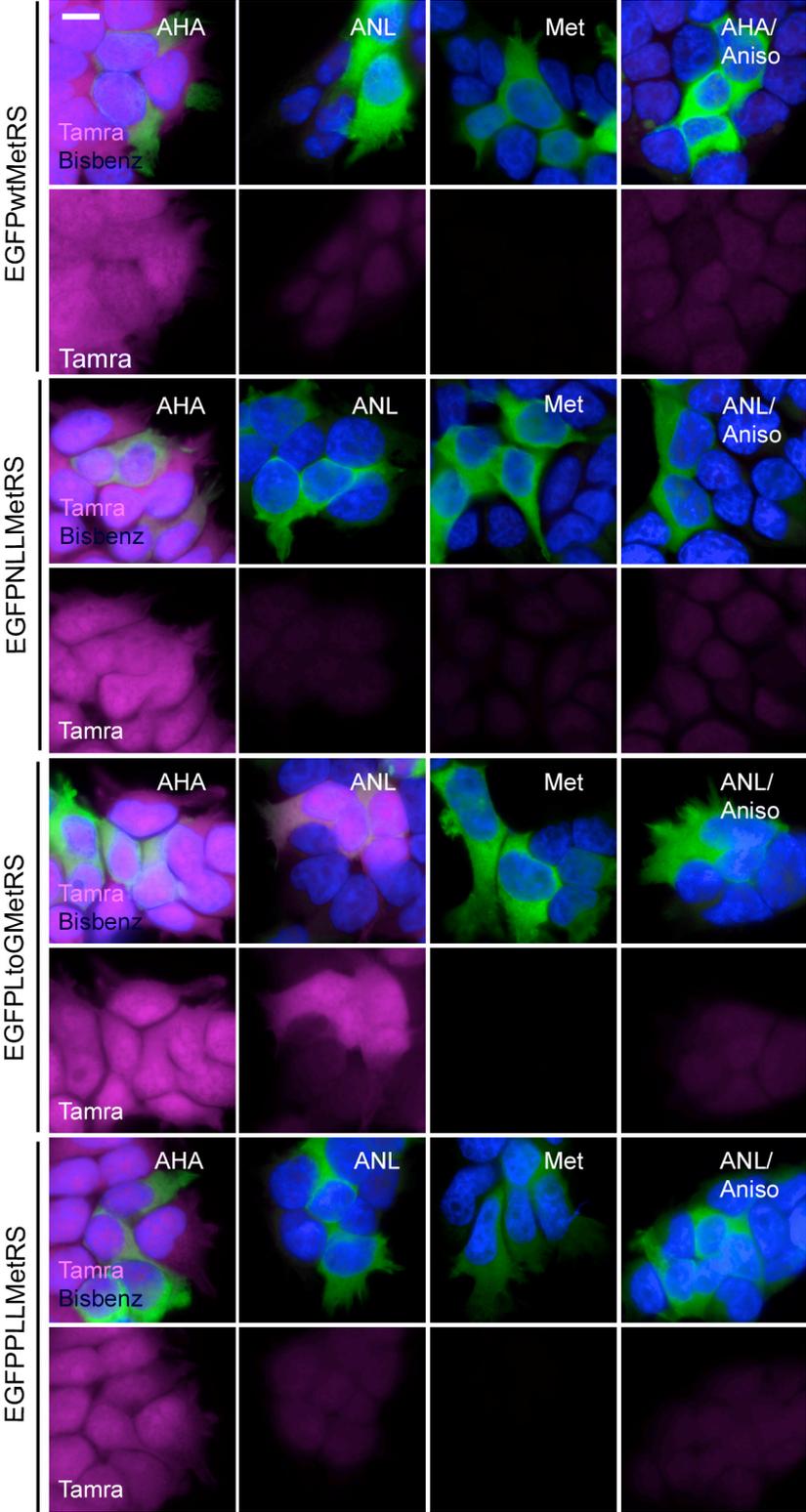


Abb. 3.3: Nachweis von ANL-Einbau in neu synthetisierte Proteine durch FUNCAT

Hek293T-Zellen, die EGFP_{LtoG/NLL/PLL}- oder -Wildtyp-MetRS überexprimieren, wurden mit 4 mM AHA bzw ANL oder Methionin für 1 h in Methionin-freiem Medium inkubiert. Nach Fixierung der Zellen und Klick-Reaktion mit einer Tamra-Alkin-Sonde zeigt sich der Einbau von AHA oder ANL in neu synthetisierte Proteine anhand der Tamra-Fluoreszenz.

Der Einbau von AHA führt unabhängig vom überexprimiertem Enzym zu einem deutlichen Fluoreszenzsignal in Zellen, die EGFP_{wtMetRS} exprimieren und in EGFP-negativen Zellen, wohingegen der Einbau von ANL in Proteine nur in Zellen erfolgt, die EGFP_{LtoG}MetRS exprimieren, während keine ANL Aktivierung durch die EGFP_{NLL}MetRS oder EGFP_{PLL}MetRS nachweisbar ist. Die Spezifität des ANL-Einbaus in neu synthetisierte Proteine zeigt sich durch die Zugabe des Proteinsyntheseinhibitors Anisomycin. Die ANL-Aktivierung kann lediglich durch die EGFP_{LtoG}MetRS, jedoch nicht durch die EGFP_{wtMetRS} erfolgen. Ein erhöhtes Tamra-Signal findet sich im Zellkern und verteilt im Zytoplasma der Zellen. Unterschiede in der Tamra-Intensität und Lokalisation von AHA-markierten oder ANL-markierten Proteinen sind nicht feststellbar.

(Maßstab entspricht 10 µm)

Dabei zeigt sich auch hier ein erfolgreicher ANL-Einbau in Proteine, wenn die EGFP_{LtoG}MetRS in Hek293T-Zellen exprimiert wird, während untransfizierte Zellen oder Zellen, die EGFP_{wtMetRS} exprimieren, keine Markierung durch die Fluoreszenzsonde aufweisen (Abb. 3.3). Neu synthetisierte Proteine, die mit der Fluoreszenz-Sonde markiert sind, sind im Zytoplasma und verstärkt im Nukleus lokalisiert, vergleichbar mit den EGFP-_{wtMetRS}-exprimierenden Zellen, die mit AHA inkubiert wurden. Dabei ist die Intensität des Fluoreszenzsignals nach ANL-Einbau vergleichbar mit dem Signal, das durch die AHA-Markierung in EGFP-_{wtMetRS} überexprimierenden Zellen zu beobachten ist. Dies weist auf eine ähnliche Aktivierungseffizienz von ANL durch die EGFP-_{LtoG}MetRS im Vergleich zu AHA hin. Zusätzlich gibt der quantitativ ähnliche Anteil an markierten, neu synthetisierten Proteinen nach ANL Inkubation einen Hinweis darauf, dass die Überexpression der EGFP-_{LtoG}MetRS und der Einbau von ANL in neu synthetisierte Proteine in dem analysierten Zeitraum von 1 h keine erkennbaren Auswirkungen auf einen komplexen zellulären Prozess, wie der Proteinneusynthese zeigt. Kongruent mit den durch BONCAT ermittelten Ergebnissen belegt auch hier eine fehlende Aktivierung von ANL durch EGFP_{wtMetRS} und die Reduktion der Tamra-Markierung nach Anisomycin-Behandlung die Zellspezifität der Markierung und ihre Abhängigkeit von Proteinneusynthese. Auch die durch BONCAT beobachtbare fehlende Aktivierung von ANL durch die EGFP_{NLL}MetRS und EGFP_{PLL}MetRS lässt sich unter Verwendung der Fluoreszenzsonde replizieren.

Da für die Analyse von Zell-spezifisch markierten, neu synthetisierten Proteinen die Identifizierung von ANL innerhalb des Proteins notwendig ist und sich die Frage stellt, ob ANL an unterschiedlichen Positionen im Protein toleriert wird, wurde der Einbau von ANL mittels Massenspektrometrie anhand eines EGFP-Fusionsproteins überprüft. Um sicherzustellen, dass das zu analysierende Protein in Zellen exprimiert wird, die ebenfalls die _{LtoG}MetRS überexprimieren, wurde EGFP_{LtoG}MetRS selbst für die Analyse verwendet. Für die ANL-Markierung wurde EGFP_{LtoG}MetRS in Hek293T-Zellen überexprimiert und nach der

Transfektion über Nacht mit 4 mM ANL und 100 μ M S-Adenosyl-Methionin (SAM) in Methionin-freiem Medium inkubiert, anschließend über Immunpräzipitation isoliert und daraufhin von PD Dr. Thilo Kähne (Institut für Experimentelle Innere Medizin, Universität Magdeburg) in der Massenspektrometrie analysiert.

EGFP MVSKGE ELFTG VVPI LVEL DGDVNGHKFSVSGEGEGDATY GKL TLKFICT
 TGKLPVPWP TLVTT LTYGVQCFSRYPDHM KQHDFFKSA M PEGYVQERTIF
 FKDDGNYKTRAEV KFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEY NYNSHN
 VYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDG SVQLADHYQQNTPIGD GPVLLPDNH
 YLSTQSALS KDPNEKRDMVLEFVTAAGITLGMDEL YKSGLR SRAQASN
 SARGRGT

MetRS MRLFVSEGS PGLPVLAAAARARGRAELLISTV GPEECVVPFL
 TRPKVPVLQLDSGNYLFSASAICRYFFLLCGWEQDDL TNQWLEWEATELQ
 PVL SAALHCLVVQGGKGEDILG PLRRVLTHIDHLSRQNC PFLAGDTE SL
 ADIVLW GALYPLLQDPAYLPEELGALQSWFQTLSTQEPCQRAAETVLKQQ
 GVLALRLYLQKQPQPPEGR TVSNELEEEELATLSEEDIVTAVA AWE
 KGLESLPPLKLQ QHPVLPV PGER NVLIT SAGPYVNNVPHLGN IIGCVLSA
 DVFARYCRLRQWNTLYLCGTDEYGTATETKAM EEEGLTPREICDKYHAIHA
 DIYRWFGISFDTFGR TTPQQTKITQDIFQRLLTRGFVLRDTVEQLRCER
 CARFLADRFVEG VCPFCGYEEARGDQCDRCGKLINAIELKKPQCKICRSC
 PVVRSSQHLFLDLPKLEKRL EDWLGKTVPGSDWTPNARFIIRSWLRDGLK
 PRCITRDLK WGPVPLEGFEDKVFYVWF DATIGYVSITANYTDQWEKWWK
 NPEQVDLYQFMAKDNV PPHGLVFP CSVLGAEDNYTLVKHIIATEYLN YED
 GKFSKSRGIGVFGDMAKDTGIPADIWRFYLLYIRPEGQDSAFS WTDLLIK
 NNSELLNNLGNFINRAGM FVSKFFGGCVPEM ALTPDDRRLVAHVSWELQH
 YHQLLEKVRIRDALRSILTISR HGNQYIQVNEPWKRIKGGEMDRQRAGTV
 TGM AVNMAALLSVMLQP YMP TVSS TIQTQLQLPPAACRILATSFICTLPA
 GHRIGTVSPLFQKLENDQIENLRQRFGGQAKGSPKPAAVEAVTAAGSQH
 IQTLTDEVTKQGNVVRELKAQKADKNQVA AEVAKLLDLK KQLALAE GKPI
 ETPKGK KKK

Abb. 3.4: Nachweis von ANL-Integration in Proteine durch Massenspektrometrie

Um den Einbau von ANL direkt zu überprüfen, wurde EGFP_{LtoG}MetRS in Hek293T Zellen überexprimiert, über Nacht in Methionin-freiem Medium mit 4 mM ANL und 100 μ M SAM inkubiert und mit Hilfe von Anti-GFP-Antikörper-gekoppelten, magnetischen Partikeln isoliert. Mit Hilfe der Massenspektrometrie konnten 59% der Sequenz der EGFP-LtoG_{MetRS} identifiziert werden (graue Markierung). Dabei fanden sich sieben von insgesamt 17 Methionin-Resten in den identifizierten Peptiden, von denen fünf Methionine durch ANL ersetzt identifiziert wurden (rote Markierung) und zusätzlich ein Methionin-Rest nicht sicher als ANL-positiv erkannt wurde (rosa-Markierung). Lediglich für einen Methionin-Rest konnte kein ANL-positives Peptid nachgewiesen werden (gelbe Markierung).

Dabei konnten Peptide der LtoG_{MetRS} identifiziert werden, die einen prozentualen Anteil von 59% des EGFP_{LtoG}MetRS-Proteins abdecken. Innerhalb dieser Peptide finden sich sieben Methioninreste. Anhand dieser Peptide zeigt sich der direkte Nachweis des Einbaus von ANL mittels Massenspektrometrie. Mit Ausnahme eines Methioninrestes, für den kein Peptid mit ANL anstelle von Methionin identifiziert wurde und eines Rests, der auf Grund einer geringen Stringenz nicht eindeutig als ANL positiv zugeordnet werden konnte, lässt sich ANL anstelle von fünf verschiedenen Methioninresten im Protein nachweisen und wird somit an diesen Positionen im Protein toleriert (Abb. 3.4).

Die hier durchgeführten Experimente zeigen, dass von den drei getesteten Mutanten lediglich die EGFP-LtoG_{MetRS} in der Lage ist, ANL effizient zu aktivieren und den Einbau von ANL in

neu synthetisierte Proteine zu ermöglichen. Mit der Fluoreszenz- oder Biotin-Alkin-Sonde markierte Proteine sind spezifisch in EGFP-LtoGMetRS exprimierenden Zellen auffindbar. Markierte Proteine zeigen eine breite Varianz sowohl in Größe als auch in der Lokalisation der Proteine innerhalb der Zelle und unterscheiden sich nicht von Proteinen, die nach dem Einbau von AHA mittels Biotin-oder Fluoreszenzsonde nachweisbar sind. Zusätzlich kann der ANL-Einbau direkt mittels Massenspektrometrie in verschiedenen Peptiden nachgewiesen werden und wird an unterschiedlichen Positionen anstelle von Methionin, beispielhaft gezeigt an der EGFP-LtoGMetRS, toleriert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine, in *E.-coli* gefundene Mutation der MetRS, die zu einer Erweiterung der Methionin-Bindetasche führt, auf das murine System übertragbar ist. Mit Hilfe des L274G-Austauschs ist die LtoGMetRS-Mutante in der Lage, erfolgreich ANL zu aktivieren und kann somit für weitere Zell-spezifische Proteinmarkierungen verwendet werden. Somit wird im Folgenden die LtoGMetRS-Mutante genutzt, um GINCAT (*Genetically introduced noncanonical amino acid tagging*) zu etablieren und für eine Analyse Astrozyten-spezifischer Proteinneusynthese einzusetzen.

3.3 Optimierung von GINCAT für die Markierung Zell-spezifischer Proteinsynthese

Die Anwendung von nicht-kanonischen Aminosäuren für die Markierung neu synthetisierter Proteine wurde erst vor wenigen Jahre etabliert und trotz ähnlicher experimenteller Vorgehensweisen, wie bei der Aminosäureisotopmarkierung unterscheiden sich die nicht-kanonischen Aminosäuren auf Grund der veränderten Struktur der Aminosäureseitenkette von konventionellen Aminosäureisotopen. Somit ist auch auf Grund der Abhängigkeit von der Aktivierung durch die LtoGMetRS eine Charakterisierung des Einsatzes von ANL nützlich. Zusätzlich erlaubt, im Gegensatz zu den Aminosäureisotopen, die reaktive Azid- oder Alkingruppe eine direkte Analyse des Markierungsverlaufes und ermöglicht so die Analyse von der Neusynthese bis hin zum Abbau markierter Proteine.

Für die weitere Anwendung von ANL in Verbindung mit der LtoGMetRS in GINCAT wurden im Folgenden einige Parameter, wie die optimale Konzentration von ANL und zusätzliche Anwendungsmöglichkeiten, wie die *in-vivo*-Applikation oder die Verwendung von nicht-kanonischen Aminosäuren in *Pulse-Chase*-Experimenten analysiert.

Um eine höchstmögliche Markierungseffizienz von neu synthetisierten Proteinen zu erreichen, wurde die optimale Konzentration von ANL in Hek293T-Zellen ermittelt. Dabei wurden die Zellen transient mit dem Konstrukt EGFP-LtoGMetRS transfiziert und auf gleiche Transfektionseffizienz überprüft. Einer Inkubation der Zellen mit unterschiedlicher Konzentration an ANL in Methionin-freiem Medium folgte die Zellyse und nach der Klick-Reaktion über das Biotin-Alkin-Label konnte ANL in neu synthetisierten Proteinen identifiziert

werden (Abb. 3.5). Dabei zeigt die Western-Blot-Analyse die höchste Menge an Biotin-markierten Proteinen bei einer Konzentration von 4 mM ANL. Geringere Konzentrationen von ANL führen zu einem geringeren Anteil an Biotin-markierten Proteinen und eine höhere Konzentration von 6 mM oder 8 mM zeigen keinen zusätzlichen Effekt bei gleich-geladenen Proteinmengen. Demnach kann für eine optimale Markierung von neu synthetisierten Proteinen ANL in einer Konzentration von 4 mM eingesetzt werden. Diese Ergebnisse sind kongruent mit Resultaten, die bereits für die nicht-kanonische Aminosäure AHA erzielt werden konnten (Dieterich *et al.*, 2006).

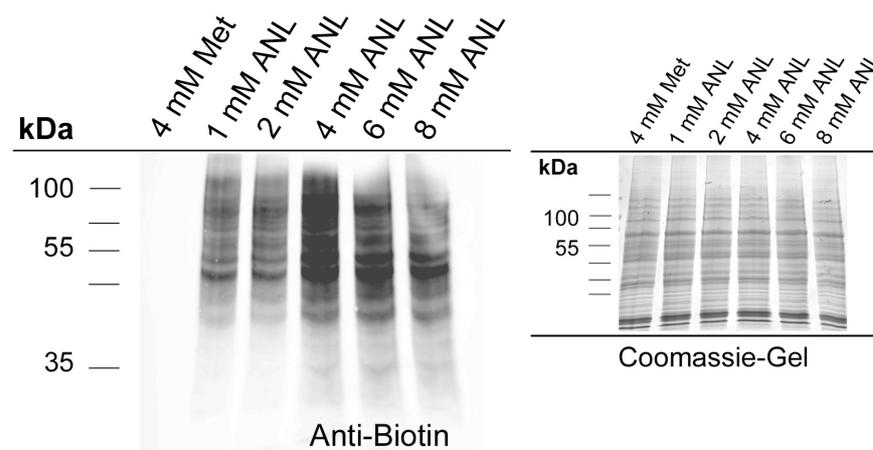


Abb. 3.5: Optimierung der ANL-Konzentration

Hek293T-Zellen wurden mit EGFP_{LtoGMetRS} transient transfiziert und am folgenden Tag mit 4 mM Methionin (Met) oder mit 1, 2, 4, 6 oder 8 mM ANL für 1h in Methionin-freiem Medium inkubiert. Nach Zellyse und Klick-Reaktion des Proteinextraktes mit der Biotin-Alkin-Sonde zeigt sich mittels Western-Blot-Analyse die stärkste Biotin-Markierung der Proteine bei einer ANL-Konzentration von 4 mM. Eine geringere Konzentration von ANL führt zu einem geringeren Anteil von Biotin-markierten Proteinen bei gleich geladenen Proteinmengen (siehe Coomassie-Färbung), wohingegen eine höhere ANL-Konzentration von 6 mM und 8 mM im Vergleich zu 4 mM ANL keinen zusätzlichen Anteil an Biotin-markierten Proteinen aufweist.

Da für den Nachweis der Expression der LtoGMetRS die Verwendung des Enzyms als Fusionsprotein mit einem Marker wie EGFP von Vorteil ist, wurde in Zusammenarbeit mit Christine Freitag überprüft inwieweit die Fusion mit EGFP die Enzymaktivität durch eine mögliche sterische Hinderung oder Fehlfaltung der aktiven Zone des Enzyms beeinflusst (Freitag, 2010).

Dabei wurden wie zuvor beschrieben Hek293T-Zellen mit Fusionsproteinen der LtoGMetRS transient transfiziert, die entweder C-terminal (LtoGMetRSEGFP) oder N-terminal (EGFP_{LtoGMetRS}) mit EGFP fusioniert exprimiert werden. Nach anschließender ANL-Inkubation der Zellen für 2 h und Klick-Reaktion der Proteinextrakte mit der Biotin-Alkin-Sonde zeigen sich in der Western-Blot-Analyse von Biotin-markierten Proteinen keine signifikant quantitativen Unterschiede in der Markierungseffizienz durch ANL. So finden sich bei einem

gleichen Anteil an geladenen Proteinen ähnlich starke Biotin-Signale in Proteinextrakten von Zellen, die entweder EGFP_{LtoGMetRS} oder LtoGMetR_{EGFP} überexprimieren (Abb. 3.6). Auch hier wird deutlich, dass das erhaltene Biotin-Signal im Western-Blot nach Integration von ANL oder AHA spezifisch für neu synthetisierte Proteine ist, da sich durch die Verwendung des Proteinsyntheseinhibitors Anisomycin keine Biotin-Markierung nachweisen lässt.

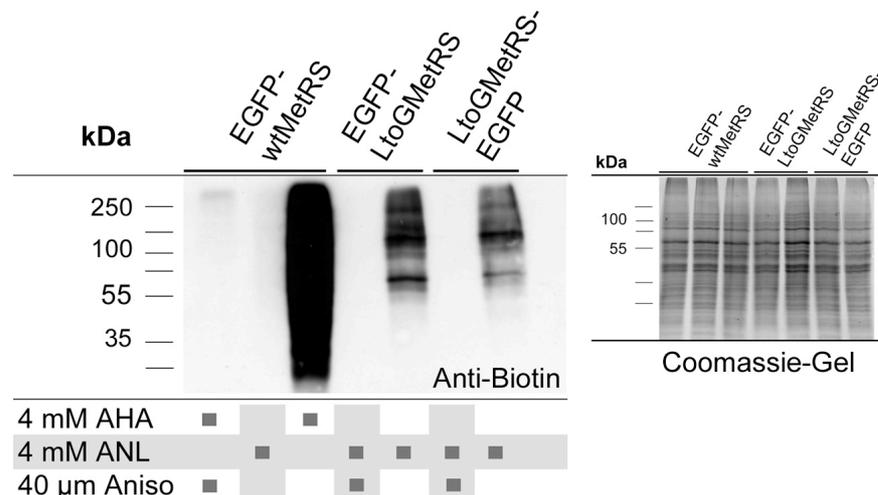


Abb. 3.6: Markierungseffizienz des Fusionsproteins EGFP_{LtoGMetRS} und LtoGMetR_{EGFP}

Hek293T-Zellen wurden mit EGFP_{LtoGMetRS} oder mit LtoGMetR_{EGFP}, bzw. als Kontrolle mit EGFP_{wtMetRS} transient transfiziert und mit 4 mM ANL oder AHA mit oder ohne 40 μm Anisomycin (Aniso) für 2 h in Abwesenheit von Methionin inkubiert. ANL-integrierte Proteine wurden mit der Biotin-Alkin-Sonde mittels Klick-Reaktion markiert und durch eine Western-Blot-Analyse identifiziert.

Dabei zeigen sich bei gleich geladenen Proteinmengen keine quantitativen Unterschiede zwischen den Biotin-markierten Proteinen, wenn ANL entweder durch EGFP_{LtoGMetRS} oder LtoGMetR_{EGFP} aktiviert wird. Der Nachweis von integriertem ANL ist spezifisch, da durch die Behandlung mit dem Proteinsyntheseinhibitor Anisomycin das Biotin-Signal fast vollständig reduziert werden kann.

Somit zeigt sich keine inhibitorische Wirkung des EGFP innerhalb des Fusionsproteins auf die Aktivität der LtoGMetRS, wenn EGFP N- oder C-terminal mit dem Enzym fusioniert ist und kann als Markierung für die Expression der LtoGMetRS in Folgeexperimenten verwendet werden.

Des Weiteren wurde untersucht inwieweit sich die nicht-kanonischen Aminosäuren über einen längeren Markierungszeitraum verhalten. Dabei ist besonders interessant, ob die einmalige Gabe dieser Aminosäuren ausreichend ist, um die Markierung neu synthetisierter Proteine über einen längeren Zeitraum zu gewährleisten. Steht die Aminosäure im Überschuss über einen längeren Markierungszeitraum für den Einbau in neu synthetisierte Proteine zur Verfügung, so sollte sich die graduelle Zunahme markierter Proteine mit Hilfe von FUNCAT und BONCAT nachweisen lassen.

Um diese Aspekte näher zu untersuchen, wurden Experimente mit der nicht-kanonischen Aminosäure AHA durchgeführt. Dies erlaubt eine quantitative Einschätzung der Markierung ohne eine mögliche Varianz der Markierung durch die Unterschiede in der Überexpression der EGFP_{LtoG}MetRS in Betracht ziehen zu müssen. Zusätzlich wurden die Experimente in Neuron-Glia-Kokulturen durchgeführt, da dieses System gegenüber möglichen toxischen Effekten weitaus sensitiver ist und so auch eine Einschätzung der Zellvitalität nach Markierung mit den nicht-kanonischen Aminosäuren erlaubt.

Hierfür wurden Kulturen hippokampaler Neurone aus Ratte (DIV14) für 2 h, 4 h oder 6 h mit 4 mM AHA bzw. für 6 h mit Methionin in Methionin-freiem Medium inkubiert, anschließend fixiert und integriertes AHA mittels Klick-Reaktion mit der Tamra-Alkin-Sonde sichtbar gemacht. Dabei zeigt sich anhand des Intensitäts-kodierten Tamra-Signals ein deutlicher Anstieg an Tamra-markierten Proteinen mit zunehmender Inkubationszeit der Zellen mit AHA. Dies lässt sich besonders anhand der feinen Strukturen, wie Filopodia und dendritischen *Spines* verdeutlichen, die nach 6 h Inkubationszeit mit AHA besonders prominent markiert sind (Abb. 3.7). Die immunzytochemische Färbung des neuronalen Intermediärfilaments MAP2 zeigt keine deutlichen morphologischen Veränderungen nach AHA-Inkubation und auch die Färbung gegen den präsynaptischen Marker Synaptophysin weist auf intakte interneuronale Verbindungen hin. Dies deutet trotz langer Markierungszeit und einem deutlich erhöhten Anteil an Proteinen, die AHA-Integration aufweisen, auf eine intakte Zellfunktion der Neurone.

Zusätzlich ist nicht untersucht, inwieweit im Rahmen des Protein-Umsatzes innerhalb der Zelle eine mögliche Wiederverwendung von AHA oder anderen nicht-kanonischen Aminosäuren für eine Proteinneusynthese nach Abbau von einst markierten Proteinen stattfindet. Dies ist besonders bei *Pulse-Chase*-Experimenten oder bei einer seriellen Markierung von Proteinneusynthese für eine genaue Definition des Markierungszeitraums interessant.

Um dies näher zu betrachten, wurden kortikale Kulturen (DIV14) aus Ratte für 6 h mit AHA in Methionin-freiem Medium inkubiert, anschließend mit Methionin-haltigem Kulturmedium, mit oder ohne zusätzlichen 4 mM Methionin, versetzt und nach 1 h, 24 h und 48 h auf die Anwesenheit von AHA in Proteinen mittels Klick-Reaktion und Western-Blot-Analyse hin untersucht. Dabei zeigt sich wie erwartet eine Reduktion von AHA-markierten Proteinen nach der Inkubation mit AHA mit der Zunahme der Kultivierungsdauer in Anwesenheit von Methionin (Abb 3.7). Methionin weist im Vergleich zu AHA eine weitaus höhere Affinität zur endogenen MetRS auf und wird somit präferenziell in neu synthetisierte Proteine eingebaut. Eine zusätzliche Gabe von 4 mM Methionin verhindert so im Überschuss eine Aktivierung von potenziell recyceltem AHA durch die Konkurrenz um die Bindestelle der MetRS. Durch die Zugabe von Methionin lässt sich anhand der Biotin-markierten Proteine jedoch keine verringerte Rate im Vergleich zu den Kulturen ausmachen, die in konditioniertem Medium gehalten wurden.

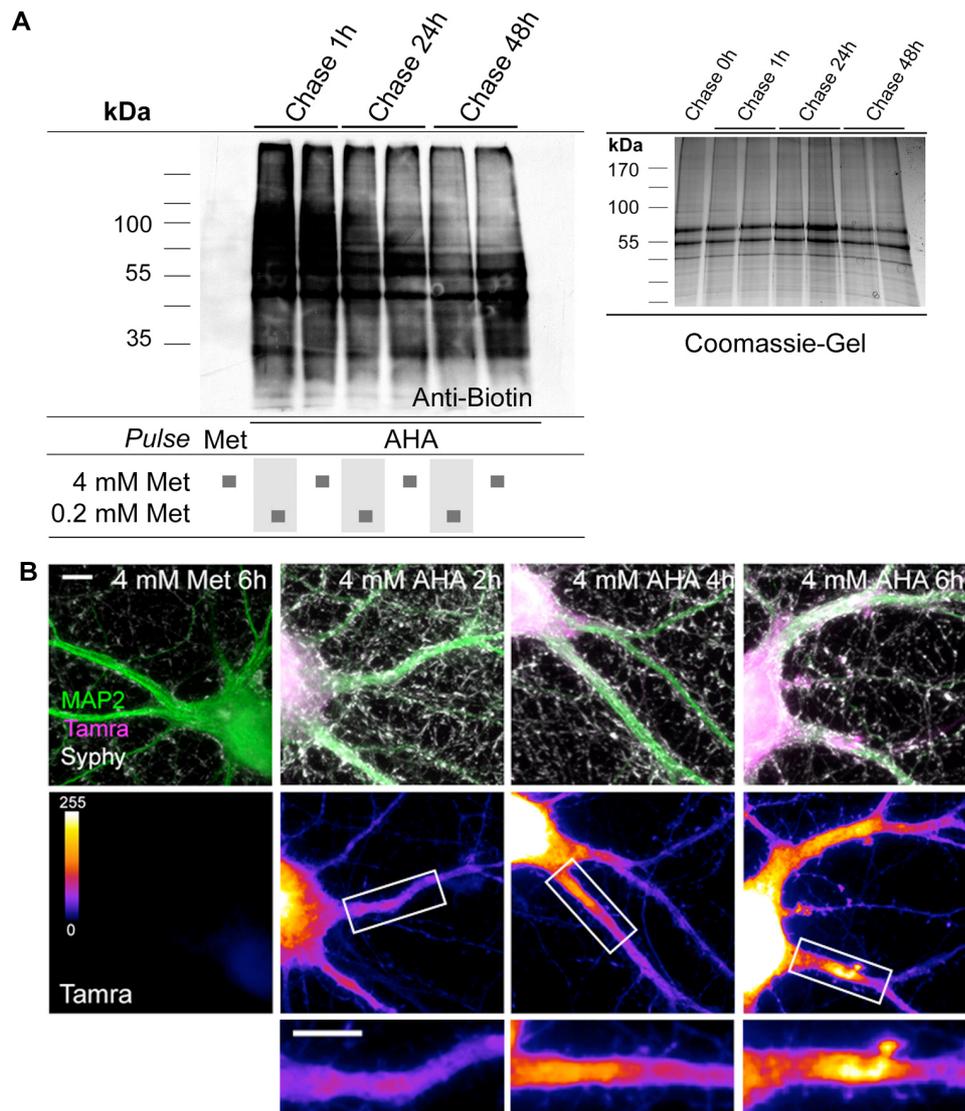


Abb. 3.7: Analyse der Markierungseigenschaften von AHA in neuronaler Zellkultur

Kortikale Kulturen aus Ratte (DIV14) wurden für 6 h nach einmaliger Zugabe von 4 mM AHA in Methionin-freiem Medium inkubiert und daraufhin für 1 h, 24 h bzw. 48 h in konditioniertem Medium mit oder ohne zusätzlichen 4 mM Methionin kultiviert. Nach Zellyse wurden die Proteinextrakte mittels Klick-Reaktion mit der Biotin-Alkin-Sonde markiert. Die folgende Western-Blot-Analyse zeigt eine abnehmende Konzentration an Biotin-markierten Proteinen mit zunehmender Kultivierungszeit in Anwesenheit von Methionin (B). Die Zugabe eines Überschusses an Methionin, das auf eine mögliche Neuaktivierung von recyceltem AHA inhibitorisch wirkt, zeigt keine Verringerung von Biotin-markierten Proteinen. Die Inkubation der Zellen mit 4 mM Methionin weist die Spezifität der Klick-Reaktion für AHA-markierte Proteine nach.

Hippokampale Kulturen aus Ratte (DIV14) wurden für 2 h, 4 h oder 6 h nach einmaliger Zugabe von 4 mM AHA oder Methionin in Methionin-freiem Medium inkubiert. Nach Fixierung und Klick-Reaktion erfolgt die Identifizierung AHA-markierter Proteine mit der Tamra-Alkin-Sonde. Dabei zeigt sich eine deutliche Zunahme des Tamra-Signals mit ansteigender Inkubationszeit (A). Zunehmend werden besonders feine Strukturen, wie dendritische Spines deutlicher markiert (siehe Ausschnitt). Die Intakte MAP2 und Synaptophysin-Färbung zeigt mit der Kontrolle vergleichbare Zellvitalität.

Selbst nach einem *Chase* von 48 h mit Methionin supplementiertem Medium ist der Gehalt an Biotin-markierten Proteinen im Vergleich zu den Zellen, die mit konditioniertem Medium gehalten wurden, nicht verringert. Somit kann eine relevante Wiederverwertung von AHA experimentell nicht festgestellt werden (Abb. 3.7). Diese Experimente zeigen, dass die Verwendung von nicht-kanonischen Aminosäuren wie AHA oder ANL als Methionin-Analoga in einem definierten Zeitfenster eine genaue Markierung von Proteinneusynthese in *Puls-Chase*-Experimenten oder bei einer seriellen Proteinmarkierung mit verschiedenen Aminosäureanaloga ermöglicht.

Weiterhin wurde die Möglichkeit getestet, die Zell-spezifische Markierung von Proteinsynthese mit ANL *in vivo* oder in Langzeitstudien zu verwenden. Um die Zellfunktion von Zellen, die LtoGMetRS nicht exprimieren, möglichst physiologisch zu erhalten, ist jedoch die Zugabe von Methionin unabdingbar. Tanrikulu *et al.*, (2009) konnten jedoch in *E.-coli* nur eine geringe Selektivität der L13G MetRS-Mutante für ANL gegenüber Methionin zeigen, während andere Mutanten eine deutlich selektivere Aktivierung von ANL gegenüber Methionin erlaubten.

Inwiefern die Aktivierung von ANL durch die *Mus musculus*-LtoGMetRS in Anwesenheit von Methionin beeinträchtigt wird, wurde somit experimentell überprüft. Hierfür wurden Hek293T-Zellen mit EGFP_{LtoGMetRS} transfiziert und mit 4 mM AHA bzw. ANL in Methionin-freiem Medium oder in Methionin-supplementiertem Medium inkubiert. Nach anschließender Zelllyse und Klick-Reaktion der Proteinextrakte konnte der Anteil der mit dem Biotin-Alkin-Label markierten Proteine analysiert werden.

Dabei zeigt sich, dass bei der Supplementierung von 4 mM AHA mit 4 mM Methionin die Markierung neu synthetisierter Proteine im Vergleich zu Zellen, die in Methionin-freiem Medium markiert wurden, fast vollständig inhibiert wird. Die Verringerung der Methionin-Konzentration zu 0,2 mM, die Standard-Methionin-Konzentration in konventionellen Zellkulturmedien, erhöht den Anteil der markierten Proteine nur unzureichend. Auch die Markierung der Proteine durch ANL mit Hilfe der LtoGMetRS bei gleichzeitiger Zugabe von 4 mM Methionin inhibiert die Proteinmarkierung, jedoch ermöglicht die Verringerung der Methioninkonzentration zu 0,2 mM eine akzeptable Proteinmarkierung durch ANL, die jedoch im Vergleich zu Methionin-deprivierten Bedingungen in der Effizienz einbüßt.

Um einzuschätzen wie hoch der Anteil ANL-markierter Proteine in Anwesenheit von 0,2 mM Methionin im Vergleich zu einer ANL-Integration in Abwesenheit von Methionin ist, wurde EGFP_{LtoGMetRS} stabil in Hek293-Zellen integriert. Somit kann davon ausgegangen werden, dass alle Zellen in Kultur EGFP_{LtoGMetS} exprimieren und so in der Lage sind ANL zu aktivieren. Die Zellen wurden für 4 h mit ANL in Methionin-freiem Medium oder in Anwesenheit von 0,2 mM Methionin inkubiert und der Anteil der ANL-markierten Proteine nach Klick-Reaktion mit der Biotin-Alkin-Sonde mittels Western-Blot analysiert. Durch eine Quantifizierung der Biotin-Signale durch eine Western-Blot-Analyse lässt sich diese Reduktion

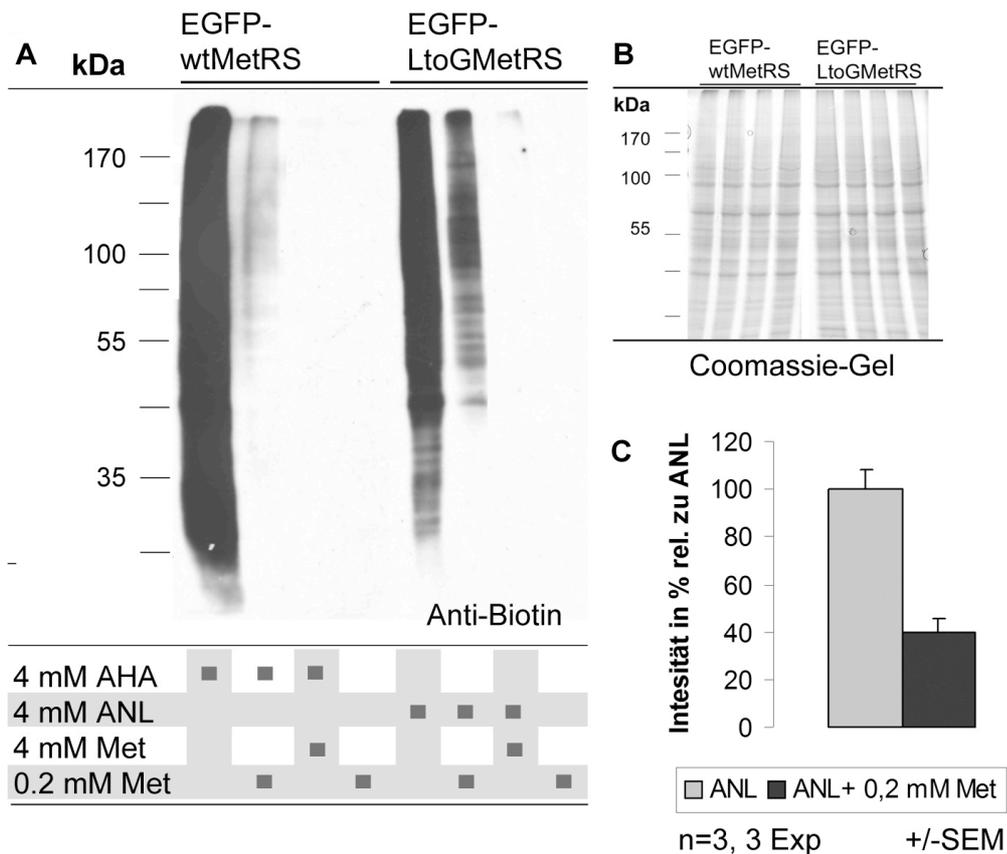


Abb. 3.8: ANL Markierung für eine *in vivo*-Applikation von GINCAT

Um zu überprüfen, ob eine ANL-Markierung in Anwesenheit von Methionin (Met) durchführbar ist, wurden Hek293T-Zellen, die entweder EGFPwtMetRS oder EGFP_{LtoG}MetRS exprimieren, für 2 h mit 4 mM AHA oder ANL zusammen mit 4 mM Methionin (Met), 0,2 mM Methionin oder in Methionin-freiem Medium inkubiert. Nach anschließender Zellyse und Klick-Reaktion mit der Biotin-Alkin-Sonde zeigt sich in der Western-Blot-Analyse eine ANL-Markierung bei einer Methioninkonzentration, die in Zellkulturmedien vorliegt (0.2 mM), jedoch eine geringere Effizienz im Vergleich zur Markierung in Methionin-freiem Medium aufweist (A). Die Markierung mit AHA wird trotz 20fach geringerer Methioninkonzentration fast vollständig inhibiert. Das zugehörige Coomassie-Gel zeigt gleiche Proteinkonzentrationen der Proben (B). Hek293-Zellen, die EGFP_{LtoG}MetRS stabil integriert haben, wurden für 4 h mit 4 mM ANL oder 4 mM ANL und 0,2 mM Met in Methionin-freiem Medium inkubiert. Nach Klick-Reaktion mit der Biotin-Alkin-Sonde wurde der Anteil Biotin-markierter Proteine anhand der Intensität des ECL-Signals im Western-Blot quantifiziert und gegen Aktin normalisiert. Die Inkubation mit 0,2 mM Met zusammen mit 4 mM ANL führt zu einer Reduktion der Biotin-markierten Proteine auf 40% (C).

der Effizienz auf ca. 40% im Vergleich zu einer ANL-Markierung, die in Abwesenheit von Methionin stattfand, bestimmen (Abb. 3.8, C). Um zu testen, ob eine Langzeitmarkierung durch ANL eine Auswirkung auf die Zellvitalität hat, wurden Hek293T-Zellen für 24 h mit 4 mM ANL und in Anwesenheit von 0,2 mM Methionin für 24 h inkubiert und anschließend auf die Anzahl toter Zellen durch eine Färbung mit dem DNA-bindenden Farbstoff Propidium-Iodid überprüft. Dabei zeigt sich keine Erhöhung der Sterberate von Hek293T-Zellen im Vergleich zu einer Inkubation mit 4 mM Methionin (nicht gezeigt). Diese Experimente verdeutlichen, dass die Markierung von Proteinneusynthese durch ANL aber nicht durch AHA über einen

längeren Zeitraum oder *in vivo* durch Zugabe von Methionin in, für Zellen und Organismen verbesserten physiologischen Bedingungen möglich ist, jedoch an Effizienz einbüßt.

Ähnlich wie eine Inkubation von Methionin während der Markierung mit ANL führt auch die Zugabe von S-Adenosylmethionin (SAM), das aus Methionin gebildet wird und als Methylgruppendedonor im Stoffwechsel fungiert, zu einer Verringerung der Markierungseffizienz durch ANL, da SAM über verschiedene Schritte zum Teil in Methionin umgebildet werden kann (nicht gezeigt). Somit muss auch bei der Gabe von SAM während einer Inkubation mit ANL mit einer verringerten Markierungseffizienz gerechnet werden.

Das Austesten verschiedenster experimenteller Parameter beschreibt Möglichkeiten für die Verwendung von GINCAT bei der Markierung von neu synthetisierten Proteinen mit ANL. Ähnlich wie bereits für AHA beschrieben, kann eine Konzentration von 4 mM ANL für eine effiziente Markierung genutzt werden. Weiterhin zeigt sich die LtoGMetRS-Aktivität unbeeinträchtigt von der N- oder C-terminalen Fusion mit Markern wie EGFP. Auch eine Anwendung von ANL in Experimenten, die eine Langzeitmarkierung erfordern, ist möglich, da die LtoGMetRS in Anwesenheit von Methionin ANL metabolisieren kann. Dabei ist eine einmalige Zugabe von nicht-kanonischen Aminosäuren ausreichend, um eine graduell zunehmende Markierung von neu synthetisierten Proteinen über einen längeren Zeitraum zu ermöglichen. Ein Recycling von ANL durch den zelleigenen Stoffwechsel kann nicht beobachtet werden und erlaubt somit quantitative Aussagen und eine Verwendung der Aminosäuren in *Pulse-Chase*-Experimenten.

3.4 Einfluss von ANL-Integration in neu synthetisierte Proteine auf die Zellvitalität

Bei der metabolischen Markierung von Biomolekülen ist es erforderlich durch die Integration des modifizierten Moleküls Veränderungen der Struktur des Biomoleküls soweit zu verhindern, dass molekulare Prozesse innerhalb der Zelle nicht beeinflusst werden.

Wie bereits durch Dieterich *et al.* (2006) gezeigt, konnten trotz der molekular veränderten Seitenkette des AHA im Vergleich zu Methionin keine signifikanten Effekte auf das Überleben der Zellen oder auf die Rate der Ubiquitin-vermittelten Proteindegradierung festgestellt werden. Im Vergleich zu AHA weist ANL zusätzlich zur Azidgruppe eine längere Seitenkette auf, so dass eine sterische Behinderung der Proteinefehlfaltungen nach ANL-Integration möglich ist.

Um Effekte auf die Zellvitalität und mögliche Proteinefehlfaltung durch den Einbau von ANL in Proteine zu untersuchen, wurden Hek293T-Zellen mit der EGFP_{LtoG}-MetRS oder der EGFP_{wt}MetRS transfiziert und mit 4 mM ANL oder 4 mM Methionin in Methionin-freiem

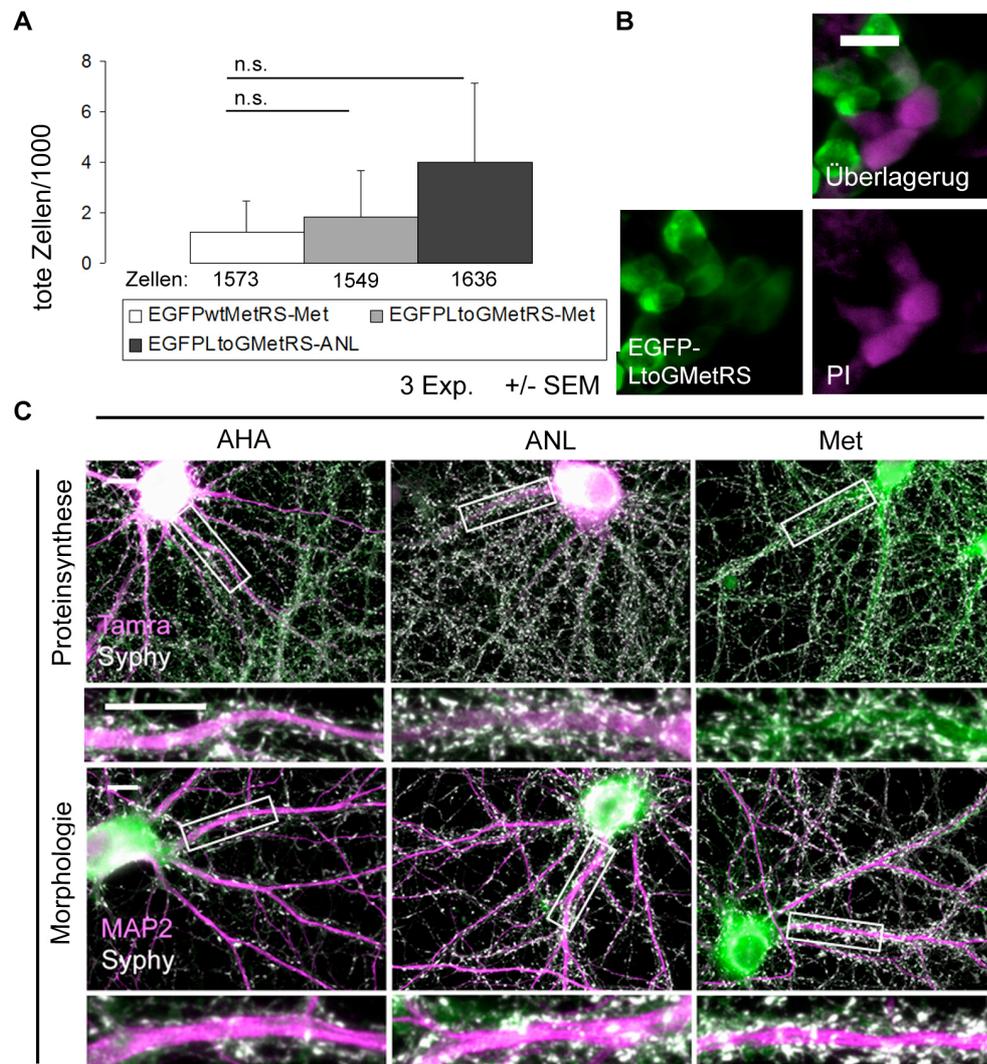


Abb. 3.9: Vitalität von Hek293T-Zellen und Neuronen nach ANL-Markierung

Hek293T-Zellen wurden nach transienter Transfektion mit EGFP-LtoGMetRS oder EGFP-wtMetRS für 4 h mit 4 mM ANL oder 4 mM Methionin (Met) inkubiert und anschließend auf tote Zellen durch Propidium-Iodid-Färbung hin untersucht. Beispielhaft sind positiv gefärbte Zellen gezeigt (B). Dabei konnte kein signifikanter Anstieg von toten Zellen durch eine Inkubation von ANL allein, oder durch einen möglichen Einbau von ANL in neu synthetisierte Proteine beobachtet werden (A).

Um mögliche toxische Effekte auf die sensitiven, neuronalen Kulturen zu untersuchen, wurden hippocampale Kulturen mit dem Lentivirus LVUbiP-EGFP-LtoGMetRS infiziert (DIV16) und für 2h in Methionin-freiem Medium mit jeweils 4 mM AHA, ANL oder Methionin (Met) inkubiert (DIV21).

Neurone, die EGFP-LtoGMetRS exprimieren sind in der Lage AHA und ANL in neu synthetisierte Proteine zu integrieren, was durch die Bindung der Tamra-Alkin-Sonde mittels Klick-Reaktion sichtbar wird (C). Die Klick-Reaktion ist spezifisch für ANL-markierte Proteine und zeigt keine Bindung der Tamra-Alkin-Sonde in Methionin markierten Proben. Durch den Einbau von AHA oder ANL können keine Unterschiede in der Vitalität und der Morphologie der Neurone im Vergleich zu Methionin markierten Kulturen beobachtet werden. Unterschiede in der Integrität der MAP2-Färbung sind nicht erkennbar. Durch Synaptophysin-markierte synaptische Verbindungen zeigen eine ähnliche Abundanz in Neuronen, die mit AHA oder ANL inkubiert wurden und ANL metabolisieren können und in Neuronen, die mit 4 mM Methionin inkubiert wurden.

(Maßstab entspricht 10 µm)

Medium für 4 h inkubiert und anschließend tote Zellen mit Propidium-Iodid eingefärbt. Dabei zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen EGFP_{LtoG}MetRS überexprimierenden Zellen, die mit ANL oder mit Methionin inkubiert wurden (Abb. 3.9). Auch die Zugabe von ANL zu den Zellen, die EGFP_{wt}MetRS exprimieren, führt zu keiner signifikanten Erhöhung der Sterberate. Weitere, in Zusammenarbeit mit Christine Freitag durchgeführte Färbungen von toten Zellen mit dem Farbstoff Bisbenzimid nach Inkubation der Zellen mit Methionin oder ANL für 2 h, 4 h oder 6 h zeigen ebenfalls keinen signifikanten Anstieg von toten Zellen durch den Einbau von ANL in neu synthetisierte Proteine (Freitag, 2010).

Zusätzlich zu den Toxizitätstests in Hek293T-Zellen lassen sich mögliche toxische Effekte durch ANL in neuronalen Kulturen testen, da Neurone sensitiv auf Störungen der Zellfunktion reagieren. Dabei lässt sich die Integrität der Zellen anhand einer immunzytochemischen Färbung des Intermediärfilaments MAP2 beurteilen.

Für die Überexpression der EGFP_{LtoG}MetRS wurden neuronale Kulturen aus der Ratte am Tag 16 mit einem Lentivirus infiziert, der die Expression von EGFP_{LtoG}MetRS unter dem Ubiquitin-Promoter realisiert. Die Zellen wurden am Tag 21 in Methionin-freiem Medium für 2 h mit 4 mM ANL, AHA oder Methionin inkubiert, anschließend fixiert und MAP2 mittels Immunocytochemie angefärbt.

Dabei zeigt sich, dass Zellen, die EGFP_{LtoG}MetRS überexprimieren und ANL in neu synthetisierte Proteine einbauen, eine ähnlich intakte MAP2-Färbung aufweisen, wie Zellen, die in Methionin inkubiert wurden (Abb. 3.9, C). Dies weist auf eine vitale Zellfunktion der Zellen auch nach ANL-Inkubation und Proteinintegration hin. Zellen, die ANL-Integration ermöglichen, zeigen zusätzlich in ähnlicher Zahl wie Zellen, die mit Methionin inkubiert wurden, Synaptophysin-positive Granula, die auf die Anwesenheit von präsynaptischen Endigungen auf den Dendriten und somit auf intakte Kontakte zwischen Neuronen deuten. Um zu überprüfen, ob die EGFP_{LtoG}MetRS-exprimierenden Neurone tatsächlich in der Lage sind ANL in neu synthetisierte Proteine einzubauen, wurden parallel zur Immunfärbung AHA- oder ANL-markierte Proteine mit Hilfe der Klick-Reaktion durch die Markierung über die Tamra-Alkin-Sonde nachgewiesen. Im Vergleich zur AHA-Färbung etwas schwächer, können jedoch mit Hilfe der Tamra-Alkin-Sonde ANL-markierte Proteine in Neuronen bis in sekundäre und tertiäre Dendriten und in dendritische Spines nachgewiesen werden (Abb. 3.9).

Neben möglichen toxischen Effekten könnte sich der Einbau von ANL in neu synthetisierte Proteine auf Grund der im Vergleich zu Methionin deutlich längeren Seitenkette auch auf die Proteinfaltung auswirken, die die Abundanz oder die Funktion eines Proteins deutlich beeinflussen kann. Proteinefehlaltungen werden zellulär kontrolliert und fehlgefaltete Proteine über das Ubiquitin-Proteasom-System nach Markierung mit Polyubiquitin abgebaut. Um eine erhöhte Proteinefehlaltung durch die Integration von ANL in neu synthetisierte Proteine auszuschließen, wurde überprüft, ob sich der Anteil der ubiquitylierten Proteine nach ANL

Integration erhöht. Dabei wurden in Zusammenarbeit mit Christine Freitag Hek293T-Zellen, die EGFP_{LtoG}MetRS oder EGFP_{wt}MetRS überexprimieren, mit 4 mM ANL oder Methionin in Methionin-freiem Medium inkubiert und ubiquitinylierte Proteine durch Immunpräzipitation mit einem Antikörper gegen Ubiquitin isoliert (Freitag, 2010). Die Analyse der ubiquitinylierten Proteine mittels Western-Blot-Analyse zeigt keinen Unterschied des Anteils an Ubiquitin-markierten Proteinen zwischen Zellen, die auf Grund der Expression von EGFP_{LtoG}MetRS ANL in Proteine integrieren können bzw. Zellen, die EGFP_{LtoG}MetRS überexprimieren und Zellen, die lediglich als Kontrolle EGFP allein überexprimieren.

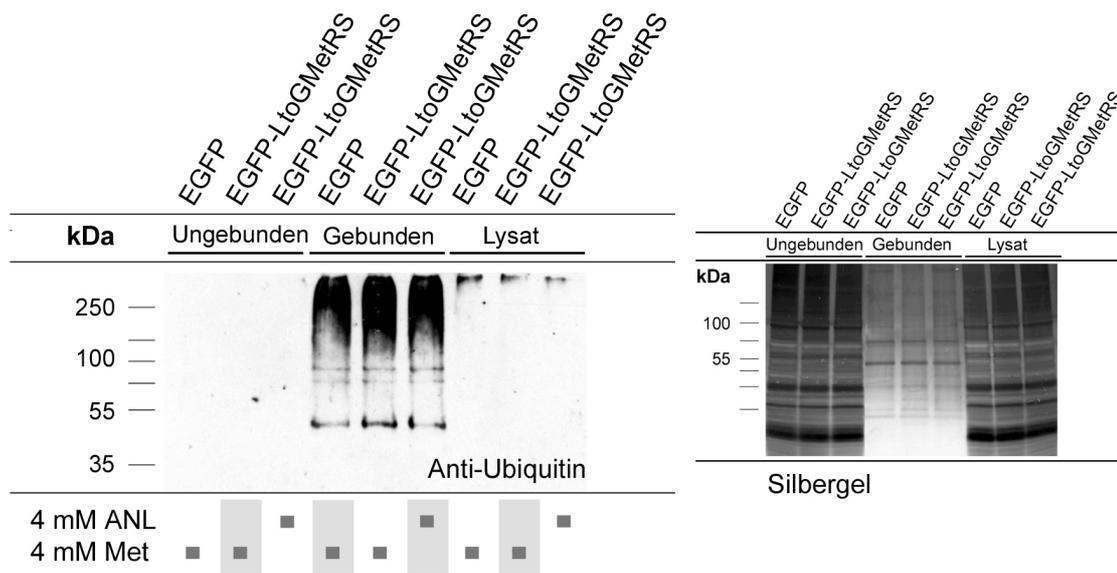


Abb 3.10: Protein-Turnover in Hek293T-Zellen nach ANL Integration

Hek293T-Zellen, die EGFP_{LtoG}MetRS oder EGFP_{wt}MetRS überexprimieren, wurden für 2 h mit 4 mM ANL oder Methionin inkubiert, Ubiquitin-markierte Proteine mittels Immunpräzipitation mit einem Antikörper gegen Ubiquitin isoliert und anschließend mittels Western-Blot analysiert.

Weder quantitative noch qualitative Unterschiede im Anteil der ubiquitinylierten Proteine können nach Antikörperfärbung gegen Ubiquitin nachgewiesen werden. Zellen, die EGFP_{LtoG}MetRS überexprimieren und mit Methionin inkubiert wurden und Zellen, in denen ANL-Markierung durch Inkubation mit ANL und Expression von EGFP-LtoGMetRS möglich ist, zeigen keine Erhöhung der ubiquitinylierten Proteine. Das Silbergel weist gleiche Proteinmengen sowohl im Input und in der gebundenen Fraktion nach.

Mit Hilfe der Analyse von neuronaler Zellvitalität und Morphologie nach Überexpression von EGFP_{LtoG}MetRS und Integration von ANL in neu synthetisierte Proteine sowie der Analyse apoptotischer Hek293T-Zellen nach ANL-Inkubation konnten keine nachweisbaren Effekte auf die Zellvitalität oder die Zellsterberate durch die Überexpression des mutierten Enzyms EGFP_{LtoG}MetRS oder durch den Einbau von ANL in neu synthetisierte Proteine innerhalb einer Markierungszeit von bis zu 4 h festgestellt werden.

3.5 Zell-spezifische Expression von LtoGMetRS in GFAP-positiven Astrozyten einer Neuron-Glia-Kokultur

Dass Proteinneusynthese für die Etablierung des Langzeitgedächtnisses und der aktivitätsabhängigen Stabilisierung von neuronalen Synapsen eine wichtige Rolle spielt, lässt sich experimentell in vielen Studien zeigen (Kelleher *et al.*, 2004). So induziert beispielsweise eine erhöhte neuronale Aktivität die Proteinneusynthese des *Intermediate early*-Gens Arc, ein Protein, das unter anderem regulatorische Funktionen an der Synapse inne hat (Messaoudi *et al.*, 2007; Alberi *et al.*, 2011). Auch die hohe Zahl an Proteinen, deren Genexpression nach Erhöhung neuronaler Aktivität durch BDNF verändert vorgefunden wurde, deutet auf eine wichtige Rolle der Proteinneusynthese in der Gedächtniskonsolidierung hin (Liao *et al.*, 2007). Inwiefern das astrogläre Proteom durch neuronale Aktivität beeinflusst wird ist jedoch nur unzureichend untersucht, da eine Unterscheidung von Proteinen glären und neuronalen Ursprungs notwendig ist. Um diese Fragestellung zu bearbeiten, eignet sich eine Methode wie GINCAT. Dabei kann eine Markierung von Proteinneusynthese mit ANL spezifisch in Astrozyten erfolgen, wenn die Expression der EGFPLtoGMetRS ausschließlich in diesem Zelltyp über die Verwendung Zell-spezifischer Promotoren aktiviert wird.

Um die spezifische Proteinmarkierung in Astrozyten in einem Glia-Neuron-Netzwerk zu testen, eignen sich primäre Neuronenkulturen aus Ratte für erste Untersuchungen. Dieses Modellsystem bietet eine Reihe von Vorteilen. So können nicht-kanonische Aminosäuren durch Zugabe zum Kulturmedium für die Aufnahme und Metabolisierung einfach appliziert werden und auch der Methioningehalt des Kulturmediums lässt sich unkompliziert steuern. Des Weiteren erlauben Zellkultursysteme eine effiziente Einbringung des LtoGMetRS-Transgens über ein lentivirales Expressionssystem. Lentivirale Gentransfersysteme zeichnen sich im Vergleich mit anderen Systemen dadurch aus, dass sie auf Grund einer hohen Infektionsrate nach Anwendung in einer hohen Zahl an infizierten Zellen resultieren, *in vivo* eine geringe Immunreaktion hervorrufen und durch eine Infektion postmitotischer Zellen eine Expression des Transgens unabhängig von Zellteilung machen (Jakobsson and Lundberg, 2006). Lentiviren sind zudem wenig zellselektiv und somit in der Lage auch Astrozyten in Kultur zu infizieren.

Um eine Zell-spezifische Expression der EGFPLtoGMetRS in Astrozyten zu realisieren, kann ein Promoter verwendet werden, der ausschließlich in diesem Zelltyp aktiv ist. Der humane GFAP-Promoter, der die Expression des Astrozyten-spezifischen Proteins *Glial fibrillary acidic protein* (GFAP) reguliert, zeichnet sich durch eine hohe Spezifität und eine starke Expression von Transgenen aus und ist ein häufig verwendeter Promoter für die Astrozyten-spezifische Expression von Transgenen (Nolte *et al.*, 2001; Brenner *et al.*, 1994).

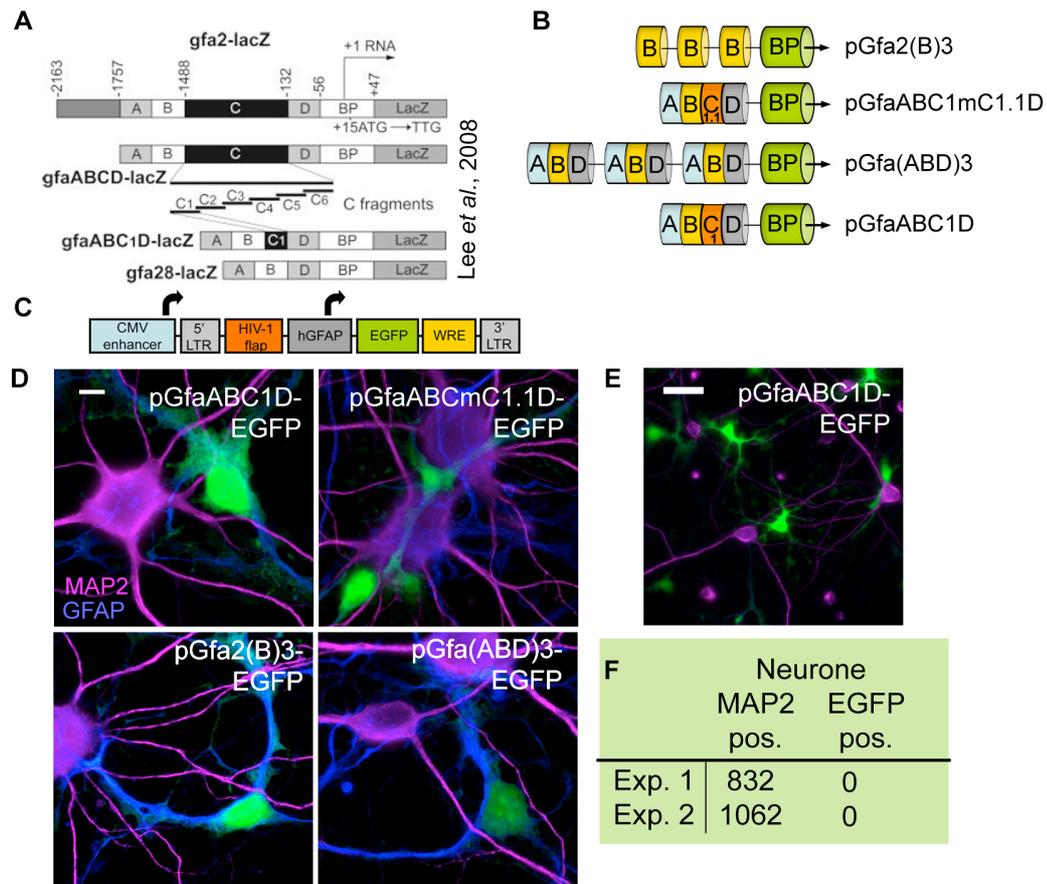


Abb. 3.11: GFAP-Promoter für Astrozyten-spezifische Expression von Transgenen

Der Promoter für die Expression von GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) besteht aus dem basalen Promoter und Enhancer-Elementen, die die Stärke und Zellspezifität der Expression regulieren. Der Aufbau des ursprünglichen GFAP-Promoters, hier als *gfa2* bezeichnet, ist in A dargestellt. Um die GFAP-Promoter-Funktionalität zu optimieren, wurden von Besnard *et al.* (1991), De Leeuw *et al.* (2006) und Lee *et al.* (2008), Versionen des Promoters generiert, die verschiedene Enhancerelemente kombinieren. Beispielsweise sind vier Versionen des GFAP-Promoters gezeigt (B). Diese Versionen wurden für die Verwendung im Neuron-Glia-Zellkultursystem auf Effizienz und Spezifität mit Hilfe eines lentiviralen Expressionssystems getestet (C). Alle verwendeten Promotoren zeigen spezifische EGFP-Expression in GFAP-positiven Zellen (D). Besonders der Lentivirus mit dem Promoter *pGfaABC1D* weist eine hohe Zahl an GFAP-positiven Zellen auf (E). Für den Nachweis der Spezifität des *pGfaABC1D*-Promoters wurden MAP2-positive Neurone ausgezählt, die EGFP exprimieren. Dabei lassen sich in zwei Experimenten keine EGFP-positiven Neurone auffinden (F). (Maßstab in D entspricht 10 µm, der Maßstab in E entspricht 50 µm.)

Um eine hohe Zellspezifität sowie ein hohes Level der Expression der EGFP_{LtoGMetRS}-Expression über ein lentivirales Gentransfersystem zu erreichen, wurden verschiedene Versionen des humanen GFAP-Promoters, die von Prof. Brenner (University of Alabama, Birmingham) zur Verfügung gestellt wurden, in einem lentiviralen Expressionssystem getestet (Lee *et al.*, 2008; Besnard *et al.*, 1991; de Leeuw *et al.*, 2006). Diese Promotoren stellen verkürzte Versionen des ursprünglichen GFAP-Promoters dar und enthalten, soweit bekannt, zusätzlich zum basalen Promoter die entscheidenden Elemente, die für eine Zell-spezifische und eine hohe Expression des zu exprimierenden Transgens notwendig sind (Abb. 10). Die

Anwendung dieser Promoterversionen zeigte *in vivo* durchaus Unterschiede sowohl in der Stärke der Expression eines Reportergens als auch in seiner Spezifität für GFAP-positive Zellen und auch die Promoteraktivität in GFAP-exprimierenden Zelllinien weicht zum Teil stark von der Aktivität *in vivo ab* (de Leeuw *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2008). Somit ist die Spezifität der Promotoren für die Anwendung in Neuron-Glia-Kokulturen zu überprüfen, um eine erfolgreiche Anwendung von GINCAT in diesem Kultursystem zu ermöglichen.

Eine der Voraussetzungen an den Promoter für die Anwendung von GINCAT in dem hier verwendeten Neuron-Glia-Kokultur-System ist eine hohe Zellselektivität, die eine Expression von EGFP_{LtoGMetRS} in Astrozyten erlaubt, aber die Expression in Neuronen unterbindet. Weiterhin ist es notwendig über einen starken Promoter ein ausreichendes Expressionslevel des Enzyms zu erhalten, um eine möglichst hohe Zahl an Proteinen für eine folgende massenspektrometrische Untersuchung mit ANL zu markieren. Zusätzlich sollte sich der Promoter in Bezug auf seine Größe als geeignet für eine Verwendung in einem lentiviralen Gentransfersystem erweisen.

Um die Zellspezifität und Expressionsrate der verschiedenen Versionen des GFAP-Promoters in einem lentiviralen Expressionssystem in Neuron-Glia-Kokultur zu testen, wurde der GFAP-Promoter in den Transfektor des FUGW-basierten Lentivirus an Stelle des Ubiquitin-Promoters eingefügt (Lois *et al.*, 2002). Die Verwendung eines EGFP-Reporters erlaubt auf Grund der zytoplasmatischen Lokalisation von EGFP und der hohen Expressionsrate die Validierung der Spezifität und Effizienz dieser Promoterversionen in Neuron-Glia-Kokulturen. Hierfür wurden die Kulturen mit den Lentiviren infiziert und die EGFP-Expression fünf Tage nach Infektion analysiert. Dabei kann für alle getesteten Promotoren die Expression von EGFP spezifisch in GFAP-positiven Zellen (Abb. 3.11) beobachtet werden. Dabei ist die Zahl der MAP2-positiven Neurone, die auf Grund einer unspezifischen Aktivierung des GFAP-Promoters ebenfalls EGFP exprimieren, sehr gering. So konnte bei der Verwendung des pGfaABC1D-Promoters unter 1894 Neuronen kein MAP2-positives Neuron gefunden werden, das EGFP exprimiert. Dennoch kann auf Grund der zufälligen Integrationsstelle des Virus in genomische DNA eine Genexpression des Transgens nicht vollständig ausgeschlossen werden, so dass vereinzelt EGFP-positive Neurone in Zellkultur zu beobachten sind. Dies schien bei Verwendung des pGfaABC1(mC1.1)D-Promoters häufiger vorzukommen, so dass auf die Verwendung dieses Promoters für weitere Experimente verzichtet wurde. In Bezug auf die Zahl der infizierten Zellen zeigen sich besonders für die GFAP-Promotoren pGfaABC1D und pGfaABC1(mC1.1)D eine hohe Zahl an EGFP-positiven Zellen, so dass bei entsprechendem Virustiter mehr als 50% der GFAP-positiven Zellen in Kultur EGFP überexprimieren können (Abb. 3.11). Im Vergleich dazu zeigen die beiden Promotoren pGfa(B)3 und pGfa(ABD)3 eine schwächere Expression von EGFP. Dies scheint vorwiegend bedingt durch einen geringeren Virustiter, der auf Grund der Größe der Promotoren und der

daraus resultierenden Größe des viralen Expressionsvektors geringer ausfallen kann, als dies für die weitaus kleineren Promotoren pGfaABC1D und pGfaABC1(mC1.1)D der Fall ist.

Auf Grund der hohen Spezifität für GFAP-positive Zellen, der hohen Expressionsrate und der geringen Größe des Promoters im viralen Expressionskonstrukt wurde somit der pGfaABC1D-Promoter für die Klonierung eines Lentivirus verwendet, der EGFP_{LtoG}MetRS oder EGFP_{wt}MetRS in Astrozyten exprimiert.

Um zu überprüfen, ob das lentivirale System die Expression der EGFP_{LtoG}MetRS erlaubt, wurden Monokulturen und Neuron-Glia-Kokulturen mit dem Lentivirus LVpGfaABC1D-EGFP_{LtoG}MetRS infiziert (DIV16) und nach fünftägiger Expression mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen. Dabei kann die Expression der EGFP_{LtoG}MetRS sowie in Neuron-Glia-Kokulturen (DIV21), als auch in Monoglia-Kulturen (DIV21) mittels Western-Blot mit der erwarteten Größe von 130 kDa detektiert werden (Abb. 3.12). Dabei erlaubt die Verwendung des lentiviralen Systems die Expression eines funktionalen Enzyms in Astrozyten. Eine positive Markierung mit der Tamra-Alkin-Sonde ließ sich nachweisen, wenn Neuron-Glia-Kokulturen mit dem Lentivirus infiziert (DIV21) und nach fünftägiger Expression mit ANL inkubiert wurden (Abb. 3.12). Positive EGFP-Signale zeigen sich Zell-spezifisch im Zytoplasma GFAP-positiver Zellen, sowie vereinzelt in Mikroglia, jedoch nicht in Neuronen. Zellen, die EGFP_{LtoG}MetRS exprimieren und mit ANL inkubiert wurden, weisen ähnlich wie Zellen, die mit AHA markiert wurden ein erhöhtes Tamra-Signal im Zellkern sowie im Zytoplasma auf. Ähnlich wie bereits in Hek293T-Zellen (Abb. 3.3) erlaubt die Überexpression der EGFP_{LtoG}MetRS eine Integration von ANL in Proteine, während uninfizierte Zellen keine Tamra-Markierung aufweisen. Des Weiteren ist die Verwendung der Tamra-Alkin-Sonde auch hier spezifisch, da das Tamra-Signal drastisch reduziert ist, wenn die Zellen mit Methionin inkubiert wurden.

Dass nicht nur die Expression der EGFP_{LtoG}MetRS spezifisch in GFAP-positiven Zellen erfolgt, sondern auch die ANL-Markierung auf Astrozyten in Kultur beschränkt ist, zeigt Abb. 3.12, B. Zellen, die mit AHA supplementiert wurden, weisen positive Tamra-Fluoreszenz in GFAP-positiven Zellen sowie in Neuronen auf, während in Neuronen der ANL supplementierten Proben lediglich eine Hintergrundfärbung der Tamra-Sonde nachweisbar ist. Vergleicht man die Intensitäten der Tamra-Fluoreszenz von AHA und ANL-markierten Proteinen, so zeigt sich lediglich eine leicht verringerte Intensität des Fluoreszenzsignals nach ANL-Inkubation. Dies weist auch hier auf eine ähnliche Markierungseffizienz von AHA und ANL hin.

Zusätzlich zum Nachweis über FUNCAT kann die ANL-Integration auch über eine Markierung mit der Biotin-Alkin-Sonde in BONCAT erfolgen. Dabei weist die Analyse von Biotin-markierten Proteinen nach Inkubation mit ANL Biotin-positive Proteine in Kulturen nach, die mit dem Lentivirus LVpGfaABC1D-EGFP_{LtoG}MetRS infiziert wurden, während sich in unbehandelten

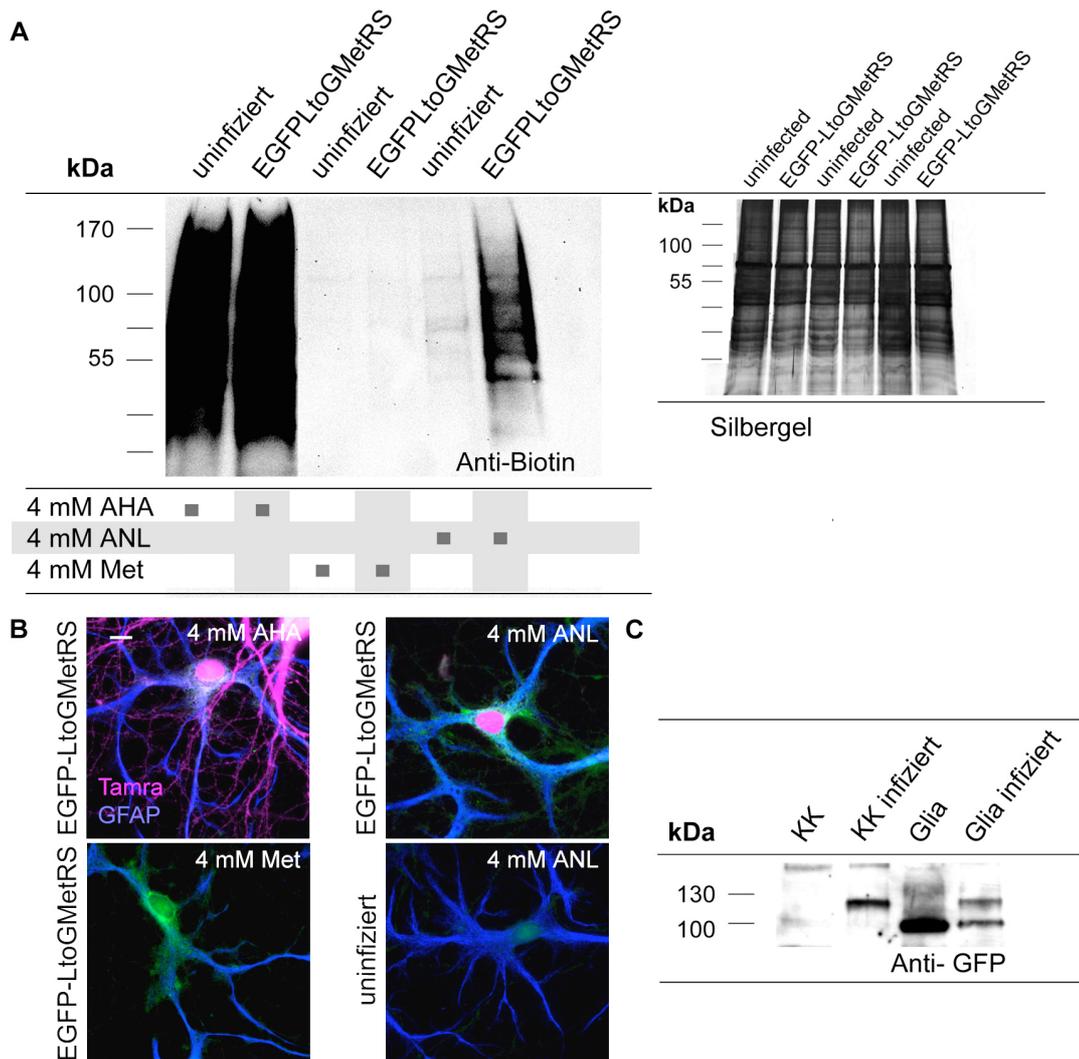


Abb. 3.12: Zell-spezifische Expression der EGFP-LtoGMetRS in GFAP-positiven Astrozyten

Neuron-Glia-Kokulturen wurden mit dem Lentivirus LVpGfaABC1D-EGFP-LtoGMetRS infiziert (DIV16). Die Kulturen wurden in Methionin-freiem Medium für 4h mit 4 mM AHA, ANL oder Methionin (Met) markiert (A). Nach Zellyse und Klick-Reaktion des Proteinextraktes mit der Biotin-Alkin-Sonde können Biotin-markierte Proteine bei gleich geladenen Proteinen in den Proben, die mit AHA inkubiert wurden sowie in Proben, die mit ANL inkubiert wurden und EGFP-LtoGMetRS exprimieren, jedoch nicht in uninfizierten Proben mittels Western-Blot-Analyse detektiert werden. Kein Signal zeigen Methionin-markierte Proben.

Für den Nachweis der Zell-spezifischen ANL-Markierung mittels FUNCAT wurden Neuron-Glia-Kokultur aus Ratte (DIV16) mit LVpGfaABC1D-EGFP-LtoGMetRS infiziert, die Zellen mit 4 mM AHA, ANL oder Methionin in Methionin-freiem Medium für 4 h inkubiert und markierte Proteine mittels FUNCAT identifiziert. Die Expression der EGFP-LtoGMetRS erfolgt spezifisch in GFAP-positiven Zellen und erlaubt eine Zell-spezifische Markierung von Proteinen mit ANL (B). Die Intensität der Tamra-Fluoreszenz von ANL-markierten Proteinen ist vergleichbar mit der Intensität AHA-markierter Proteine in Astrozyten.

Infizierte Kokulturen oder astrogläre Monokulturen (DIV21) aus Ratte zeigen die Expression von EGFP-LtoGMetRS in erwarteter Größe (errechnet: 130 kDa)

Kulturen nach ANL-Inkubation bei gleicher Proteinmenge lediglich eine schwache Färbung auf Grund von unspezifischer Markierung nachweisen lassen. Im Vergleich zur Markierung mit AHA lässt sich bei Markierung durch ANL ein deutlich verringertes Biotin-Signal in der BONCAT-Analyse detektieren. Auf Grund der beobachteten ähnlichen Markierungseffizienz nach FUNCAT ist dies jedoch nicht zwangsläufig auf eine verringerte Markierungseffizienz mit ANL, sondern möglicherweise auf eine geringere Zahl von EGFP_{LtoGMetRS} exprimierenden Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl der Kultur zurückzuführen.

Die ähnlich starken Biotin-Signale nach AHA-Inkubation von uninfizierten Kulturen und infizierten Kulturen zeigen keine beobachtbaren Unterschiede in der globalen Proteinsyntheserate und weisen so auf eine generelle vitale Zellfunktion nach Virusinfektion und Überexpression von EGFP_{LtoGMetRS} hin (Abb. 3.12, A).

3.6 Isolation Zell-spezifischer Proteine mittels Affinitätsreinigung

Einer der Vorteile bei der Verwendung der nicht-kanonischen, azidhaltigen Aminosäuren in der Markierung von Proteinneusynthese ist die kovalente Bindung einer Biotin-Sonde über die Klick-Reaktion. Diese Biotin-Sonde ermöglicht die Aufreinigung und Konzentration von neu synthetisierten Proteinen, die die Aminosäuren mit der Azidgruppe integriert haben. Insbesondere bei der Analyse eines Zell-spezifischen Proteoms können somit beispielsweise markierte astrogläre Proteine gegenüber neuronalen Proteinen angereichert und isoliert werden. Eine folgende Identifizierung der aufgereinigten Proteine über Massenspektrometrie schafft so eine Möglichkeit Kandidaten zu identifizieren, die beispielsweise in Astrozyten ein verändertes Expressionsmuster als Antwort auf erhöhte neuronale Aktivität vorweisen.

Um zu testen, ob eine ANL-Markierung von glären Proteinen mit dem hier verwendeten System eine Identifizierung von Proteinen über die Massenspektrometrie erlaubt kann GINCAT mit einer Affinitätsreinigung über Biotin kombiniert werden.

Hierfür wurden kortikale Kokulturen aus der Ratte mit dem Lentivirus pGfaABC1D-EGFP_{LtoGMetRS} infiziert (DIV16), der die Expression der EGFP_{LtoGMetRS} spezifisch in GFAP-positiven Zellen treibt. Die Zellen wurden am Tag 21 mit ANL für 4 h in Methionin-freiem Medium inkubiert. Nach erfolgter Klick-Reaktion mit der DST-Biotin-Alkin-Sonde wurden die biotinylierten Proteine über NeutrAvidin-gekoppelte Partikel aufgereinigt. Die in der DST-Biotin-Alkin-Sonde enthaltene Disulfidbrücke erlaubt im Folgenden die vollständige Elution der biotinylierten Proteine von der Agarose durch Reduktion mit β -Mercaptoethanol und ermöglicht so eine Probengewinnung, die ohne weitere Prozessierung für die Massenspektrometrie eingesetzt werden kann (Szychowski *et al.*, 2010). Der Erfolg der Aufreinigung biotinylierter Proteine kann dabei mit Hilfe der Western-Blot-Analyse verfolgt und beurteilt werden (Abb. 3.13). Die so isolierten Proteine wurden mittels Massenspektrometrie durch PD Dr. Thilo Kähne analysiert und die im Eluat enthaltenen Proteine identifiziert. (Abb.

3.13.).

Unter den Kandidaten finden sich neben Proteinen, die vorwiegend ubiquitär vorkommen, zum Teil Proteine, die spezifisch in Astrozyten jedoch nicht neuronal exprimiert werden, wie zum Beispiel das Intermediärfilament GFAP (siehe Anhang: 7.6).

Um zu verifizieren, dass die identifizierten Proteine über eine ANL-Integration und über die Markierung mit Biotin aufgereinigt und somit tatsächlich aus GFAP-positiven Zellen isoliert wurden, die die LtoGMetRS exprimieren, lässt sich eine ANL-Integration in Peptiden direkt über die Massenspektrometrie nachweisen. So wurden Proteine im Folgenden als astroglial eingruppiert, die im Peptid ANL oder auf Grund der Bindung der DST-Biotin-Alkin-Sonde modifiziertes ANL aufweisen. Ein Vergleich der ANL-positiven Proteine mit der Astroprot-Datenbank (Siehe Abschnitt 3.9) zeigt, dass bereits ein Teil der Proteine in Massenspektrometrie-Studien als astrogliale Proteine identifiziert wurden (siehe Abb. 3.13, B). In der so erhaltenen Liste finden sich sowohl zytoplasmatische und nukleäre Proteine, als auch Transmembranproteine unterschiedlichster Größe, die überwiegend funktionell eine Rolle als Enzyme, bzw. eine Funktion in der Regulation von Transkription und Translation einnehmen oder Bestandteile des Zytoskeletts darstellen (Abb. 3.13).

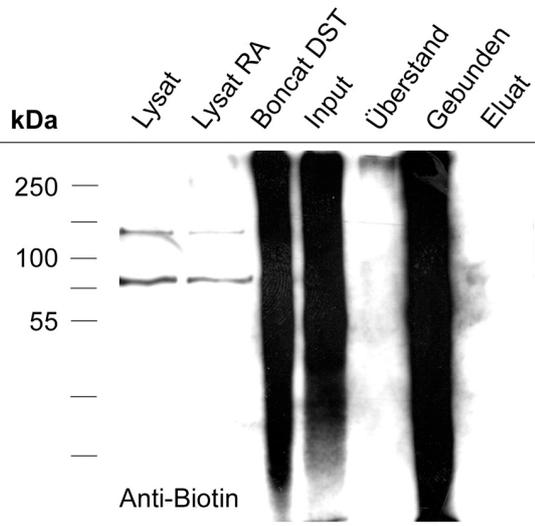
Weiterhin lässt sich die Fähigkeit dieser Methode, Glia-spezifische Proteine aufzukonzentrieren und über Massenspektrometrie zu identifizieren beispielhaft an dem Glia-spezifischen Protein GFAP zeigen, das nach Aufreinigung mittels Massenspektrometrie in den Proben identifiziert werden konnte. Hierfür wurde die Klick-Reaktion nach Inkubation von EGFP-LtoGMetRS-exprimierenden, kortikalen Neuron-Glia-Kokulturen (DIV21) mit 4 mM ANL oder 4 mM Methionin mit der Biotin-Alkin-Sonde durchgeführt. Im Vergleich zur DST-Biotin-Alkin-Sonde enthält diese Sonde keine spaltbare Disulfidbrücke und schließt so eine mögliche unspezifische Reaktion mit Sulfidgruppen der Aminosäurereste aus, so dass von einer hohen Spezifität der Klick-Reaktion mit dieser Sonde ausgegangen werden kann. Nach Bindung von Biotin-markierten Proteinen an NeutrAvidin-Agarose zeigt sich eine Anreicherung des Glia-spezifischen Proteins GFAP im Vergleich zur Methionin-Kontrolle. Ein weiteres Protein, das neuronale Protein NCAM, das ebenfalls mit Massenspektrometrie identifiziert wurde, jedoch keine Peptide mit ANL-Integration aufweist, war nach ANL-Inkubation in der gebundenen Fraktion nicht nachweisbar (Abb. 3.13). Der falsch-positive Nachweis von NCAM in der Massenspektrometrie lässt sich somit durch eine mögliche Bindung an NeutrAvidin-Agarose auf Grund unspezifischer Reaktion der DST-Biotin-Alkin-Sonde mit NCAM erklären.

Basierend auf den Ergebnissen aus Massenspektrometrie und Western-Blot-Analyse lässt sich schlussfolgern, dass tatsächlich über die Zell-spezifische Expression der EGFP-LtoGMetRS neu synthetisierte Proteine mittels ANL markiert und mit Hilfe der DST-Biotin-Alkin-Sonde für die Massenspektrometrie aufgereinigt werden können.

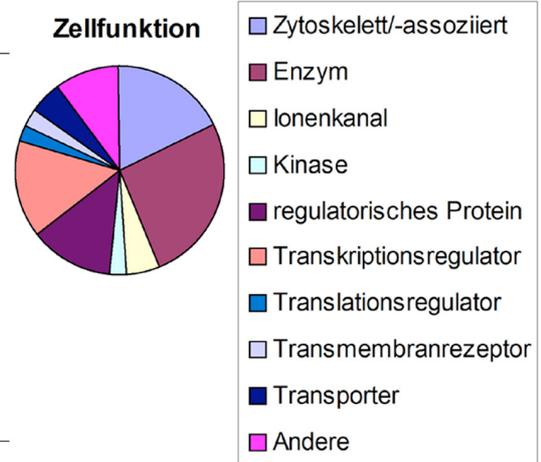
A

Accession	Gen	Protein	kDa	ANL	Astroprot
ACTB_RAT	Actb	Actin, cytoplasmic	41.7	ANL	Ja
EI2BB_RAT	Eif2b2	Translation initiation factor eIF-2B, subunit beta	38.9	ANL	Ja
GABT_RAT	Abat	4-aminobutyrate aminotransferase, mitochondrial	56.4	ANL	Ja
GTF2I_RAT	Gtf2i	General transcription factor II-I	110.1	ANL	Ja
HNRPM_RAT	Hnrnmp	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	73.7	ANL	Ja
MYH10_RAT	Myh10	Myosin-10	228.8	ANL	Ja
MYO5A_RAT	Myo5a	Myosin-Va	211.6	ANL	Ja
NCOAT_RAT	Mgea5	Bifunctional protein NCOAT	102.9	ANL	Ja
NONO_RAT	Nono	Non-POU domain-containing octamer-binding protein	54.9	ANL	Ja
PHAR3_RAT	Phactr3	Phosphatase and actin regulator 3	58.4	ANL	Ja
PSPC1_RAT	Pspc1	Paraspeckle component 1	58.7	ANL	Ja
SPTA2_RAT	Sptan1	Spectrin alpha chain	284.5	ANL	Ja
SRP54_RAT	Srp54	Signal recognition particle 54 kDa protein	55.7	ANL	Ja
TM111_RAT	Tmem111	Transmembrane protein 111	30.0	ANL	Ja
UBF1_RAT	Ubf1	Nucleolar transcription factor 1	89.4	ANL	Ja
VINC_RAT	Vcl	Vinculin	116.5	ANL	Ja

B



C



D

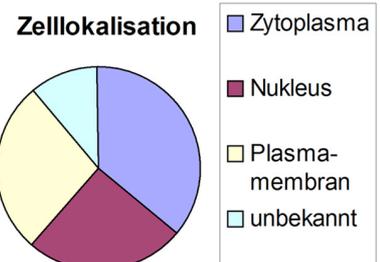
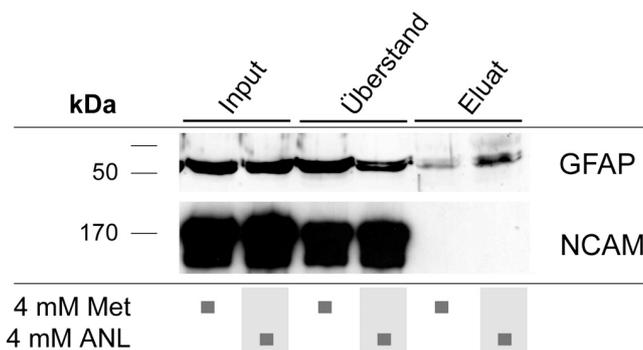


Abb. 3.13: Aufreinigung ANL-markierter Proteine für die Massenspektrometrie

Proteinextrakte von Neuron-Glia-Kokulturen, die EGFP_{LtoGMetRS} exprimieren und mit ANL für 4h inkubiert wurden, wurden nach Reduktion und Alkylierung mit der DST-Biotin-Alkin-Sonde markiert und nach Entfernen der überschüssigen Sonde an NeutrAvidin-Agarose-Partikel gebunden. Durch Reduktion der Disulfidbrücke der DST-Biotin-Alkin-Sonde werden Biotin-markierte Proteine effizient eluiert und anschließend durch Massenspektrometrie analysiert (B). Unter den identifizierten Proteinen finden sich sowohl zytoplasmatische und nukleäre als auch Membranproteine, die beispielsweise funktionell eine Rolle als Enzyme, Zytoskelettbestandteile oder auch Regulatoren von Transkription und Translation einnehmen. (C). Beispielhaft sind Proteine gelistet, die mittels Massenspektrometrie als ANL positiv identifiziert wurden und bereits als gliäres Protein Teil der Astroprot-Datenbank sind (A). Die spezifische Aufreinigung von identifizierten Proteinen kann mittels Western-Blot-Analyse beispielhaft für das Glia-spezifische Intermediärfilament GFAP nachgewiesen werden (D), das nach ANL Inkubation und Klick-Reaktion angereichert an der NeutrAvidin-Agarose identifizierbar ist. Das neuronale Protein NCAM zeigt hingegen keine Anreicherung.

Zusätzlich ist es möglich, die Identifizierung von ANL innerhalb der Peptide als weiteres Kriterium für die Proteinneusynthese und den zellulären Ursprung der identifizierten Proteine heranzuziehen.

3.7 Stimulation von Neuron-Glia-Kokulturen

In einem komplexen, zellulären Netzwerk, wie dem neuronalen Netzwerk, besteht ein enges Zusammenspiel zwischen verschiedensten Zelltypen. So reagieren beispielsweise Astrozyten als Antwort auf Änderungen neuronaler Aktivität mit der Sekretion von Gliotransmittern oder mit morphologischen Anpassungen (Theodosis *et al.*, 2008). Inwieweit sich die Änderung neuronaler Aktivität auf das astrogläre Proteom auswirkt, ist jedoch weitgehend unverstanden und Änderungen der Proteinexpression ist nur für wenige gliäre Proteine gezeigt (Yang *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2011).

Um erste Hinweise auf mögliche Auswirkungen einer veränderten neuronalen Aktivität auf die astrogläre Proteinsynthese zu erhalten, wurde FUNCAT verwendet, um die Änderung der Proteinsyntheserate in Neuronen und Astrozyten zu beobachten.

Bereits in Neuronen konnte mit Hilfe von FUNCAT gezeigt werden, dass die Applikation des *Brain derived neurotrophic factor* (BDNF) zu einer Erhöhung der Proteinsynthese in neuronalen Dendriten führt (Dieterich *et al.*, 2010). BDNF übt verschiedenste Funktionen an der Synapse aus. So gibt es Hinweise darauf, dass BDNF den Transport von mRNA in Dendriten induziert, oder den Translationsinitiator eIF4E aktiviert und so lokale Proteinsynthese in neuronalen Dendriten steuert (Ying *et al.*, 2002; Righi *et al.*, 2000; Takei *et al.*, 2004). Parallel dazu erhöht BDNF die neuronale Aktivität über prä- und postsynaptische Mechanismen (Suen *et al.*, 1997; Pozzo-Miller *et al.*, 1999).

Um etwaige Änderungen der astroglären Proteinsynthese durch BDNF-Stimulation zu untersuchen, wurden Neuron-Glia-Kokulturen mit dem Neurotrophin stimuliert. Da die Neuron-Glia-Kokulturen endogene Aktivität aufweisen, wurde die neuronale Aktivität parallel zur

BDNF-Stimulation durch die Blockierung von Aktionspotentialen mit Hilfe von Tetrodotoxin (TTX) verringert. Um zu testen inwieweit sich die Stimulation oder die Verringerung der neuronalen Aktivität anhand der Proteinneusyntheserate ablesen lässt, wurden primäre, kortikale Kulturen (DIV21) mit BDNF oder mit TTX über eine Dauer von 4 h stimuliert. Die gleichzeitige Inkubation der Kulturen mit der nicht-kanonischen Aminosäure AHA erlaubt die Markierung von Proteinneusynthese sowohl in Neuronen, als auch in GFAP-positiven Zellen und deren anschließende Visualisierung mit Hilfe der Tamra-Alkin-Sonde.

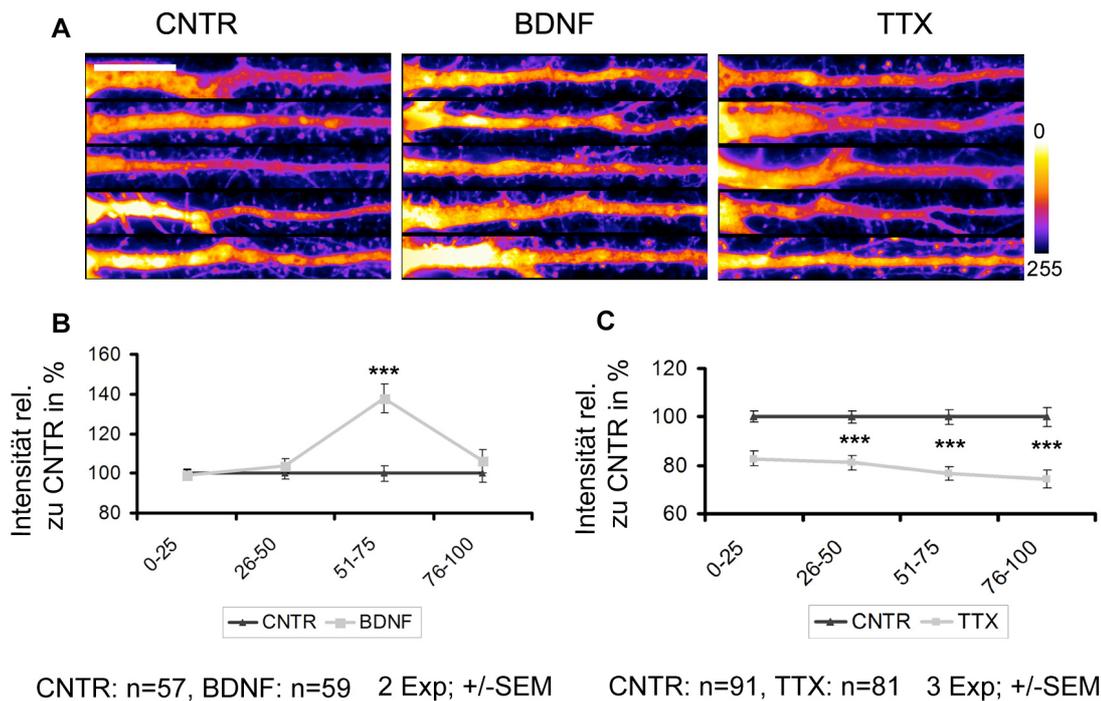


Abb. 3.14: Änderung der Proteinneusyntheserate durch Modulation neuronaler Aktivität in Neuronen

Neuronale, kortikale Kulturen (DIV21) wurden für 4 h mit 4 mM AHA in Methionin-freiem Medium inkubiert und die neuronale Aktivität durch Zugabe von BDNF (50 ng/ml) erhöht oder durch Applikation von 2 μ M TTX verringert. Die anschließende Visualisierung von AHA-markierten Proteinen mit der Tamra-Alkin-Sonde nach Stimulation der Zellen zeigt eine Verringerung neu synthetisierter Proteine nach Inkubation mit TTX (TTX), während die Neusyntheserate im Vergleich zur Kontrolle durch BDNF-Stimulation (BDNF) in neuronalen Dendriten im Vergleich zur Kontrolle (CNTR) erhöht ist, wie beispielhaft an begradierten Dendriten anhand des intensitätskodierten Tamra-Kanals gezeigt (Pixel-Intensität: 0-255) (A). Zusätzlich lässt sich auch eine höhere Tamra-Intensität in den dendritischen Spines der BDNF-stimulierten Neurone beobachten. Für die Quantifizierung der Tamra-Intensität wurde der zu messende Bereich der neuronalen Dendriten mit einer MAP2-Maske ausgewählt, begradiert und die Fluoreszenzintensität in Segmenten mit einer Länge von 25 μ m mittels *ImageJ* gemessen. Die Quantifizierung der Tamra-Intensität zeigt ein erhöhtes Signal, während die TTX-Applikation zur Reduktion der Tamra-Intensität führt (B, C). (Gemessene Dendritenlänge: von proximal zu distal. *** $P < 0.0001$; Maßstab entspricht 10 μ m)

Die Inkubation der Kulturen mit BDNF über einen Zeitraum von 4 h zeigt, ähnlich wie die durch Dieterich *et al.* (2010) veröffentlichten einstündigen Stimulationsexperimente, eine erhöhte

Tamra-Intensität in neuronalen Dendriten, wenn die Kulturen mit BDNF inkubiert wurden, während eine Verringerung der neuronalen Aktivität durch TTX zu einer Verringerung von ca. 20% der Tamra-markierten neu synthetisierten Proteine in neuronalen Dendriten im Vergleich zur Kontrollgruppe führt (Abb. 3.14). Die Reduktion der Tamra-Intensität wird bereits im proximalen Abschnitt des Dendriten deutlich und nimmt im distalen Bereich tendenziell zu.

Eine Analyse der Proteinsynthese in GFAP-positiven Zellen parallel zu den neuronalen Stimulationen zeigt Änderungen in der Tamra-Intensität zusätzlich auch in den GFAP-positiven Zellen. Dabei erhöht sich die Zahl der Zellen, die nach BDNF Stimulation im Vergleich zur Kontrolle eine erhöhte Tamra-Intensität aufweisen. Eine Behandlung von TTX jedoch führt zu keiner eindeutigen Änderung der Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Kontrolle.

Dies zeigt, dass eine Erhöhung oder Verringerung von neuronaler Aktivität mit Hilfe von BDNF und TTX in dem gewählten Zeitraum von 4 h erreicht werden kann und sich dies an der Proteinneusyntheserate neuronaler Dendriten anhand der Tamra-Intensität ablesen lässt. Für eine folgende Analyse der Proteinsynthese in Astrozyten diente die beobachtete Änderung der Tamra-Intensität in neuronalen Dendriten als Kontrolle für eine erfolgreiche Stimulation der Neuron-Glia-Kokultur.

Um den Effekt der BDNF-Stimulation auf die astrogläre Proteinneusynthese zu verifizieren, wurden kortikale Kokulturen (DIV16) mit dem Lentivirus infiziert, der die Expression von EGFP unter dem humanen GFAP-Promoter (LVpGfaABC1DEGFP) erlaubt. Die Kulturen wurden anschließend am Tag 21 für 4 h mit BDNF oder TTX in Anwesenheit von 4 mM AHA stimuliert. Nach der Klick-Reaktion mit der Tamra-Alkin-Sonde kann anhand der EGFP-Expression eine Maske erstellt werden, um die Umrisse der Zellen zu definieren und so die Tamra-Intensität einzelner Astrozyten zu quantifizieren. Dabei zeigt sich eine durchschnittliche Erhöhung der Proteinsyntheserate um ca. 50% im Vergleich zur Kontrolle, wenn die Kulturen mit BDNF stimuliert wurden (Abb. 3.15). Parallel dazu lassen sich jedoch keine Unterschiede in der Tamra-Intensität GFAP-positiver Zellen durch eine Applikation von TTX beobachten. Während die Fluoreszenzintensität in neuronalen Dendriten deutlich reduziert ist (Abb. 3.14), zeigt sich tendenziell sogar ein leichter Anstieg der Tamra-Intensität in den GFAP-positiven Zellen.

Ein Hinweis darauf, dass diese Effekte den direkten oder indirekten Kontakt zu Neuronen erfordern, liefern analoge Experimente in Astrozyten, die in Abwesenheit von Neuronen als Monokultur kultiviert wurden. Nach Infektion mit LVpGfaABC1DEGFP (DIV16) und Stimulation mit BDNF oder TTX (DIV19-DIV21) und einer gleichzeitigen Markierung von neu synthetisierten Proteinen mit 4 mM AHA zeigen sich keine Änderungen in der Tamra-Intensität durch die BDNF- oder durch die TTX-Zugabe im Vergleich zur Kontrollgruppe.

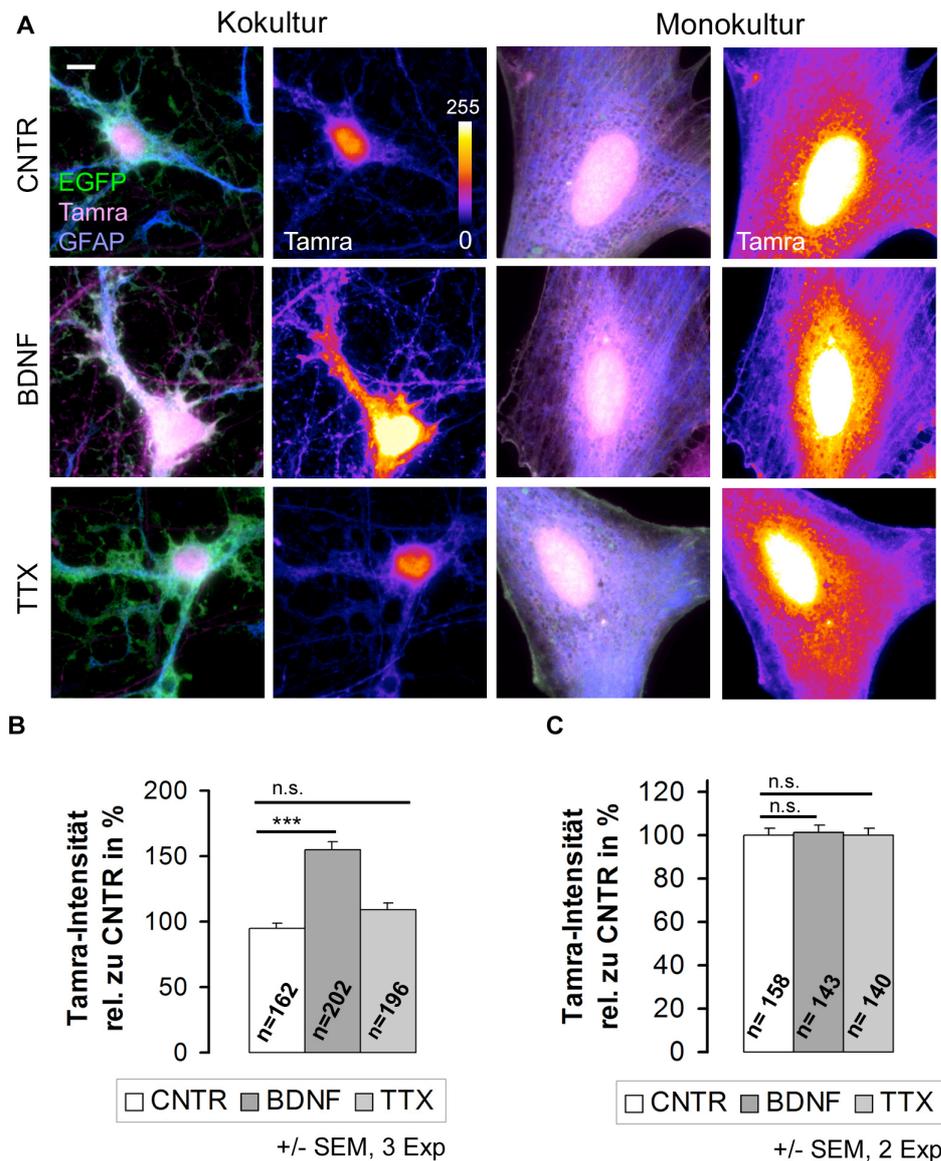


Abb. 3.15 Änderung der Proteinneusyntheserate durch Modulation neuronaler Aktivität in Astrozyten

LVpGfaABC1DEGFP infizierte, Neuron-Glia Kokulturen oder astrogläre Monokulturen wurden in Anwesenheit von 4 mM AHA mit 50 ng/ml BDNF (BDNF) oder 2 μ M TTX inkubiert (TTX) und in der Klick-Reaktion mit der Tamra-Alkin-Sonde markiert. Nach immunzytochemischer Färbung gegen EGFP und GFAP wurde der zu quantifizierende Bereich von GFAP-positiven Zellen mittels EGFP-Maske bestimmt und die Intensität des Tamra-Signals mit *ImageJ* ermittelt. Beispielhaft gezeigt sind GFAP-positive Zellen aus Ko- oder Monokultur mit dem entsprechenden intensitätskodierten Tamra-Kanal (Pixel-Intensität: 0-255) (A).

GFAP-positive Zellen, die nach Infektion EGFP exprimieren, zeigen eine globale Erhöhung Tamra-positiver Proteine innerhalb der Zelle im Vergleich zur Kontrollgruppe (CNTR), während in Monokultur kultivierte Astrozyten keine deutlichen Änderungen in der Tamra-Intensität aufweisen (A). Die Quantifizierung der Tamra-Intensität zeigt für GFAP-positive Zellen eine signifikante Erhöhung der Tamra-positiven Proteine im Vergleich zu Kontroll- oder TTX-stimulierten Kulturen um ca. 50%, wenn die Astrozyten mit Neuronen kultiviert wurden (B), während kein signifikanter Effekt auf Proteinneusynthese nach Zugabe von BDNF in GFAP-positiven Zellen beobachtet werden kann, die als Monokultur in Abwesenheit von Neuronen kultiviert wurden (C). *** $P < 0.0001$ (Maßstab entspricht 10 μ m)

3.8 „Bottom-up“-Analyse BDNF-induzierter Proteinsynthese in Astrozyten

Neben dem hier etablierten, biochemischen Ansatz für die Identifizierung von BDNF-induzierten Änderungen der Proteinexpression in Astrozyten innerhalb einer Mischkultur mit Neuronen kann auch ein *in silico*-Ansatz hilfreich sein, um mögliche Kandidaten zu identifizieren, die durch Modulation neuronaler Aktivität ein verändertes Expressionsmuster zeigen. So existieren bereits Informationen über die Änderung der Genexpression oder des Proteoms durch Stimulation mit BDNF (Liao *et al.*, 2007; Schratt *et al.*, 2004; Manadas *et al.*, 2009). Diese Studien konzentrieren sich auf neuronale Protein- bzw. Genexpression, jedoch lässt sich dabei methodisch nicht zwischen neuronalen und gliären Proteinen unterscheiden. Zwar kann der Anteil von Gliazellen z.B. in Zellkultur verringert, jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden, so dass der zelluläre Ursprung der gelisteten Proteine uneindeutig bleibt.

Um potentielle Proteine zu identifizieren, die durch die Stimulation von neuronalen Kulturen eine veränderte Expression aufweisen, aber astroglären Ursprungs sind, wurden die bereits von Liao *et al.*, Manadas *et al.*, und Schratt *et al.* veröffentlichten Massenspektrometriestudien bzw. Genexpressionsstudien zusammengefasst und mit der Astroprot-Datenbank verglichen (siehe Abschnitt 3.9). Dabei zeigt sich, dass ca. 70% der durch BDNF-Stimulation regulierten Proteine ebenfalls in der Astroprot-Datenbank gelistet sind und somit potentiell astroglär exprimierte Proteine darstellen. Unter diesen Kandidaten finden sich Proteine, die im ZNS spezifisch in Astrozyten exprimiert werden, wie z.B. GFAP, Vimentin oder Glutaminsynthetase (siehe Anhang 6.5). Weitere Proteine, die im ZNS hauptsächlich in Astrozyten exprimiert werden, sind beispielhaft das Protein Ezrin, das zum Teil in den feinen Filopodia von Astrozyten lokalisiert ist und die Filopodia-Motilität regulieren kann oder auch die Glutamat-Transporter Glast (EAAT1) und Glt1 (EAAT2) (Lavialle *et al.*, 2011; Chaudhry *et al.*, 1995) (siehe Anhang 6.5). Weitere gelistete Proteine haben beispielsweise Funktionen in Regulation, Metabolismus, aber auch Proteintranslation und Proteinabbau inne und werden größtenteils ubiquitär exprimiert.

Diese Liste von Proteinen, die sowohl in der Astroprot-Datenbank enthalten sind als auch in den Stimulationsstudien mit BDNF als reguliert beschrieben wurden, können so die Suche nach astroglären Proteinen unterstützen, die durch BDNF-Stimulation in ihrer Expression verändert sind. So kann bei der zukünftigen Auswertung von GINCAT-Daten diese Liste als Vergleich herangezogen werden oder für eine gezielte Suche nach regulierten Proteinen eingesetzt werden.

Im Folgenden wurden gezielt zwei Kandidaten dieser Liste, die besonders im Bezug auf die Trisynapse interessant sind, auf mögliche Änderungen der Proteinexpression nach BDNF-Stimulation in dem hier verwendeten Zellkultursystem untersucht. So wurden die Proteine Ezrin und Glt1 nach BDNF-Stimulation als weniger abundant in der Synaptoneurosomen-

Fraktion vorgefunden (Liao *et al.*, 2007). Da die Regulierung des Aminosäuretransporters Glt1, der hauptsächlich zur Aufnahme von Glutamat in Gliazellen beiträgt, durch veränderte neuronale Aktivität eine Möglichkeit darstellt, sich an veränderte neuronale Glutamatausschüttung anzupassen, wurde dieses Protein hinsichtlich seiner Neusyntheserate mittels Immunfluoreszenz analysiert. Auch Ezrin, ein Protein, das astrogläre Transmembranproteine mit dem Zytoskelett verankert und nach Aktivierung in Filopodia zu beobachten ist, wurde bereits durch Derouiche *et al.* beschrieben und ist ein interessanter Kandidat für die Analyse von Proteinneusynthese nach BDNF-Stimulation (Derouiche und Frotscher, 2001; Lavialle *et al.*, 2011).

Zusätzlich dazu wurde die Expression von Connexin-43, das ebenfalls im Nervengewebe in Astrozyten, jedoch nicht neuronal exprimiert wird, auf Änderung nach BDNF-Stimulation untersucht. Connexin-43 ist Teil der gliären *Gap junctions*, die unter anderem für die Zell-Zell-Kommunikation zwischen Astrozyten zuständig sind und durch die Anwesenheit von Neuronen in Kultur einen Anstieg der Expressionsrate zeigen (Koulakoff *et al.*, 2008, Theis *et al.*, 2005).

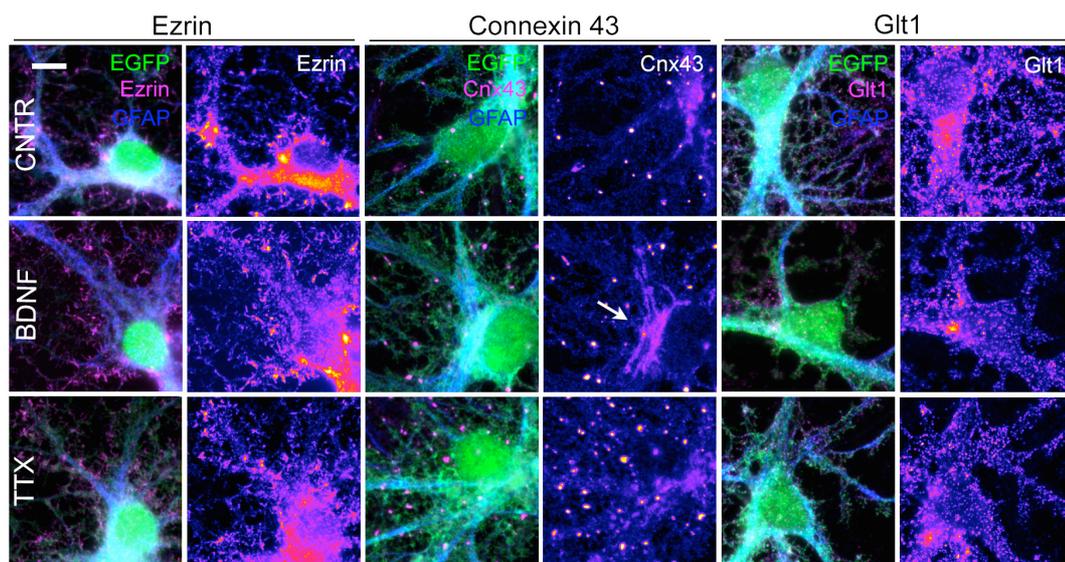


Abb. 3.16: Analyse von Kandidatenproteinen nach BDNF-Stimulation mittels Immunzytochemie

Kortikale Neuron-Glia-Kokulturen wurden mit dem Lentivirus LVpGfaABC1D-EGFP infiziert (DIV16), am Tag 21 für 4 h mit 50 ng/ml BDNF oder 2 μ M TTX inkubiert und die Proteine Glt1, Ezrin und Connexin-43 immunzytochemisch nachgewiesen. Es konnten keine Unterschiede in der Proteinabundanz von Ezrin und Glt1 nach BDNF-Stimulation in Zellen, die positiv für GFAP und EGFP sind, beobachtet werden (A). Für Connexin-43 (Cnx43) zeigt sich ein leicht erhöhtes Fluoreszenzsignal in intrazellulären Kompartimenten (siehe Pfeil). Dargestellt sind beispielhaft einzelne GFAP-positive Zellen nach Stimulation und der intensitätskodierte Kanal für Ezrin, Glt1 oder Connexin-43 (Pixel-Intensität: 0-255) (Maßstab entspricht 10 μ m).

Für eine erste Analyse möglicher Änderungen in der Proteinabundanz wurden kortikale Kulturen mit dem Lentivirus LVpGfaABC1DEGFP infiziert (DIV16), am Tag 21 mit BDNF und TTX für 4 h inkubiert. Die immunzytochemische Färbung gegen Ezrin und GlT1 weist diese Proteine in GFAP-positiven Zellen nach, die sich durch die EGFP-Expression von anderen Zellen abgrenzen lassen. Für beide Proteine können jedoch keine Unterschiede in der Abundanz nach BDNF-Stimulation oder nach Reduzierung der neuronalen Aktivität durch TTX im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle festgestellt werden (Abb. 3.16, A). Für das *Gap-Junction*-Protein Connexin-43 lässt sich durch die Anfärbung mittels Immunzytochemie eine leichte Erhöhung der Fluoreszenzintensität in intrazellulären Kompartimenten der EGFP-positiven Zellen durch Stimulation mit BDNF feststellen, während die Inkubation der Zellen mit TTX mit der Kontrollgruppe vergleichbare Fluoreszenzintensitäten aufweist.

Da eine immunzytochemische Färbung nicht zwischen bereits bestehenden und neu synthetisierten Proteinen unterscheidet und somit eine Änderung in der Proteinexpression nicht erkennbar ist, kann GINCAT hinzugezogen werden, um mögliche Änderungen der Proteinsynthese einzelner Proteine nach BDNF-Stimulation in Astrozyten zu analysieren.

Kortikale Neuron-Glia-Kokulturen, infiziert mit dem Lentivirus LVpGfaABC1D-EGFP-LtoGMetRS, wurden für 4 h mit 50 ng/ml BDNF bei gleichzeitiger Supplementierung mit 4 mM ANL stimuliert. Die Proteinextrakte wurden in der Klick-Reaktion mit der DST-Biotin-Alkin-Sonde markiert und mittels NeurtrAvidin-gekoppelten Agarose-Partikeln aufgereinigt. Dabei konnte Ezrin in der gebundenen Fraktion mittels Western-Blot-Analyse sowohl in der BDNF-stimulierten Probe als auch in der Kontrollgruppe nachgewiesen werden, jedoch lässt sich hier keine eindeutige Tendenz auf Unterschiede in der Proteinbiosynthese nach Stimulation erkennen. Auch für GlT1 kann mittels Western-Blot-Analyse keine Aussage getroffen werden, da das Protein in der gebundenen Fraktion mit dem verwendeten Antikörper gegen GlT1 nicht nachweisbar ist (nicht gezeigt). Connexin-43 zeigt sich jedoch zusätzlich zur gebundenen Fraktion im Proteineluat nach Spaltung der DST-Biotin-Alkin-Sonde durch β -Mercaptoethanol. Dabei lässt sich eine leicht erhöhte Menge an Connexin-43 in den BDNF-stimulierten Proben ausmachen während die Menge an Connexin-43 im Input nicht variiert (Abb. 3.17, B).

Connexin-43 kommt zellulär in unterschiedlichen Phosphorylierungsstadien vor, wobei un- oder gering-phosphoryliertes Connexin-43 intrazellulär vorliegt, während hochphosphoryliertes Connexin-43 in funktionellen *Gap junctions* vorgefunden wird (Musil und Goodenough, 1991). Da in Neuron-Glia-Kokulturen bei Verwendung des gleichen Lyseverfahrens Connexin-43 hauptsächlich in der nicht-phosphorylierten und der gering phosphorylierten Form vorliegt (Abbx, C) und auf Grund der Größe der vorgefundenen Doppelbande für Connexin-43 im Proteineluat BDNF-stimulierter Proben kann vermutet werden, dass vorwiegend die nicht- bzw. gering-phosphorylierte Form von Connexin-43 gebunden wurde.

Dies deutet darauf hin, dass sich neu synthetisiertes Connexin-43, das vorwiegend in gering phosphorylierter Form vorliegt, durch ANL markieren und nach Klick-Reaktion aufreinigen lässt.

Tatsächlich kolokalisiert das intrazelluläre Connexin-43 vorwiegend mit dem Golgi-Marker GM130 (Abb. 3.17, C). Dass die Halbwertszeit des Proteins gering ist und das im Golgi-Kompartiment vorliegende Connexin-43 in der Inkubationszeit von 4 h fast vollständig durch Neusynthese ersetzt wird, zeigt die Behandlung durch Anisomycin innerhalb dieses Zeitraums. Dabei verringert sich die Connexin-43-positive Färbung in GM130-positiven Zellkompartimenten drastisch im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3.17, C) Dies weist darauf hin, dass tatsächlich eine hohe Connexin-43-Umsatz innerhalb des Markierungszeitraums erfolgt und neu synthetisiertes Connexin-43 durch GINCAT über NeutrAvidin-Agarose aufgereinigt werden kann. Eine Quantifizierung der Fluoreszenz-Intensität der Connexin-43-Färbung zeigt tendenziell eine leichte Erhöhung der Connexin-43 Abundanz nach Stimulation mit BDNF für 4 h, während die Connexin-43-Expression nach TTX-Stimulation tendenziell reduziert ist (Abb. 3.17).

3.9 Astroprot-Datenbank

Obwohl den Astrozyten in den letzten Jahren stärkeres Interesse entgegen gebracht wird, ist das molekulare Zusammenspiel astroglärer Proteine auch auf Grund fehlender Information über das gliäre Proteom bisher wenig untersucht. Studien, die die Interaktion von Neuronen und Glia untersuchen, fokussieren sich weitgehend auf spezifische Proteine, die mit Hilfe von mikroskopischen oder physiologischen Ansätzen analysierbar und so von Neuronen unterscheidbar sind. Experimentelle Ansätze jedoch, die die Suche nach veränderten Expressionsmuster von Proteinen durch Veränderung von exogenen Stimuli scheitern jedoch weitgehend an der Möglichkeit astrogläre und neuronale Proteine zu unterscheiden. Auch die Identifizierung möglicher Kandidaten wird durch die Tatsache erschwert, dass nur wenige Informationen über das Proteom der Astrozyten vorliegen, so dass der zelluläre Ursprung möglicher Proteine nicht eindeutig Astrozyten oder Neuronen zuzuordnen ist. Zusätzlich erschwert die hohe Variabilität der GFAP-positiven Zellen in ihrer Morphologie und auch in der Proteinexpression sowohl in unterschiedlichen Geweben als auch unter verschiedenen Kulturbedingungen mögliche Vergleiche experimenteller Ergebnisse und die entsprechende Einordnung in physiologische Vorgänge.

Um die Informationen, die in den letzten Jahren über das Proteom der Astrozyten gesammelt wurden, zusammenzufassen und für Experimentatoren zugänglich zu machen, wurden in Zusammenarbeit mit Michał Kielbiński und Dr. Rainer Pielot die Ergebnisse aus massenspektrometrischen Studien astroglärer Proteine und Genexpressionsdaten extrahiert und in einer Datenbank gebündelt. Die dabei verwendeten Studien nutzen verschiedene

Ansätze, um astrogläre Proteine von neuronalen Proteinen zu separieren. So analysiert zum Beispiel Yang *et al.* Proteine aus Astrozyten, die in Abwesenheit von Neuronen kultiviert wurden (Yang *et al.*, 2005). Ein weiterer Ansatz erlaubt die Isolierung von Astrozyten, die GFP unter dem für Astrocyten spezifischen S100 β -Promoter Zell-spezifisch exprimieren mittels FACS (fluorescence activated cell sorting) und eine anschließende Analyse des astroglären Transkriptoms, während Doyle *et al.* (2008) mRNA über die *TRAP*-Technologie (*Translating ribosome affinity purification*) translationsaktive mRNA isoliert und analysiert. Zusätzlich finden sich Studien, die sich mit Proteomänderungen nach Stimulation von Astrozyten beschäftigen, sich unterschiedlichen neuronalen Geweben oder zellulären Komponenten der Astrozyten widmen (Moon *et al.*, 2009; Keene *et al.*, 2009). Die aus diesen Studien bisher zusammengetragenen Ergebnisse umfassen 19066 Einträge. Der Eintrag in die Datenbank erfolgt über die SwissProt- Bezeichnung des Proteins und enthält keine Mehrfachnennung.

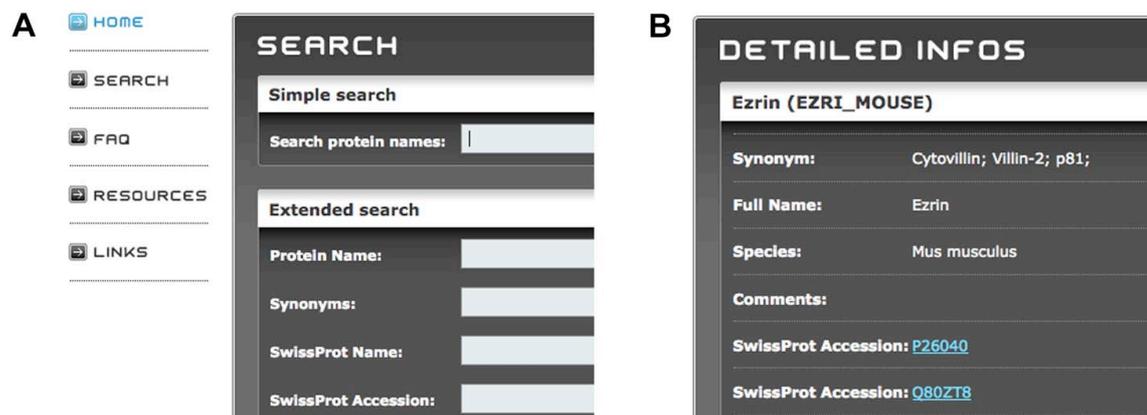


Abb. 3.18: Oberfläche der Astroprot-Datenbank

Die Abbildung zeigt Ausschnitte von der Oberfläche der Astroprot-Datenbank (A und B). Die Astroprot-Datenbank erlaubt eine einfache Suche nach Proteinen über den Proteinnamen (A). Die erweiterte Suchmaske bietet zusätzliche Möglichkeiten eine erfolgreiche Suche durchzuführen, z.B. durch die Eingabe der SwissProt-Bezeichnung des Proteins. Nach erfolgter Suche liefert die Datenbank detaillierte Informationen zu dem gefundenen Protein, wie z.B. die SwissProt-Bezeichnung oder den Gennamen (B). Der zusätzliche Querverweis auf die Studie, in der das Protein gefunden wurde, erlaubt eine weitere Einordnung der erhaltenen Ergebnisse.

Die Datenbank ermöglicht die Suche nach potentiellen gliären Proteinen sowohl über die Swissprot-Bezeichnung als auch anhand des Proteinnamens (Abb 3.18). Eine erweiterte Suchoption erlaubt zusätzlich eine Suche über den Gennamen oder alternative Proteinnamen. Aber auch die Eingabe einer Proteinsequenz unterstützt eine Suche nach dem entsprechenden Protein. Einschränkungen der Suchergebnisse beispielsweise über die Angabe des Molekulargewichtes, der Spezies oder auch die Aufreinigungsmethode erleichtern den Vergleich der Ergebnisse mit den eigenen Resultaten. Die erhaltenen Suchergebnisse liefern Informationen über die gefundenen Proteine, dies schließt den Proteinnamen und

alternative Proteinamen, sowie die SwissProt-Bezeichnung und den Gennamen, aber unter anderem auch die Sequenz und die Aufreinigungsmethode mit ein. Zusätzlich erlaubt die Quellenangabe den Verweis auf den experimentellen Ansatz der gewonnenen Daten. Die so zusammengefassten Daten ermöglichen nicht nur Vergleichsmöglichkeiten und Einordnung der gewonnenen Daten auf Grund der breiten Varianz der experimentellen Ansätze, sondern auch eine ständige Ergänzung von Daten durch das Einpflegen neuer, experimentell gewonnener Ergebnisse. Diese Datenbank kann somit als Referenz für den zellulären Ursprung eines Proteins herangezogen werden und zusätzlich den Gewinn möglicher Erkenntnisse über gliäre Zellfunktionen unterstützen.

3.10 Subzelluläre Lokalisierung von Komponenten des Translationsapparates in Astrozyten

Proteinsynthese ist notwendig für die langfristige Stabilisierung von synaptischen Verbindungen. In Neuronen konnte gezeigt werden, dass zusätzlich zur somatischen Translation lokale Proteinsynthese in dendritischen *Spines* zur Modulation der synaptischen Stärke beiträgt (Sutton und Schuman, 2006). Dies erlaubt auf Grund der lokalen Bereitstellung von Polyribosomen, mRNA und Translationsregulatoren eine schnelle Modulation und Anpassung aktivierter Synapsen durch neu synthetisierte Proteine, ohne dabei auf lange Transportwege angewiesen zu sein. Studien für die Analyse möglicher lokal translatierter, neuronaler Proteine konnten zusätzlich auch Astrozyten-spezifische Proteine nachweisen. So lässt sich die mRNA des Glia-spezifischen Intermediärfilaments GFAP mittels *in-situ*-Hybridisierung zusätzlich zu somatischer Lokalisation in feinen Gliaprozessen identifizieren und auch in Synaptoneurosomen-Präparationen anreichern (Landry *et al.*, 1994; Crispino *et al.*, 2001). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass auch Astrozyten potenziell auf lokale Translationsmechanismen zurückgreifen, um so notwendige Änderungen des Proteinbedarfs in den teilweise stark verzweigten Filopodia dieser Zellen durch Proteinsynthese schnell zu realisieren. Mögliche Proteintranslation-abhängige Prozesse im gliären Teil der Trisynapse könnten somit zur Modulation synaptischer Stärke beitragen. Voraussetzungen für eine mögliche lokale Translation gliärer Proteine ist die lokale Anwesenheit von Komponenten des Translationsapparates, wie beispielsweise zu translatierende mRNA, Ribosomen und Proteine, die die Initiation und Elongation der Translation regulieren.

Um erste Hinweise auf das Vorhandensein eines lokalen Translationsapparates in Astrozyten zu erhalten, wurden immunzytochemische Färbungen gegen Komponenten des Translationsapparates in GFAP-positiven Astrozyten in Zellkultur durchgeführt. Dabei kann die Zell-spezifische Überexpression von EGFP mittels LVpGfaABC1DEGFP als Marker für GFAP-positive Prozesse genutzt werden und unterstützt so die Unterscheidung zwischen gliären und neuronalen Proteinen.

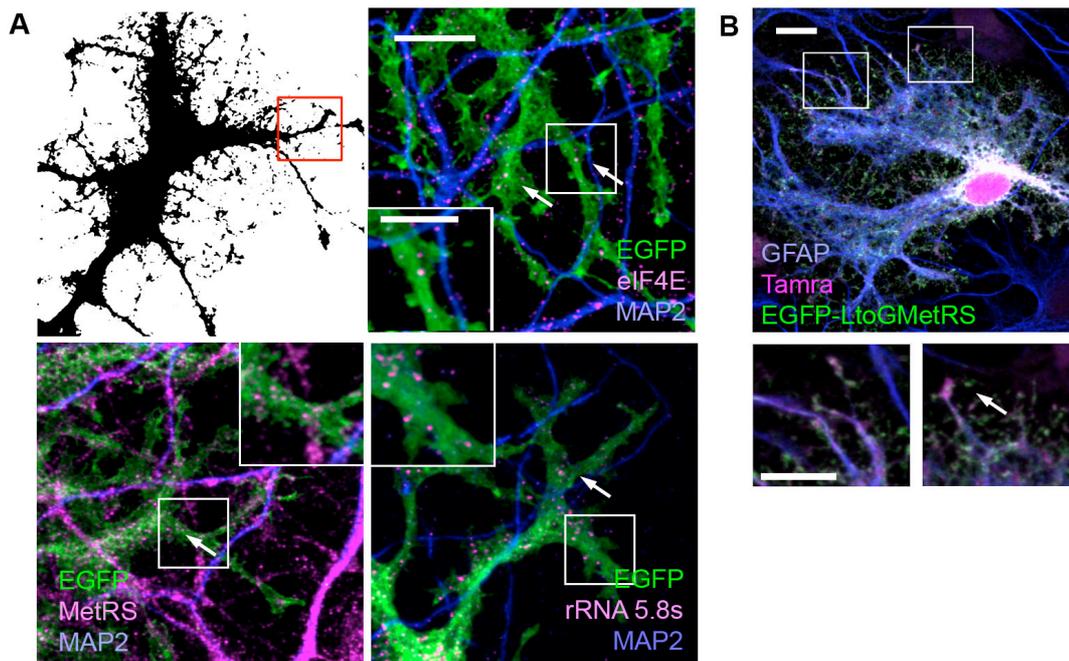


Abb. 3.19: Nachweis von Komponenten des Translationsapparates in Fortsätzen der Astrozyten

Hippokampale Neuron-Glia-Kokulturen wurden mit LVpGfaABC1DEGFP infiziert (DIV16), am Tag 21 fixiert und mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Zell-spezifische Überexpression von EGFP erlaubt die Markierung von astroglären Fortsätzen. Die schematische Darstellung einer Astrozyten-Zelle weist dabei auf die Lage der gezeigten Ausschnitte in Relation zur gesamten Zellen hin (A). Immunzytochemische Färbungen gegen ribosomale RNA 5.8s, den Translationsinitiationsfaktor eIF4E und die Methionyl-tRNA-Synthetase (MetRS) weisen diese Komponenten des Translationsapparates in EGFP-positiven Fortsätzen nach (siehe Pfeil). Diese Proteine können ebenso in MAP2-positiven, neuronalen Dendriten detektiert werden.

Hippokampale Neuron-Glia-Kokulturen wurden mit dem Lentivirus LVpGfaABC1D-EGFPLtoGMetRS infiziert (DIV16) und für 4 h mit 4 mM ANL in Methionin-freiem Medium inkubiert. Nach Klick-Reaktion mit der Tamra-Alkin-Sonde zeigen sich Tamra-positive Proteine zum Teil deutlich akkumuliert in feinen Fortsätzen der Astrozyten (siehe Pfeil, B). (Maßstab entspricht 10µm, Maßstab des Ausschnitts entspricht 5µm)

Für diese immunzytochemische Untersuchung wurden hippokampale Neuron-Glia-Kokulturen (DIV16) mit dem Lentivirus LVpGfaABC1DEGFP infiziert, am Tag 21 fixiert und gegen Komponenten des Translationsapparates gefärbt. Dabei zeigt sich, dass sowohl Ribosomen, als auch Translationsregulatoren, wie das für Translationsinitiation zuständige Protein eIF4E, in den feinen, EGFP-positiven Prozessen nachgewiesen werden können (Abb. 3.19, B). Auch das für die Aktivierung der Methionyl-tRNA zuständige Protein MetRS kann mittels Immunzytochemie in den Fortsätzen von GFAP-positiven Zellen gefunden werden.

Dass eine lokale Neusynthese von Proteinen in Astrozyten tatsächlich relevant sein kann, suggerieren Färbungen von neu synthetisierten Proteinen in GFAP-positiven Zellen. Dabei wurden hippokampale Neuron-Glia-Kokulturen mit dem Lentivirus LVpGfaABC1D-EGFPLtoGMetRS infiziert und am Tag 21 für 4 h mit ANL inkubiert. ANL-markierte, neu

synthetisierte Proteine akkumulieren zum Teil deutlich in EGFP^{LtoGMetRS} positiven Astrozytenfortsätzen (Abb. 3.19, B). Selbst kleine Fortsätze, die zwar durch das EGFP-Fusionsprotein markiert sind, jedoch auf Grund der geringen Größe nicht GFAP-positiv sind, zeigen Tamra-positive Proteine. Die Konzentration von neu synthetisierten Proteinen in Filopodia suggeriert einen hohen Bedarf an Proteinen in diesen subzellulären Strukturen. Inwiefern dieser Bedarf durch somatische oder lokale Proteinsynthese gedeckt wird, bleibt jedoch bislang unklar.

Dass die Astrozyten-spezifisch markierten, neu synthetisierten Proteine akkumuliert in feinen Fortsätzen erkennbar sind und dass Elemente des Translationsapparates ebenfalls in gliären Fortsätzen nachweisbar sind, weist auf eine mögliche Rolle von lokaler Proteinsynthese, parallel zur somatischen Proteinsynthese in Zellkultur hin und bildet eine Basis für weitere Untersuchungen einer lokalen Proteinsynthese in den Fortsätzen der Astrozyten.

3.11 Markierung von lokaler Proteinsynthese in Astrozyten

Um weitere Informationen über eine mögliche lokale Translation in oder nahe trisynaptischer Seiten in Astrozyten zu erzielen, wurde ein weiterer Ansatz gewählt, der auf einer lokalen Markierung von Proteinneusynthese basiert und dies mit dem Ansatz Zell-spezifischer Proteinmarkierung kombiniert. Eine Lokalisation der LtoGMetRS in oder nahe astroglärer Filopodia, die wie bereits beschrieben, Kontakt zu neuronalen Synapsen herstellen und den astroglären Teil der Trisynapse ausmachen, sollte eine lokale Markierung von neu synthetisierten Proteinen durch die Verwendung der nichtkanonischen Aminosäure ANL ermöglichen. Dies erlaubt eine Unterscheidung von der genexpressionsabhängigen Proteinneusynthese in Kernnähe und einer lokalen Proteinneusynthese in den feinen astroglären Fortsätzen durch die Visualisierung von ANL markierten Proteinen mit einer Fluoreszenzsonde oder eine Separation der markierten Proteine über Affinitätsaufreinigung und Identifizierung mittels Massenspektrometrie nach Klick-Reaktion mit der Biotin-Alkin-Sonde.

Um die Aktivität der LtoGMetRS regional auf astrogläre Filopodia zu beschränken, ist es notwendig das Protein über zusätzliche Proteininteraktionen mit Filopodia-spezifischen Proteinen in den Fortsätzen der Astrozyten zu konzentrieren. Ein möglicher Ansatz für eine spezifische Lokalisation stellt das Protein Ezrin dar, das zur Familie der ERM-Proteine (Ezrin-Radixin-Moesin-Proteine) gehört. Ezrin konnte im Nervensystem in Astrozyten, aber nicht in Neuronen oder Oligodendrozyten beobachtet werden (Derouiche und Frotscher, 2001). ERM-Proteine binden an diverse Rezeptoren und Membranproteine, wenn durch Phosphorylierung die inaktive, geschlossene-Konformation des Proteins, die sich aus der zurückgefalteten C-terminalen Domäne ergibt, aufgelöst wird und so die N-terminale Ferm-Domäne für Bindung an Membranproteine freigibt. Über die C-terminale Domäne von aktiviertem Ezrin kann

weiterhin eine Bindung an das Zytoskelett realisiert werden und ermöglicht so eine Veknüpfung der Filopodiamembran mit dem Zytoskelett (McClatchey und Fehon, 2009).

Um zu überprüfen, ob Ezrin für eine Filopodia-spezifische Lokalisation der LtoGMetRS verwendet werden kann, wurden Fusionsproteine generiert, die Ezrin in Verbindung mit N- oder C-terminalem EGFP exprimieren. Um eine Aktivierung von Ezrin für eine Bindung an Membranproteine zu umgehen, wurden zusätzlich Fusionskonstrukte generiert, die lediglich die Ferm-Domäne von Ezrin enthalten und so eine inhibitorische Faltung von Ezrin ausschließen (Hamada *et al.*, 2000).

Die Fusionsproteine wurden nach transienter Transfektion in Hek293T-Zellen exprimiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie auf eine mögliche Anreicherung in Filopodia untersucht. Dabei zeigt sich, dass alle Fusionsproteine in Hek293T-Zellen ohne Beeinträchtigung der Zellvitalität überexprimiert werden können und die Bildung von Filopodia in Hek293T-Zellen durch die Überexpression nicht beeinträchtigt scheint (Abb. 3.19, A). Die Analyse der Fusionsproteine in diesen Zellen zeigt, dass eine N-terminale Positionierung von EGFP weder in Verbindung mit der Ferm-Domäne allein (EGFPFerm) oder mit Ezrin (EGFPEzrin) eine deutliche Anreicherung in Filopodia erlaubt. (Abb. 3.19, A). So liegen EGFPEzrin und EGFPFermEzrin weitgehend zytoplasmatisch lokalisiert vor und ähneln der Überexpression von EGFP allein. Positioniert man jedoch das EGFP C-terminal in Verbindung mit Ezrin (EzrinEGFP) reichert sich EGFP leicht in Filopodia von Hek293T-Zellen an (Abb. 3.19, A). Dieser Effekt kann verstärkt werden, wenn die Ferm-Domäne von Ezrin in Verbindung mit dem C-terminalen EGFP (FermEGFP) exprimiert wird. Hier zeigt sich eine deutliche Anreicherung von EGFP in den Filopodia, sowie nahe der Plasmamembran der Hek293T-Zellen. Zusätzlich zeigen Zellen, die das FermEGFP-Fusionsprotein überexprimieren zum Teil eine stärkere Ausbildung von Filopodia sowohl in Zahl als auch in Länge dieser Fortsätze.

Anschließend wurde das Konstrukt FermEGFP, das die stärkste Anreicherung in Filopodia zeigt, zusätzlich in Astrozyten transient transfiziert und auf EGFP Lokalisation analysiert. Auch hier lässt sich eine Anreicherung von EGFP in Filopodia und an der Zellmembran in Astroglia nachweisen (Abb. 3.20, B). In Zellen, die lediglich EGFP überexprimieren, findet sich zwar EGFP in den Filopodia, doch ist der Anteil von zytoplasmatisch vorliegendem EGFP hoch, während in FermEGFP-überexprimierenden Zellen der Anteil zytoplasmatischen EGFPs deutlich geringer ausfällt. Ähnlich wie in Hek293T-Zellen zeigt sich auch hier eine verstärkte Ausprägung von Filopodia in FermEGFP-überexprimierenden Zellen (Abb. 3.20, B).

Da mit Hilfe der Ferm-Domäne von Ezrin eine Anreicherung von EGFP in Filopodia und der Zellmembran gelang, während der Anteil an zytoplasmatisch lokalisiertem EGFP geringer ist, wurde ein Lentivirus generiert, der FermEGFPLtoGMetRS, mit der Ferm-Domäne in N-terminaler Position unter dem humanen GFAP-Promoter exprimiert (LVpGfaABC1D-FermEGFPMetRS; (Abb. 3.21)

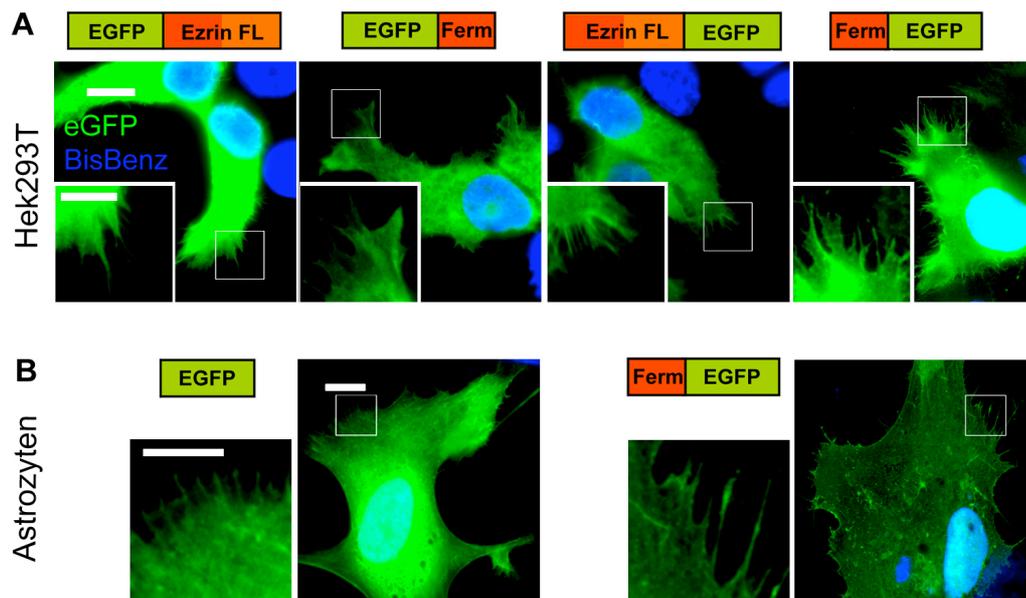


Abb. 3.20 Ezrin-vermittelte EGFP-Lokalisation in Hek293T-Filopodia

Ezrin oder die Ferm-Domäne von Ezrin wurden als Fusionsprotein mit N-terminal oder C-terminal positioniertem EGFP in Hek293T-Zellen transient transfiziert und am folgenden Tag auf eine mögliche Lokalisation in Filopodia mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert (A). Als Kernfärbung diente hierbei Bisbenzimid (BisBenz). Das N-terminal-plazierte Ezrin und verstärkt die N-terminale Ferm-Domäne, die den aktivierten Status von Ezrin simuliert, erlaubt eine Anreicherung von EGFP in Filopodia, sowie an der Plasma-Membran und führt im Fall von FermEGFP zu einer verstärkten Ausbildung von Filopodia in Hek293T-Zellen.

Ebenso weisen Astrozyten (Monokultur) 5 Tage nach transients Transfektion von Ferm-EGFP eine Anreicherung von EGFP in Filopodia auf, während der zytoplasmatische Anteil von EGFP im Vergleich zu Zellen, die EGFP allein exprimieren deutlich verringert ist (B). Die EGFP-Anreicherung wird besonders in Filopodia deutlich (siehe Ausschnitt). Zusätzlich ist auch eine Anreicherung von Ferm-EGFP zum Teil an der Plasmamembran erkennbar. (Maßstab entspricht 10µm, Maßstab des Ausschnitts entspricht 5 µm)

Um zu überprüfen, ob einerseits eine Lokalisation der LtoGMetRS in GFAP-positiven Zellen in einer Neuron-Glia-Kokultur gelingt und das Enzym durch die Fusion der Ferm-Domäne und einer möglichen Bindung an Membranproteine behindert ist, wurden kortikale Kokulturen mit dem Lentivirus (DIV16) infiziert und am Tag 21 mit Hilfe von FUNCAT auf die Fähigkeit ANL zu aktivieren, überprüft.

Dabei kann durch die Nutzung des lentiviralen Gentransfersystems auch hier über den verwendeten GFAP-Promoter eine Überexpression spezifisch in Zellen erreicht werden, die auch positiv für GFAP sind. Die Überexpression von FermEGFPLtoGMetRS nach Infektion von kortikalen Kokulturen zeigt ähnlich wie in Hek293T-Zellen und in Astrozyten aus Monokultur eine Anreicherung von EGFP in Filopodia im Vergleich zu Zellen, die EGFPLtoGMetRS exprimieren (Abb. 3.20).

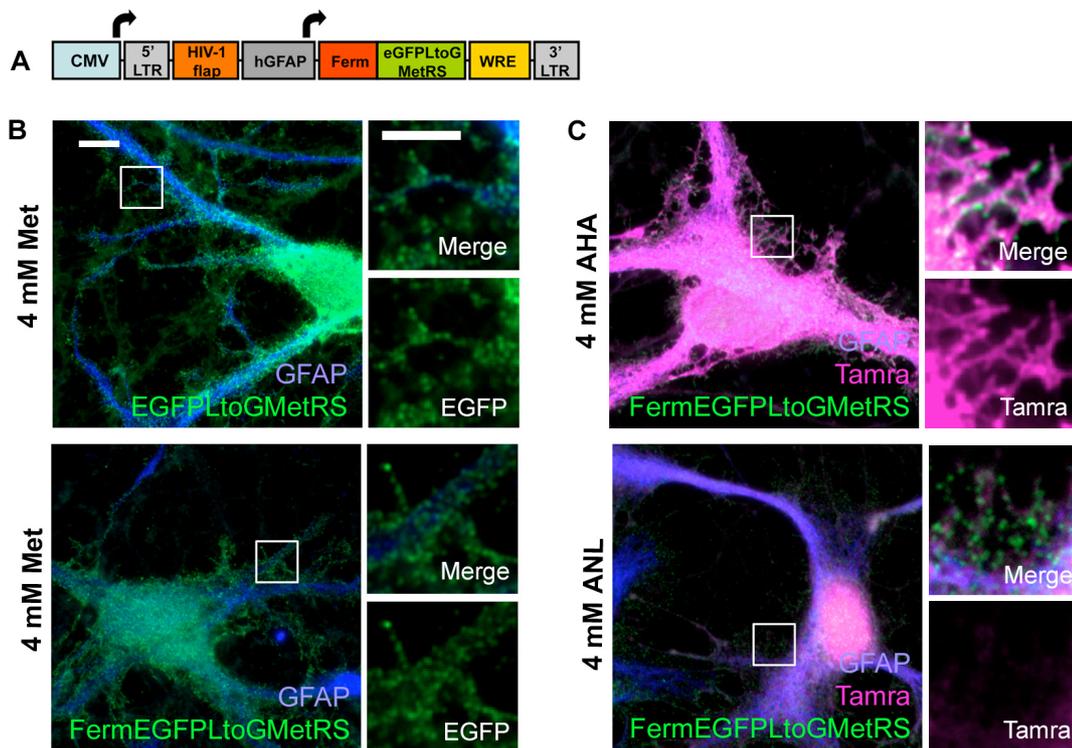


Abb. 3.21: Markierung der Proteinneusynthese mit FermLtoGMetRSEGFP

Kortikale Kokulturen (DIV16) wurden mit LVpGfaABC1D-FermEGFPMetRS (A) oder LVpGfaABC1D-EGFPMetRS infiziert und am Tag 21 in Methionin-freiem Medium für 4 h mit 4 mM AHA, ANL oder Methionin (Met) inkubiert. Nach Klick-Reaktion mit der Tamra-Alkin-Sonde wurden die Zellen von FermGFPLtoGMetRS mittels Immunzytochemie gegen EGFP und GFAP gefärbt und analysiert. FermEGFPLtoGMetRS zeigt sich vorwiegend granulär in Filopodia angereichert (B), während EGFPLtoGMetRS exprimierende Zellen zusätzlich zu EGFP-positiven Granula in Filopodia zum großen Teil eine somatische Lokalisation vorweisen.

Die Markierung von Proteinbiosynthese mittels ANL kann auch mit FermEGFPLtoGMetRS erfolgen. Infizierte Zellen zeigen Tamra-markierte Proteine im Zellkern, sowie im Zytoplasma (C), die Menge an markierten Proteinen ist im Vergleich zu Zellen, die mit AHA markiert wurden, gering, so dass im Vergleich zu den Tamra-positiven Filopodia (siehe Ausschnitt, C) nur ein schwaches Fluoreszenz-Signal in Filopodia von Zellen nach ANL-Markierung erkennbar ist.

(Maßstab entspricht 10 µm, Maßstab des Ausschnitts entspricht 5 µm)

Inwiefern sich die Überexpression von FermEGFPLtoGMetRS auf die Formation der Filopodia auswirkt, lässt sich jedoch nur schwer beurteilen.

Da auf Grund der zusätzlichen Modifikation des Fusionsproteins durch die Ergänzung der Ferm-Domäne und die dadurch einhergehende mögliche Interaktion mit Membranproteinen die Funktion der LtoGMetRS gestört werden könnte, wurden die infizierten Zellen mit ANL inkubiert, um neu synthetisierte Proteine zu markieren. Dabei lassen sich Tamra-markierte Proteine nach Klick-Reaktion mit der Fluoreszenzsonde sowohl im Kern, als auch im Zytoplasma infizierter Zellen nachweisen. Dies weist auf eine intakte Enzymaktivität der LtoGMetRS hin. Im Vergleich zu AHA-markierten Zellen ist jedoch die Menge an markierten Proteinen deutlich geringer. Auch eine Akkumulation Tamra-markierter Proteine in den

Filopodia, die FermEGFPLtoGMetRS enthalten, kann nur in gerigen Anteilen festgestellt werden.

Somit kann mit Hilfe der Ferm-Domäne des Proteins Ezrin eine deutliche Lokalisierung von EGFP in feinen Ausläufern oder Filopodia und an der Plasmamembran von Hek293T-Zellen oder Astrozyten in Monokultur erreicht werden, wenn die Ferm-Domäne N-terminal positioniert ist. Auch die Fusion der EGFPLtoGMetRS mit einer N-terminal platzierten Ferm-Domäne von Ezrin führt zu einer Akkumulation des Fusionsproteins in den feinen Zellfortsätzen von Astrozyten. Dabei erlaubt die Verwendung des GFAP-Promoters eine spezifische Expression in GFAP-positiven Zellen in einer Neuron-Glia-Kokultur. Das so modifizierte Protein ist in der Lage ANL zu aktivieren, dennoch kann auf Grund der schwachen Expression des Enzyms nur ein geringer Teil der Proteine markiert werden, so dass eine weitere Optimierung des Systems notwendig ist, um eine verbesserte Expression und somit eine stärkere Markierungseffizienz zu erreichen.

3.12 Zell-spezifische Markierung von Ribosomen

Lokale Proteinsynthese in gliären Fortsätzen ist besonders in Bezug auf die Funktion der Trisynapse interessant. Mögliche Adaptationsmechanismen der Astrozyten im astrogliären Teil der Trisynapse als Reaktion auf veränderte Aktivität der Synapse könnten eine lokale Proteinsynthese auch in den gliären Fortsätzen der Trisynapse notwendig machen. Anpassungen auf Ebene lokaler Translation setzt die Anwesenheit von freien Ribosomen oder Polyribosomen an Synapsen oder je nach Bedarf die Rekrutierung von Ribosomen zum gliären Teil der Synapse voraus.

Dass endogene Ribosomen nahe Gliafortsätzen auffindbar sind, kann durch immunzytochemische Färbungen beobachtet werden (Abb. 3.19). Der Nachweis von Ribosomen an dendritischen Spines über immunzytochemische Färbungen erlaubt jedoch keine eindeutige Unterscheidung zwischen neuronalen und astrogliären Ribosomen.

Um die Anwesenheit von astrogliären Ribosomen an dendritischen Spines in Zellkultur zu belegen und um eine mögliche Änderung der Ribosomenlokalisierung nach Aktivierung oder Inhibierung neuronaler Aktivität zu untersuchen, wurde ein EGFP-Fusionsprotein generiert, das als ribosomaler Marker ein hilfreiches Werkzeug für die Untersuchung des lokalen Translationssystems in Gliazellen darstellt. Mit der Zell-spezifischen Expression dieses Markers können markierte Ribosomen so direkt den Astrozyten zugeordnet werden.

Für die Etablierung eines Astrozyten-spezifischen, ribosomalen Markers wurde das bereits von Lam *et al.* etablierte Fusionsprotein RPL27EGFP verwendet (Lam *et al.*, 2007). Dabei zeigte sich anhand von Fraktionierungen zytoplasmatischer Ribosomen, dass die Fusion des ribosomalen Proteins L27 mit GFP eine Integration in die 60S Untereinheit der Ribosomen erlaubt und RPL27EGFP zusätzlich in 80S Ribosomen und Polysomen auffindbar ist (Lam *et*

al., 2007) Auch eine Störung der ribosomalen Funktion oder der Zellvitalität konnte bislang nicht beobachtet werden.

Um zu überprüfen, ob das Fusionsprotein auch in dem hier verwendeten System in Ribosomen integriert wird und diese Methode für die Markierung astroglärer Ribosomen angewendet werden kann, wurde in Zusammenarbeit mit Christine Freitag ein Konstrukt generiert, das die Expression von RPL27EGFP unter dem CMV-Promoter erlaubt. Die Überexpression von RPL27EGFP resultiert in EGFP-positiven Granula, die verstärkt im Kern sowie im Zytoplasma von Hek293T-Zellen vorliegen (Abb. 3.22, B). Die hier beobachtete subzelluläre Lokalisation des Fusionsproteins ist konsistent mit den bereits durch Lam *et al.* (2007) beschriebenen Ergebnissen und ist vergleichbar mit der Lokalisation anderer ribosomaler Proteine. Um zu überprüfen, ob RPL27EGFP erfolgreich in Ribosomen integriert wird, wurde eine Antikörper-vermittelte Affinitätsaufreinigung von RPL27EGFP oder EGFP allein in Hek293T-Zellen über EGFP vorgenommen und die kopräzipitierten Proteine auf mögliche Bindung der 40S Untereinheit mittels Western Blot-Analyse untersucht. Dabei kann das ribosomale Protein S6, das Teil der 40S Untereinheit ist, im Präzipitat nach RPL27EGFP-Aufreinigung angereichert werden, während S6 nach Aufreinigung von EGFP allein nicht detekierbar ist (Abb. 3.21). Dies deutet darauf hin, dass überexprimiertes RPL27EGFP in die 60S ribosomale Untereinheit integriert wird und RPL27EGFP enthaltende 60S Untereinheiten in der Lage sind mit der 40S Untereinheit zu interagieren, um funktionelle Ribosomen zu bilden.

Um weiterhin mögliche Einflüsse der RPL27EGFP-Integration auf die Funktionalität von Ribosomen zu untersuchen, wurde die generelle Translationsrate von Zellen, die RPL27EGFP überexprimieren mit Hilfe von BONCAT und FUNCAT überprüft. Dabei wurden EGFP oder RPL27EGFP exprimierende Hek293T-Zellen mit der nicht-kanonischen Aminosäure AHA inkubiert, um die Proteinneusyntheserate quantitativ einzuschätzen. Nach Zellyse und Klick-Reaktion mit der Biotin-Alkin-Sonde lässt sich die Translationsrate anhand des Biotin-Signals analysieren. Dabei konnten keine erkennbaren Unterschiede in der Menge an Biotin-markierten Proteinen gefunden werden (nicht gezeigt). Die Ergebnisse aus den FUNCAT-Experimenten unterstützen die Befunde. Auch hier wurden Hek293T-Zellen, die EGFP oder RPL27EGFP exprimieren mit AHA markiert und in der Klick-Reaktion mit der Tamra-Alkin-Sonde markiert. Dabei zeigen Zellen, die RPL27EGFP exprimieren eine ähnliche Menge an Tamra-markierten, neu synthetisierten Proteinen wie Zellen, die als Kontrolle EGFP exprimieren, oder untransfizierte Zellen (Abb. 3.22, B). Dies zeigt, dass die Proteinbiosynthese in Hek293T-Zellen, die RPL27EGFP überexprimieren, durch das Fusionsprotein nicht beeinträchtigt ist.

Ribosomen keinen Einfluss auf die Neusynthese von Proteinen hat, wurde ein Lentivirus generiert, der RPL27EGFP unter dem humanen GFAP-Promoter exprimiert (LVpGfaABC1D-RPL27EGFP). Kortikale Neuron-Glia-Kokulturen wurden mit dem Lentivirus infiziert und auf Kollokalisierung mit ribosomaler RNA, die als Marker assoziierter Ribosomen fungiert, immunzytochemisch untersucht.

Die Antikörperfärbung gegen ribosomale RNA 5.8s zeigt eine partielle Kollokalisierung von RPL27EGFP mit rRNA (Abb. 3.23, siehe Pfeil). Dies ist besonders deutlich im kernnahen Zytoplasma, aber auch in größerer Distanz zum Kern finden sich rRNA positive EGFP-Granula (Abb. 3.22, siehe Ausschnitt). Anteilig finden sich jedoch auch RPL27EGFP positive Granula, die negativ für eine Färbung gegen ribosomale RNA sind, so dass RPL27EGFP positive Granula nicht ausschließlich funktionellen Ribosomen zugeordnet werden können. Dennoch lässt sich ein ähnliches Verhalten in der Lokalisation von RPL27EGFP positiven und rRNA positiven Granula ausmachen. Ribosomen konzentrieren sich deutlich in Kernnähe und die Konzentration rRNA positiver Granula verringert sich deutlich distal zum Kern. Ein ähnliches Muster lässt sich auch für RPL27EGFP positive Granula feststellen (siehe Abb. 3.23, B), während freies EGFP eine deutlich zytoplasmatische Lokalisation aufweist und in der Lokalisation weder aggregiert noch eine deutliche Kernnähe zeigt (Abb. 3.19).

Um weitere Hinweise für die Existenz einer möglichen lokalen Proteinneusynthese in astroglären Filopodia zu erhalten, wurde die Lokalisation von RPL27EGFP positiven Granula in Relation zu gliären Markern und synaptischen Markern untersucht.

Eine Kofärbung mit Ezrin, das in Astrozyten, aber nicht in Neuronen exprimiert wird und in den feinen, gliären Filopodia akkumuliert, zeigt nur geringe Kollokalisierung mit RPL27EGFP, jedoch finden sich RPL27EGFP positive Granula in direkter räumlicher Nähe von Ezrin-positiven Aggregaten (siehe Pfeil, Abb. 3.22). Ähnliche Ergebnisse lassen sich bei einer Kofärbung mit dem präsynaptischen Marker Synapsin finden. Auch hier zeigen sich zum Teil RPL27EGFP positive Granula in direkter Nähe von Synapsin-positiven Granula (siehe Pfeil). Auf Grund der Zell-spezifischen Expression des ribosomalen Markers lässt sich vermuten, dass gliäre Ribosomen in oder nahe an den Filopodia der Astrozyten lokalisiert sind und auch gliäre Filopodia, die im Kontakt zu präsynaptischen Endigungen stehen, Ribosomen enthalten können.

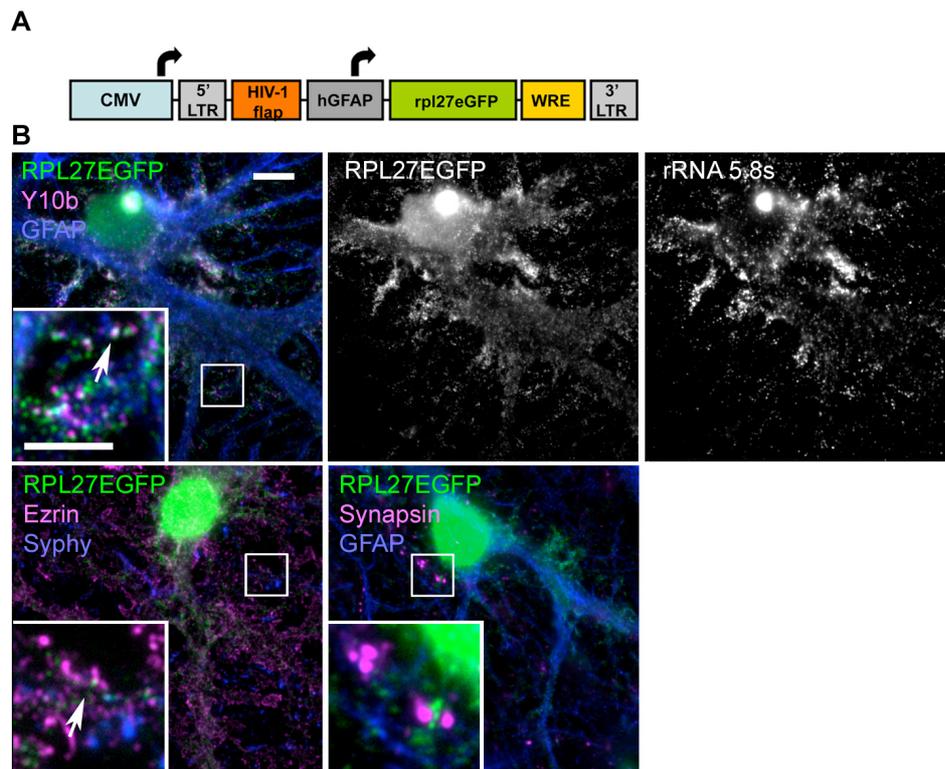


Abb. 3.23: Zell-spezifische Markierung von Ribosomen in Astrozyten

Die Verwendung eines lentiviralen Konstruktes LVpGfaABC1DRPL27EGFP erlaubt die Expression von RPL27EGFP unter dem humanen GFAP-Promoter (A). Die Expression von RPL27EGFP ist spezifisch für GFAP-positive Astrozyten in kortikalen Neuron-Glia-Kokulturen (B).

Immunzytochemische Färbungen in infizierten Kulturen (DIV21) zeigen partielle Kolo-kalisation von RPL27EGFP und der ribosomalen RNA 5.8s, die eine Integration von RPL27EGFP in Ribosomen suggerieren lässt (B). Eine Kolo-kalisation von rRNA 5.8s und RPL27EGFP lässt sich auch in astroglären Ausläufern nachweisen (siehe Pfeil, Vergrößerung, B). RPL27EGFP positive Granula weisen ähnliches Verhalten in ihrer Lokalisation, wie endogene Ribosomen mit einer deutlichen, kernnahen Konzentration und einer graduellen Abnahme distal zum Zellkern auf (B). Färbungen gegen den präsynaptischen Marker Synapsin zeigen einen geringen Anteil an EGFP positiven Granula, die mit dem synaptischen Marker kolo-kalisieren, jedoch finden sich EGFP-positive Partikel in direkter Nähe einiger Synapsin-positiver Synapsen (siehe Pfeil, C). RPL27EGFP kann ebenso nahe Ezrin-Akkumulationen in Astrozyten nachgewiesen werden (siehe Pfeil, B).

(Maßstab entspricht 10µm, Maßstab des Ausschnitts entspricht 5 µm)

Erste Versuche eine Zell-spezifische Markierung von Ribosomen zu etablieren um mögliche lokale Proteintranslation in Astrozyten zu untersuchen, zeigen, dass die Fusion von EGFP und dem Protein L27 der ribosomalen 60S Untereinheit und Überexpression in Hek293T-Zellen funktionsfähige Ribosomen markieren kann. Dabei wirkt sich die Überexpression von RPL27EGFP nicht negativ auf die Proteintranslation aus. Eine Zell-spezifische Expression von RPL27EGFP in Astrozyten ermöglicht ein Gentransfer über ein lentivirales System und RPL27EGFP positive Granula zeigen partielle Kolo-kalisation mit ribosomalen Markern. Auch in der Nähe von synaptischen und astroglären Markern lassen sich RPL27EGFP positive Granula detektieren. Dieses Fusionsprotein kann somit die Untersuchung der ribosomalen

Dynamik im Kontext der Neuron-Glia-Interaktion und eine mögliche Analyse lokaler Proteinsynthese in Astrozyten unterstützen.

3.13 Aufreinigung neu synthetisierter, sekretierter Proteine

Die Interaktion und Kommunikation zwischen Neuronen und Astrozyten während der Synaptogenese oder auch bei der Modulation synaptischer Stärke wird zum Teil über sekretierte Signalproteine realisiert. So erlaubt die Identifizierung und die Analyse von Dynamiken dieser Signalproteine in Abhängigkeit neuronaler Aktivität ein besseres Verständnis des Zusammenspiels zwischen Neuronen und Astrozyten.

Um potentielle Signalproteine zu identifizieren, die in einer Neuron-Glia Kokultur spezifisch von Astrozyten sekretiert werden, wurde die Aufreinigung von neu synthetisierten, extrazellulären Proteinen mit Hilfe der BONCAT-Technik entwickelt.

Für eine erste Etablierung der Methode kann AHA für eine Markierung neu synthetisierter Proteine genutzt werden, da die Aktivierung von AHA durch die endogene MetRS erfolgt, während die ANL Aktivierung auf die Expression der MetRS-Mutante LtoGMetRS angewiesen ist. Für die Markierung neu synthetisierter und sekretierter Proteine wurden reine Gliakulturen für 24 h mit Methionin-freiem Medium, das mit 4 mM AHA versetzt wurde, gehalten. Dabei zeigen die Monoglia-Kulturen nach AHA Inkubation keine morphologischen Auffälligkeiten. Da die Klick-Reaktion in Medium nur unzureichend funktioniert, wurde das konditionierte Medium abgenommen und durch Dialyse gegen PBS getauscht. Nach Reduktion und Alkylierung erfolgte die Bindung der DST-Alkin-Sonde an AHA-markierte Proteine durch Klick-Reaktion wie in Abschnitt 3.6 beschrieben. So markierte Proteine konnten mit Hilfe der NeutrAvidin-gekoppelten Agarose gebunden und aufkonzentriert werden.

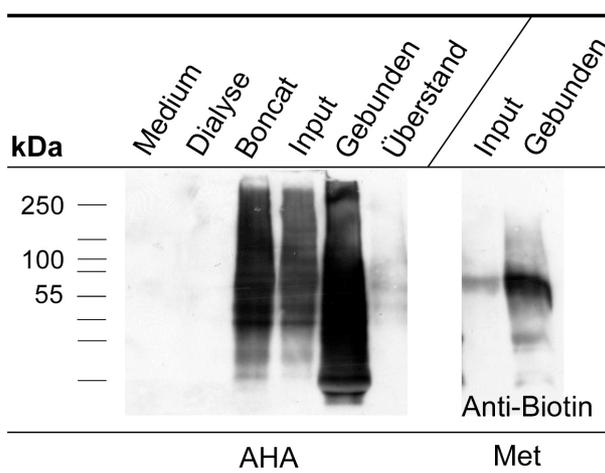


Abb.: 3.24 BONCAT von extrazellulären Proteinen aus Astrozyten

Reine Astrozyten-Kulturen (DIV14) wurden für 24 h mit Methionin-freiem Medium, supplementiert mit 4 mM AHA oder 4 mM Methionin, inkubiert. Biotin-Alkin-markierte Proteine lassen sich nach erfolgter Klick-Reaktion nachweisen, an NeutrAvidin-Agarose binden und somit aufkonzentrieren, wohingegen sich in Methionin-enthaltendem Medium lediglich potentiell endogen biotinylierte Proteine in geringen Mengen zeigen. An NeutrAvidin-Agarose gebundene, AHA-markierte Proteine weisen eine breite Varianz in der Molekulargröße auf.

Nr	Uniprot	Genname	Proteinname	Lokalisation	Funktion	MW kDa	AHA >25	Astro- prot
2	ALBU_RAT	ALB	Serum albumin	Extrazellulär	Transporter	68.7	AHA	Ja
3	CO3_RAT	C3	Complement C3	Extrazellulär	Peptidase	186.3	AHA	Ja
4	A2MG_RAT	A2M	Alpha-2-macroglobulin	Extrazellulär	Transporter	163.7		Ja
5	FMOD_RAT	FMOD	Fibromodulin	Extrazellulär	Andere	43.2		Ja
6	APOE_RAT	APOE	Apolipoprotein E	Extrazellulär	Transporter	35.7		Ja
7	C1S_RAT	C1S	<i>Complement C1s subcomponent</i>	Extrazellulär	Peptidase	77.0		Ja
8	CLUS_RAT	CLU	<i>Clusterin</i>	Extrazellulär	Andere	51.3		Ja
9	CO1A1_RAT	COL1A1	<i>Collagen (I) chain alpha-1</i>	Extrazellulär	Andere	137.9		Ja
10	CO1A2_RAT	COL1A2	<i>Collagen (I) chain alpha-2</i>	Extrazellulär	Andere	129.5		Ja
11	CO3_RAT	C3	<i>Complement C3</i>	Extrazellulär	Peptidase	186.3		Ja
12	CYTC_RAT	CST3	<i>Cystatin-C</i>	Extrazellulär	Andere	15.4		Ja
13	FINC_RAT	FN1	<i>Fibronectin</i>	Extrazellulär	Enzym	272.3		Ja
14	GELS_RAT	GSN	<i>Gelsolin</i>	Extrazellulär	Andere	86.0		Ja
15	IC1_RAT	SERPING1	<i>Plasma protease C1 inhibitor</i>	Extrazellulär	Andere	55.6		Ja
16	SAP_RAT	PSAP	<i>Sulfated glycoprotein 1</i>	Extrazellulär	Andere	61.1		Ja
17	SPRC_RAT	SPARC	<i>SPARC</i>	Extrazellulär	Andere	34.3		Ja
18	SPRL1_RAT	SPARCL1	<i>SPARC-like protein 1</i>	Extrazellulär	Andere	70.6		Ja
19	APOB_RAT	APOB	<i>Apolipoprotein B-100</i>	Extrazellulär	Transporter	535.7	AHA	Nein
20	SLIT1_RAT	SLIT1	<i>Slit homolog 1 protein</i>	Extrazellulär	Andere	167.4	AHA	Nein
21	A1I3_RAT	Mug1	<i>Alpha-1-inhibitor 3</i>	Extrazellulär	Transporter	163.7		Nein
22	LUM_RAT	LUM	<i>Lumican</i>	Extrazellulär	Andere	38.3		Nein
23	CS1_RAT	CSF1	<i>Macrophage colony-stimulating factor 1</i>	Extrazellulär	Zytokin	62.1		Nein
24	PCSK4_RAT	PCSK4	<i>Proprotein convertase subtilisin/kexin type 4</i>	Extrazellulär	Peptidase	75.7		Nein
25	PGS2_RAT	DCN	<i>Decorin</i>	Extrazellulär	Andere	39.8		Nein

Tabelle 3.1: Identifizierung neu synthetisierter, sekretierter Proteine aus Astrozyten

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse der nach AHA-Inkubation über die Biotin-DST-Sonde und NeutrAvidin-Agarose aufgereinigten sekretierten Proteine nach 24 h Inkubation einer Astrozyten-Monokultur mit 4 mM AHA. Ein Teil der Proteine kann mit Hilfe von AHA als neu synthetisiert eingestuft werden. Sekretierte Proteine zeigen eine breite Varianz an Molekulargewichten und erfüllen unterschiedliche, zelluläre Funktion.

Anhand der Biotin-Alkin-Sonde sind die einzelnen Schritte der Aufreinigung mittels Western-Blot-Analyse verfolgbar (Abb. 3.24). Dabei zeigt sich, dass sich durch die Bindung der Biotin-Alkin-Sonde die markierten Proteine fast vollständig anreichern und somit von unmarkierten Proteinen trennen lassen. Mit Hilfe der Affinitätsaufreinigung über Neutraividin-Agarose und der Massenspektrometrie nach Elution der Proteine von der NeutrAvidin-Agarose ließen sich so eine Reihe von extrazellulären Proteinen identifizieren (siehe Tabelle 3.1). Der Vergleich mit der Astroprot-Datenbank zeigt, dass ein Großteil dieser Proteine in der Literatur bereits als, von Gliazellen sekretierte Proteine beschrieben wurden. Darunter finden sich Proteine, die Strukturfunktionen in der extrazellulären Matrix übernehmen, wie Fibronectin, aber auch

Proteine mit potentieller Signalfunktion, wie SparcL1, die mit Hilfe von BONCAT aufgereinigt werden konnten. Dabei lassen sich auch zusätzlich zu Strukturproteinen mit einem hohen Molekulargewicht Signalproteine mit einem geringen Molekulargewicht von ca. 15 kDa (siehe Tabelle 3.1) isolieren.

Der eindeutige Nachweis der Proteinsynthese eines Proteins ermöglicht die direkte Identifizierung von AHA in Peptiden mittels Massenspektrometrie. Dabei finden sich einige AHA-positive, extrazelluläre Proteine, während eine Proteinneusynthese der übrigen Proteine nur indirekt über die NeutrAvidin-Aufreinigung angenommen werden kann und weiterer Validierung bedarf.

Um die Ergebnisse der Massenspektrometrie zu verifizieren, wurden beispielhaft zwei Proteine gewählt und die Anwesenheit im Medium sowie die Integration von AHA analysiert. Astrozyten in Monokultur wurden hierfür 24 h mit Methionin oder AHA in Methionin-freiem Medium kultiviert, und so markierte Proteine mit Hilfe der Biotin-Alkin-Sonde in der Klick-Reaktion markiert, anschließend an NeutrAvidin-Agarose gebunden und mittels spezifischen Antikörpern im Western-Blot nachgewiesen. Dabei zeigt sich auch hier, dass zwei, als bereits von Astrozyten sekretiert beschriebene Proteine Fibronectin und SparcL1 in der gebundenen Fraktion auffindbar sind, wenn die Proteine aus AHA-markiertem Medium gewonnen wurden. Eine Inkubation mit Methionin führt zu einer schwachen bzw. zu keiner nachweisbaren Bindung von SparcL1 oder Fibronectin.

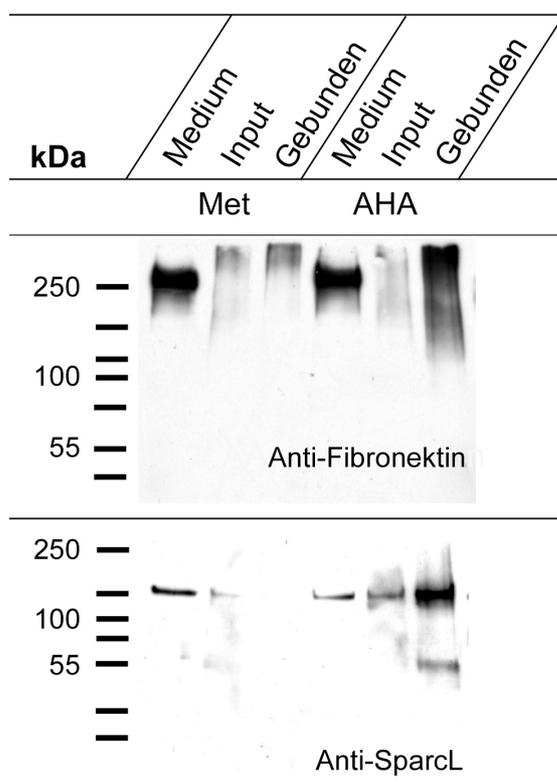


Abb. 3.25: Nachweis von AHA-markierten, extrazellulären Proteinen aus Astrozyten-Monokultur mittels Boncat

Reine Gliakulturen (DIV14) wurden für 24 h in Methionin-freiem Medium, supplementiert mit 4 mM AHA oder 4 mM Methionin, inkubiert. Das so konditionierte Medium wurde gereinigt und nach Klick-Reaktion mit der Biotin-Alkin-Sonde über Neutravidin-Agarose-Partikel aufkonzentriert. Sowohl Fibronectin (270 kDa), als auch SparcL1 (Monomer: 70 kDa, Dimer: 140 kDa) konnten mittels spezifischen Antikörpern an der NeutrAvidin-Agarose nachgewiesen werden, wenn die Zellen zuvor mit AHA inkubiert wurden. Nach Methionin-Inkubation sind Fibronectin und SparcL1 schwach im Input aber nicht oder nur schwach in der gebundenen Fraktion nachweisbar.

Um zu verifizieren, dass der zelluläre Ursprung der aufgereinigten Proteine tatsächlich auf Astrozyten zurückzuführen ist, wurden Fibronectin und SparcL1 mit spezifischen Antikörpern in Astrozyten-Monokulturen immunzytochemisch nachgewiesen. Tatsächlich können sowohl SparcL1, als auch Fibronectin in Zellkompartimenten nahe dem Zellkern detektiert werden (Abb 3.26).

Während das extrazelluläre Matrixprotein Sparc, das ebenfalls mittels Massenspektrometrie identifiziert wurde und strukturelle Ähnlichkeiten zu SparcL1 aufweist, einen inhibitorischen Einfluss auf die Etablierung von Synapsen hat, unterstützt SparcL1 die Bildung von Synapsen und beeinflusst die Größe exzitatorischer Synapsen in Zellkultur (Kucukdereli *et al.*, 2011). Um zu überprüfen, ob die Expression von SparcL1 durch einen direkten oder indirekten Kontakt zu Neuronen verändert wird, wurde SparcL1 zusätzlich in hippocampalen Astrozyten immunzytochemisch angefärbt. Auch in Astrozyten in Neuron-Glia-Kokulturen kann SparcL1 in Zellkompartimenten nahe des Kerns detektiert werden, während die Expression von Fibronectin in GFAP-positiven Gliazellen durch den Kontakt zu Neuronen und die daraus folgende verstärkte Differenzierung fast vollständig reduziert ist (Abb. 3.26).

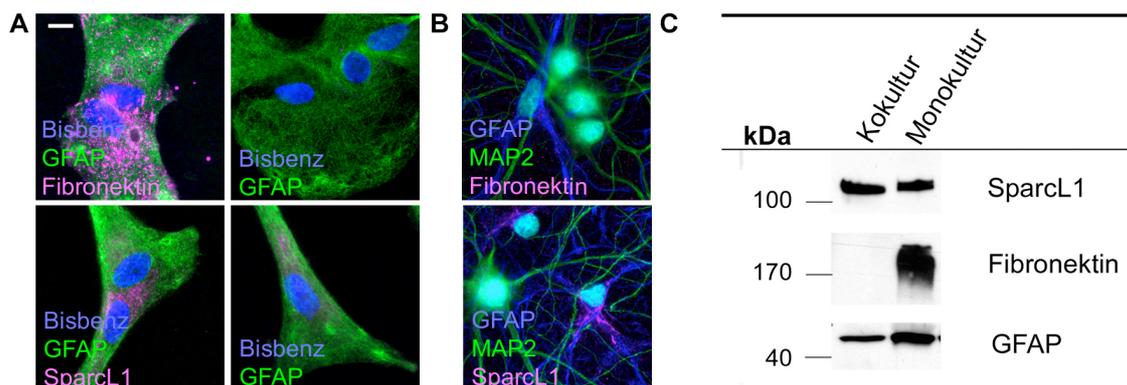


Abb. 3.26: Nachweis von extrazellulären Proteinen in Astrozyten

Die Expression der, durch Massenspektrometrie nachgewiesenen Proteine SparcL1 und Fibronectin lassen sich durch spezifische Antikörper mittels Immunzytochemie in Astrozyten einer Monoglia-Kultur (DIV21) detektieren und können somit eindeutig als in Astrozyten synthetisierte Proteine nachgewiesen werden (A). Die Färbung von GFAP, zusammen mit der Kernfärbung Bisbenzimid (Bisbenz), spezifiziert astrogläre Zellen. In der Neuron-Glia-Kokultur (DIV21) zeigt sich ein ähnliches Expressionsmuster in GFAP-positiven Glia für SparcL1, während die Fibronectin-Expression in Anwesenheit von Neuronen in den deutlich differenzierteren Astrozyten verringert ist (B). Die Western-Blot-Analyse von Zelllysaten der Astrozyten in Kokultur oder Monokultur zeigt keine Unterschiede in der Expression von SparcL1 (Dimer: 140 kDa), während das Fibronectin-Expressionslevel (270 kDa) in Neuron-Glia-Kokulturen stark reduziert ist. Der Nachweis von GFAP (50 kDa) belegt die Abundanz von Astrozyten in Neuron-Glia-Kokulturen. (Maßstab entspricht 10µm)

Während das Level an SparcL1 durch die Kokultur mit Neuronen nicht verändert ist, wird auch durch die Western-Blot-Analyse in Zelllysaten von Astrozyten, gehalten als Monokultur oder

als Kokultur, deutlich, dass die Expression von Fibronectin durch die Anwesenheit von Neuronen stark herunterreguliert ist (Abb. 3.26, C). Ähnliche Ergebnisse für den sekretierten Anteil an SparcL1 und Fibronectin lassen sich auch durch Western-Blot-Analysen von konditioniertem Medium aus Mono-oder Kokulturen replizieren (nicht gezeigt).

Wie bereits durch Kucukdereli *et al.*, (2011) gezeigt, beschränkt sich die SparcL1-Expression sowie *in vivo* als auch in Kultur auf Astrozyten. Auch in dem hier verwendeten Kokultursystem kann keine positive Immunfärbung für SparcL1 in Neuronen detektiert werden. Auf Grund der Nachweisbarkeit mittels Massenspektrometrie und Western-Blot-Analyse und der spezifischen Expression kann SparcL1 als Positivkontrolle für eine zukünftige Aufreinigung von ANL-markierten, sekretierten, astroglialen Proteinen verwendet werden.

Auf Grund der fehlenden Expression von SparcL1 in Neuronen, lässt sich somit eine direkte Aussage über Änderungen in der Expression von SparcL1 als Antwort auf neuronale Aktivität treffen, wenn Astrozyten in Kokultur mit Neuronen gehalten werden. Hierfür wurden kortikale Kulturen (DIV21) mit oder ohne BDNF stimuliert und nach 4 h Inkubation wurde konditioniertes Medium gesammelt und aufkonzentriert. Dabei konnte kein Unterschied zwischen dem Anteil in SparcL1 im Zellysat oder im Konzentrat des Mediums festgestellt werden (nicht gezeigt).

Diese Experimente verdeutlichen, dass über eine Markierung von nicht-kanonischen Aminosäuren, in Kombination mit der Klick-Reaktion, neu synthetisierte, sekretierte Proteine aufgereinigt und mittels Massenspektrometrie identifiziert werden können. Dabei lässt sich die spezifische Anreicherung von AHA markierten Proteinen anhand von SparcL1 und Fibronectin im Western-Blot replizieren. Dass das Proteom von Astrozyten, gehalten in Kokultur mit Neuronen, sich von dem der in Monokultur gehaltenen Zellen unterscheidet, zeigt beispielsweise das Expressionsmuster von Fibronectin, das in Kokultur mit Neuronen nicht oder nur gering exprimiert wird. Diese Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit Astrozyten im Kontext der Interaktion mit Neuronen zu untersuchen.

4 Diskussion

Die hochkomplexen Prozesse im zentralen Nervensystem, wie die Verschaltung von Neuronen während der Entwicklung, der Aufbau eines funktionalen neuronalen Netzwerkes, aber auch die Etablierung eines Gedächtnisses erfordern ein enges Zusammenspiel verschiedenster Zelltypen. So sind Astrozyten durch bidirektionale Kommunikation mit Neuronen in der Lage, die synaptische Stärke zu modulieren und Prozesse wie die Langzeitpotenzierung an der neuronalen Synapse zu beeinflussen. Inwieweit sich Astrozyten hingegen stabil an veränderte neuronale Aktivität anpassen ist jedoch weitgehend unverstanden. Dies ist zum Teil dem fehlenden methodischen Zugang zu spezifischen Zelltypen eines heterogenen Zellverbundes geschuldet.

Diese Dissertation beschreibt die Etablierung biochemischer, zellbiologischer und *in-silico*-Ansätze für die experimentelle Investigation Zell-spezifischer Plastizität auf Proteinebene. Sie zeigt somit methodisch neue Möglichkeiten auf, Zelltyp-spezifische Änderungen in der Proteinexpression innerhalb eines Gewebes zu untersuchen. Eine Markierung von neu synthetisierten Proteinen erfolgte mit Hilfe der nicht-kanonischen Aminosäure ANL. Voraussetzung für eine Aktivierung von ANL ist die Expression einer mutierten Variante der Methionyl-tRNA-Synthetase (MetRS), die zu einer Erweiterung der Methionin-Bindetasche führt. Die Modulation der Bindetasche und die daraus resultierende Bindung von ANL konnte durch den Austausch einer Aminosäure (LtoGMetRS) realisiert werden. Weiterhin wurde der Einsatz von GINCAT optimiert und auf experimentelle Anwendungen hin überprüft.

Eventuell toxische Effekte oder Änderungen des Proteinmetabolismus durch einen ANL-Einbau in neu synthetisierte Proteine ließen sich bislang nicht feststellen. Für eine Astrozyten-spezifische Analyse von Änderungen der Proteinexpression als Antwort auf neuronale Aktivität konnte eine spezifische Expression der LtoGMetRS in GFAP-positiven Zellen über ein lentivirales Gentransfersystem realisiert werden. Die Expression der LtoGMetRS erlaubt eine Zell-spezifische Markierung neu synthetisierter Proteine in Astrozyten mit ANL. Der Einbau von ANL in neu synthetisierte Proteine ließ sich mit Hilfe von BONCAT und FUNCAT visualisieren und markierte Proteine über Affinitätsaufreinigung isolieren. Zusätzlich sind weitere mögliche experimentelle Ansätze aufgezeigt, die eine Untersuchung Zell-spezifischer Proteinsynthese in Astrozyten unterstützen. Eine Zusammenfassung bereits publizierter Daten über das astrogläre Proteom bzw. Transkriptom in der Astroprot-Datenbank erlaubt eine Validierung der biochemischen Identifizierung Zell-spezifischer Proteine und stellt eine Grundlage für das Zusammenspiel der molekularen Mechanismen in Astrozyten dar.

Inwiefern eine Anpassung durch Änderungen der Proteinsynthese in Astrozyten lokal begrenzt erfolgt, ist nur unzureichend bekannt. Initiale immunzytochemische Färbungen von Mitgliedern des Proteinsyntheseapparates legen die Vermutung nahe, dass auch in distalen Filopodia der

Astrozyten lokale Proteinsynthese realisiert wird. Für die Analyse lokaler Proteinsynthese wurden zusätzlich innerhalb dieser Arbeit neue experimentelle Herangehensweisen initial etabliert. Mit Hilfe der Markierung des ribosomalen Proteins RPL27 mit EGFP lässt sich die große, ribosomale Untereinheit Zell-spezifisch in Astrozyten markieren und stellt somit ein experimentelles Werkzeug dar, um die Lokalisation und Dynamiken von Ribosomen und Proteintranslation in Astrozyten zu untersuchen.

Weiterhin erlaubt die Fusionierung der Ezrin-Ferm-Domäne an die EGFP-LtoGMetRS eine Lokalisation des Enzyms in astroglialen Filopodia sowie der Plasmamembran und kann zukünftig durch lokale Aktivierung von ANL eine Analyse möglicher lokaler Proteinneusynthese ermöglichen.

4.1 BDNF-Stimulation erhöht astrogliale Proteinneusynthese in Neuron-Glia-Kokulturen

Astrozyten und Neurone kommunizieren direkt über Zell-Zell-Kontakte oder indirekt über die Wahrnehmung sekretierter Botenstoffe wie Neurotransmitter oder Gliotransmitter und sind so in der Lage, die Stabilität der Synapse an die exogenen Erfordernisse anzupassen.

Um zu testen, ob die globale Proteinneusyntheserate in Astrozyten durch die Änderung neuronaler Aktivität beeinflusst wird, kann eine Markierung von neu synthetisierten Proteinen mit nicht-kanonischen Aminosäuren erfolgen. So wurden kortikale Neuron-Glia-Kokulturen mit BDNF für 4h stimuliert und Proteinsynthese mittels AHA markiert. Mit Hilfe von FUNCAT lässt sich die Proteinsyntheserate in Neuronen und in GFAP-positiven Zellen dieser Kokultur quantitativ beurteilen. Während eine Stimulation durch BDNF zu einer Erhöhung der Proteinsynthese in neuronalen Dendriten führt, lässt sich durch Reduktion neuronaler Aktivität mit Hilfe von TTX eine Verringerung neu synthetisierter Proteine in Dendriten beobachten (Abb. 3.14). In Astrozyten einer Neuron-Glia-Kokultur zeigt sich ebenfalls eine deutliche Erhöhung der Fluoreszenzintensität durch eine BDNF-Applikation um etwa 50%, während die Inkubation mit TTX keinen signifikanten Einfluss auf die Proteinsynthese aufweist (Abb. 3.15). Der hier beobachtete Einfluss von BDNF auf die Rate neu synthetisierter Proteine in GFAP-positiven Zellen ist abhängig von einem direkten oder indirekten Kontakt mit Neuronen, da eine Änderung der Proteinsyntheserate durch BDNF in Astrozyten, die in Monokultur gehalten wurden, nicht feststellbar ist (Abb. 3.15).

Über eine direkte oder indirekte Wirkung von BDNF auf Astrozyten, lässt sich bislang jedoch nur anhand der bereits bekannten Wirkungen von BDNF auf neuronale Zellen spekulieren. So zeigt das Neurotrophin BDNF unter anderem eine modulatorische Wirkung auf synaptische Aktivität (Santos *et al.*, 2010). BDNF reguliert verschiedene synaptische Prozesse, wie beispielsweise eine Erhöhung neuronaler Aktivität über die Regulation präsynaptischer Vesikelexozytose oder über eine postsynaptischer Erhöhung des Ladungsinflusses (Suen *et*

al., 1997; Pozzo-Miller *et al.*, 1999). Weiterhin fördert BDNF lokale Proteintranslation in dendritischen *Spines*. Diese multiplen Wirkungen von BDNF werden über den Neurotrophin-Rezeptor TrkB und die durch die Tyrosin-Kinasedomäne des Rezeptors aktivierten mTor, Erk oder PI3/Akt-Signaltransduktionswege vermittelt (Santos *et al.*, 2010). Während die Wirkung von BDNF in Neuronen über den TrkB-Rezeptor reguliert wird, zeigen Studien lediglich eine schwache Expression oder die Abwesenheit dieses TrkB-Rezeptors in kultivierten Astrozyten, so dass der beobachtete Effekt durch eine direkte Wirkung von BDNF in Astrozyten über diesen Rezeptor weitgehend ausgeschlossen werden kann (Rose *et al.*, 2003; Ohira *et al.*, 2007). Astrozyten hingegen exprimieren vorwiegend eine verkürzte Version des Rezeptors, den TrkB-T1-Rezeptor (Rose *et al.*, 2003; Ohira *et al.*, 2007). Trotz fehlender, C-terminaler Tyrosin-Kinasedomäne vermittelt auch dieser Rezeptor über eine unbekannte Interaktion von Membranproteinen verschiedenste Effekte in Astrozyten.

So führt die Aktivierung des TrkB-T1 zu einem Kalzium-Influx sowohl in Monokulturen, als auch in akuten, hippocampalen Schnitten (Rose *et al.*, 2003; Climent *et al.*, 2000). Beobachtete Änderungen in der Morphologie von Astrozyten in Monokultur und in kortikalen Schnitten lassen sich ebenso auf eine BDNF-vermittelte Aktivierung des Trk-T1 zurückführen (Ohira *et al.*, 2007). Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachtete Erhöhung der Proteinsyntheserate in Astrozyten durch eine direkte Wirkung von BDNF über die Aktivierung des Trk-T1-Rezeptors einer Neuron-Glia-Kokultur vermittelt wird. Der fehlende Effekt auf Glia-Monokulturen jedoch weist auf einen zusätzlichen Einfluss von Neuronen auf die Wirkung des BDNF in Astrozyten hin. Da jedoch nach Inkubation mit dem Neurotoxin TTX, das die Auslösung von Aktionspotentialen inhibiert und so die neuronale Aktivität in Kultur erniedrigt, keine Verringerung der Proteinsyntheserate in Astrozyten zu beobachten ist, liegt die Annahme nahe, dass der beobachtete Effekt über die Induktion lokaler Proteinneusynthese in dendritischen *Spines* vermittelt wird und der Einfluss auf die Proteinsynthese in Astrozyten über einen unbekanntes neuronales Signal realisiert wird. Erste Untersuchungen weisen BDNF-induzierte Expression beispielsweise von CamKII α oder Homer2 auf, Informationen über eine veränderte Expression oder Sekretion eines möglichen Botenstoffes, der in der Lage ist die beobachteten Effekte zu vermitteln, fehlen jedoch bisher (Schratt *et al.*, 2004). Eine weitere Möglichkeit beruht auf einem veränderten Genexpressionsprofil der Astrozyten, das durch die Anwesenheit von Neuronen in Kultur hervorgerufen werden kann. Eine veränderte Genexpression erklärt die Unterschiede in der Reaktion auf BDNF-Stimulation der Astrozyten in Mono- oder Kokultur. Dass sich die Genexpression von Astrozyten durch den Kontakt zu Neuronen tatsächlich ändert, lässt sich beispielhaft an den *gap-junction*-Proteinen Connexin-30 und Connexin-43 belegen, deren Expression durch die Anwesenheit von Neuronen in Kultur induziert wird (Koulakoff *et al.*, 2008; Rouach *et al.*, 2000). Weiterhin konnten auch Rudge *et al.* (1995) eine veränderte

Expression des neurotrophen Faktors *ciliary neurotrophic factor* (CNTF) beobachten, wenn Gliazellen in Kultur mit Neuronen kultiviert wurden. Auf Grund der vielfachen Wirkungsweisen von BDNF sind weitere Untersuchungen notwendig, um die Vermittlung der Aktivierung von Proteinsynthese in Astrozyten durch neuronalen Kontakt zu entschlüsseln.

Um Proteine zu identifizieren, die eine veränderte Expression durch eine Stimulation mit BDNF vorweisen, lassen sich auch mögliche Kandidaten aus bereits veröffentlichten Proteomstudien selektieren. Die hier verwendeten Analysen der Reaktion neuronaler Zellen auf BDNF-Stimulation listen zum Teil Glia-spezifische Proteine mit einer veränderten Expression auf und lassen vermuten, dass zumindest anteilig Proteine astroglären Ursprungs nicht vollständig aus neuronalen Präparationen separierbar sind und somit zum analysierten Protein-Pool beitragen (Schratt *et al.*, 2004; Liao *et al.*, 2007; Manadas *et al.*, 2009). Eine Analyse der Proteinexpression der zwei Kandidaten Ezrin und Glt1 lassen jedoch keine konkrete Aussage zu. Die Analyse der neu synthetisierten Fraktion, die mit Hilfe von BONCAT erfolgen kann, stellt eine sensitive Methode dar, da sie unbeeinflusst durch die bereits vorliegenden Proteine mögliche Unterschiede in der Proteinneusynthese verdeutlichen kann, erfordert jedoch eine ausreichende Menge an neu synthetisiertem Protein für einen Nachweis über Western-Blot-Analysen (Abb. 3.17). Dieser Nachweis gelang für Connexin-43, das im Eluat nach BDNF-Stimulation und NeutrAvidin-Aufreinigung im Vergleich zur Kontrolle leicht erhöht vorgefunden wird (Abb. 3.17). Während eine Immunfluoreszenz, Western-Blot-Analyse und die Blockierung von Proteinsynthese mittels Anisomycin die Vermutung nahe legen, dass tatsächlich neu-synthetisiertes Connexin-43 aufgereinigt wurde und nach BDNF-Stimulation erhöht ist, konnte eine Quantifizierung von Immunfluoreszenz-Experimenten diese Befunde nicht eindeutig unterstützen und muss durch Folgeexperimente weiter untersucht werden (Abb. 3.17).

4.2 Ein Aminosäureaustausch in der MetRS ermöglicht die Aktivierung von ANL und eine metabolische Markierung neu synthetisierter Proteine

Eine mögliche Analyse der durch BDNF-Stimulation veränderten Proteinneusynthese wird dadurch erschwert, dass dieser Effekt von direktem oder indirektem neuronalen Kontakt abhängig ist und in Monokultur gehaltene Astrozyten keine Reaktion auf BDNF oder TTX-Inkubation zeigen. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Notwendigkeit von Methoden, die eine Zell-spezifische Proteomanalyse innerhalb einer Mischkultur oder eines heterogenen Gewebes erlauben.

Erste Versuche einer Zell-spezifischen Markierung neu synthetisierter Proteine, wurden von Ngo *et al.* in *E.-coli* erfolgreich mit Hilfe der nicht-kanonischen Aminosäure ANL etabliert (Ngo *et al.*, 2009). Diese *E.-coli*-Zellen exprimieren eine modifizierte Form der Methionyl-tRNA-Synthetase, die auf Grund von Mutationen eine vergrößerte Methionin-Bindetasche aufweist und so auch ANL metabolisieren kann. Eine Übertragung auf das eukaryotische System

erschien auf Grund der ähnlichen Struktur der *E.-coli*-MetRS und der *Mus musculus*-MetRS sowie der hohen Zahl an konservierten Aminosäuren der Methionin-Bindetasche möglich (Abb. 3.1). Für zwei der drei getesteten Kombinationen von Aminosäureaustauschen in der *Mus musculus*-MetRS, die sich als besonders effektiv in *E.-coli* zeigten, konnte keine erfolgreiche ANL-Aktivierung in eukaryotischen Zelllinien nachgewiesen werden. Dies basiert eventuell auf Unterschieden in der Konformation der Bindetasche von *Mus musculus* und *E.-coli*-MetRS. Der Aminosäureaustausch L13G, der in *E.-coli* entscheidend für die Bindung von ANL ist, da sie in allen positiv bewerteten MetRS-Mutanten allein oder in Kombination mit weiteren Aminosäureaustauschen vorkam, erwies sich auch in der *Mus musculus*-MetRS als effizient für die ANL-Aktivierung. So konnte analog zu *E.-coli* eine entsprechende MetRS-Mutante generiert werden, bei der Leucin274 zu Glycin mutiert wurde (Link *et al.*, 2006). Der Austausch dieses Leucins führt auch im eukaryotischen System zur gewünschten Aktivierung von ANL. Dies lässt sich mit Hilfe von FUNCAT und BONCAT sowie direkt durch Massenspektrometrie von Proteinen aus Hek293T-Zellen, die EGFP-LtoGMetRS exprimieren, zeigen (Abb. 3.2, Abb. 3.3, Abb. 3.4). Der Einbau von ANL ist spezifisch für Zellen, die EGFP-LtoGMetRS exprimieren und lediglich eine geringe unspezifische Aktivierung lässt sich durch die Wildtyp-MetRS im Vergleich zu Zellen, die mit Methionin inkubiert wurden, ausmachen (Abb. 3.12). Diese schwache, unspezifische Aktivierung ist ebenso in *E.-coli* beobachtet worden, kann jedoch bei ausreichender Aktivierung von ANL durch die LtoGMetRS weitgehend vernachlässigt werden (Link *et al.*, 2006). Weiterhin ist, ähnlich wie das bereits für die nicht-kanonische Aminosäure AHA beobachtet wurde, ein positiver Nachweis des ANL-Einbaus über Klick-Reaktion abhängig von Proteinsynthese, so dass der indirekte Nachweis über das Biotin bzw. Fluoreszenzsignal spezifisch für ANL-positive Proteine ist und somit eindeutige Aussagen über Qualität und Quantität von ANL-markierten, neu synthetisierten Proteinen zukünftig zulässt (Dieterich *et al.*, 2006).

Trotz der Vorteile der Zell-spezifischen Markierung von Proteinsynthese und der Identifizierung und Aufreinigung der markierten Proteine über eine entsprechende Sonde, ist der Grad der Manipulation des zellulären Systems durch die Überexpression eines Enzyms, den Einbau einer artifiziellen Aminosäure mit einer leicht veränderten Seitenkette und der notwendigen Depletion von Methionin im Vergleich zu den herkömmlichen Markierungsmethoden möglicherweise größer und kann zu falsch positiven Resultaten führen. Die Überprüfung von toxischen Effekten durch die Applikation von ANL und den Einbau von ANL in neu synthetisierte Proteine durch Toxizitätstests sowohl in Hek293T als auch in Neuronen, wiesen jedoch keine deutlichen toxischen Effekte nach. Auch Tests, die einen möglichen Anstieg der Proteolyse nach ANL-Einbau auf Grund von möglicher Proteinfehlfaltung untersuchen, konnten keine Anreicherung an ubiquitinylierten Proteinen oder eine Verringerung der Gesamtproteinmenge zeigen. Weiterhin lässt sich kein Effekt auf

die Fluoreszenzeigenschaften oder die enzymatische Aktivität von EGFP_{LtoGMEtRS} feststellen, wenn die Zellen mit ANL inkubiert werden. So lässt sich auch durch eine Verlängerung der ANL-Inkubationszeiten bis zu 4 h ein aktiver Proteinstoffwechsel anhand einer stetigen Zunahme der Tamra-Fluoreszenz beobachten, wenn die Zellen einer Neuron-Glia-Kokultur ANL in Proteine integrieren. Obwohl Methionin nur selten in funktionell entscheidenden Domänen für die Proteinstruktur ausschlaggebend ist, kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass der Austausch von Methionin durch ANL für bestimmte Proteine in einer Änderung der Proteinkonformation resultiert. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass trotz Methionin-Depletion in dem hier getesteten Zeitraum von 4 h Methionin durch mögliches Recycling begrenzt für Proteintranslation und Metabolismus zur Verfügung steht. Dies wird anhand der Massenspektrometrie-Analyse von ANL-markierter EGFP_{LtoGMEtRS} deutlich. Trotz über 12 stündiger Inkubation mit 4 mM ANL und 100 μ M SAM finden sich anteilig Peptide, die Methionin an Stelle von ANL tragen und somit keinen vollständigen Austausch von Methionin durch ANL vorweisen. Inwiefern Ergebnisse durch eine potentiell veränderte Zellvitalität beeinflusst werden, ist sicherlich auch von der Art der Anwendung der GINCAT-Technik abhängig und sollte je nach Anwendung auf toxische Effekte in dem zu untersuchendem System kontrolliert werden. Die hier beabsichtigte Anwendung der Markierung durch ANL für die Untersuchung der Proteinexpression durch neuronale Stimulation erfordert jedoch nur ANL-Inkubationszeiten von wenigen Stunden. In dem hier gewählten Zeitraum lassen sich potentielle Auswirkungen auf zelluläre Prozesse durch veränderte Proteinfunktionen nicht beobachten.

Inwiefern eine Methionin-Depletion entscheidend für eine Markierung mit ANL ist, wurde zusätzlich in Hek293T-Zellen getestet. So zeigt sich, dass die LtoGMEtRS auch in Anwesenheit von Methionin ANL aktivieren kann. Obwohl die Effizienz der Markierung gegenüber der Markierung in Abwesenheit von Methionin verringert ist, ermöglicht die Anwesenheit von Methionin verbesserte physiologische Bedingungen und eine Markierung von Proteinen *in vivo* oder über einen längeren Zeitraum (Abb. 3.8). Dass eine Markierung von Proteinen durch ANL in Anwesenheit von Methionin gelingt, bestätigt sich ebenfalls durch Markierungsexperimente in *Drosophila melanogaster* (in Präparation: Kobler, Erdmann *et al.*, 2012).

Beobachtbare Auffälligkeiten zeigen sich soweit nur durch eine starke Überexpression des EGFP_{LtoGMEtRS}-Fusionsproteins in Hek293T-Zellen, die den Überschuss an Fusionsproteinen zum Teil als Aggregate in den Zellen ablagern. Etwaige Auswirkungen auf die Zellvitalität nach Expression der EGFP_{LtoGMEtRS} über den Zell-spezifischen Promoter, der die Expression weitaus schwächer im Vergleich zum CMV-Promoter treibt, konnten jedoch nicht festgestellt werden. Die bisherigen Beobachtungen zeigen, dass der Einbau von ANL keine drastischen toxischen Effekte auf die Zellvitalität in Zellkultur hat und wird zudem durch

experimentelle Beobachtungen unterstützt, die deutlich machen, dass *Drosophila melanogaster*, die *Mus musculus* oder *Drosophila melanogaster*-EGFPLtoGMetRS exprimieren unter ständiger Zufütterung von ANL einen intakten Lebenszyklus aufrecht erhalten können (in Präparation: Kobler, Erdmann *et al.*, 2012).

4.3 GINCAT erlaubt die metabolische Markierung astroglärer Proteine in einer Neuron-Glia-Kokultur

Für die Analyse Zell-spezifischer Proteinexpression in Astrozyten wurde die in Hek293T-Zellen getestete LtoGMetRS spezifisch in GFAP-positiven Astrozyten in einer Neuron-Glia-Kokultur über den humanen GFAP-Promoter exprimiert. Der hier verwendete Promoter pGfaABC1D ist eine Version des humanen GFAP-Promoters, der entsprechende Enhancer-Elemente und den basalen Promoter enthält, aber auf Grund der geringeren Größe für eine Verwendung in lentiviralen Gentransfersystemen besser geeignet ist, als der ursprüngliche humane GFAP-Promoter. Eine Zunahme von unspezifischer Expression des getriebenen Transgens in neuronalen Zellen kann dabei experimentell für das Neuron-Glia-Kokultursystem nicht festgestellt werden (Abb. 3.11). Auch die Untersuchungen über die Zellspezifität der GFAP-Promotoren von Lee *et al.* (2008) beschreiben eine hohe Zellselektivität, sowie eine breite Expression in GFAP-positiven Zellen verschiedener Gewebe für die hier verwendete Promoterversion. Eine geringe unspezifische, neuronale Expression lässt sich jedoch auf Grund der zufälligen Integration der lentiviralen DNA nicht vollständig ausschließen und tatsächlich finden sich selten nach Infektion mit LVpGfaABC1D-EGFP EGFP-positive Neurone in Kultur, die jedoch auf Grund der sehr geringen Zahl nur wenig zum Gesamtpool der Proteine bei einer potenziellen Anwendung von GINCAT mit diesem Promoter beitragen sollten (Abb. 3.11). Tatsächlich zeigt sich die durch den pGfaABC1D-Promoter getriebene Expression der EGFPLtoGMetRS, wie bereits vorher durch die Zell-spezifische Expression von EGFP getestet, Zell-selektiv in GFAP-positiven Zellen in Neuron-Glia-Kokulturen. Auch eine Inkubation mit ANL erlaubt einen Nachweis von markierten, neu synthetisierten Proteinen in GFAP-positiven Zellen, die EGFP-LtoGMetRS exprimieren, wenn die ANL-Integration mit einer Tamra-Sonde in der Klick-Reaktion sichtbar gemacht wird (Abb. 3.12)

Um zu testen inwiefern die Verwendung von GINCAT eine Identifizierung Astrozyten-spezifischer Proteine mittels Massenspektrometrie ermöglicht, wurde eine Aufreinigung von ANL-markierten Proteinen nach Klick-Reaktion mit der DST-Biotin-Alkin-Sonde vorgenommen. Die Analyse erlaubt die Identifizierung verschiedenster Proteine. Einschränkungen in der molekularen Größe der identifizierten Proteine oder der zellulären Kompartimentierung können dabei nicht beobachtet werden. Unter den Proteinen finden sich zum Teil Astrozyten-spezifische Proteine, wie GFAP, was auf eine erfolgreiche Anreicherung von astroglären Proteinen hindeutet. Weiterhin finden sich Proteine, die vorwiegend ubiquitär exprimiert

werden und somit keine Aussagen über einen möglichen zellulären Ursprung zulassen. Anteilig lassen sich auch neuronalen Proteine mittels Massenspektrometrie identifizieren. Die Aufreinigung dieser Proteine ist durch die Verwendung der DST-Alkin-Sonde erklärbar. So kann es über die integrierte Disulfidbrücke der Sonde möglicherweise unspezifisch zu Reaktionen mit Cysteinresten im Protein kommen, so dass im Folgenden zum Teil neuronale Proteine aufgereinigt und eluiert werden (Szychowski *et al.*, 2010). Diese Erklärung wird auch durch eine Verwendung der Biotin-Alkin-Sonde unterstützt. Während GFAP nach ANL-Markierung und Aufreinigung in der gebundenen Fraktion nachweisbar ist, bindet das neuronale NCAM nicht an NeutrAvidin (Abb. 3.13). Zusätzlich bietet die Detektion von ANL innerhalb der Peptide über Massenspektrometrie eine Möglichkeit den zellulären Ursprung eindeutiger zu bestimmen. Dass sich ANL-markierte Proteine aufkonzentrieren, mittels Massenspektrometrie identifizieren und über Western-Blot verifizieren lassen, weist auf eine vielversprechende Anwendung von GINCAT bei der Identifizierung neu synthetisierter Proteine in Astrozyten hin.

4.4 GINCAT: Möglichkeiten und Grenzen für die Analyse des astroglären Proteoms

Die hier vorgestellte Methode der Zell-spezifischen Markierung von neu synthetisierten Proteinen (GINCAT) stellt eine vielversprechende Möglichkeit dar, um das Verständnis der funktionellen Rolle von Astrozyten im neuronalen Netzwerk anhand der Analyse von veränderter Proteinexpression zu verbessern.

So bringt auch die Markierung durch ANL im Vergleich zur Isotopmarkierung ähnliche Vorteile mit sich, wie bereits für FUNCAT und BONCAT gezeigt werden konnte (Dieterich *et al.*, 2010, Dieterich *et al.*, 2006). Die hoch spezifische Klick-Reaktion ANL-markierter Proteine mit Biotin- oder Fluoreszenzsonden über die Azidgruppe von ANL erlaubt nicht nur den Verlauf der Markierung und der Aufreinigung zu verfolgen, sondern ermöglicht auch die direkte Visualisierung von Proteinneusynthese selbst auf subzellulärer Ebene und bringt somit deutliche Vorteile im Vergleich zur konventionellen Aminosäureisotopmarkierung mit sich. So können bei der Verwendung der Biotin-Alkin-Sonde in der Klick-Reaktion die Proteinneusynthese oder der Abbau einzelner Proteine als Reaktion auf veränderte Bedingungen untersucht werden, ohne auf eine Zell-spezifische Überexpression des entsprechenden Proteins zurückgreifen zu müssen.

Daneben ermöglicht die Verwendung von Biotin-Sonden in der Klick-Reaktion eine Aufkonzentrierung und Isolation markierter Proteine und erlaubt so auch die Identifizierung von Proteinen, die weniger abundant vorliegen. Die Aufkonzentrierung von markierten Proteinen kann so einen Nachteil dieser Methode ausgleichen. Da nur eine Fraktion der Zellen innerhalb einer Mischkultur in der Lage ist, ANL in neu synthetisierte Proteine einzubauen,

ANL zum Teil mit endogenem Methionin konkurriert und die Markierung der Proteine abhängig ist von der Zahl der Methionin-Reste innerhalb eines Proteins, ist der zu erwartende Anteil der ANL-markierten Proteine in einem Proteingespaltpool gering. Aber auch die für die hier thematisierte Fragestellung der Anpassung von Astrozyten auf veränderte neuronale Aktivität in Bezug auf Proteinneusynthese erfordert kurze Markierungszeiten, so dass der Anteil konstitutiv exprimierter Proteine gering gehalten werden kann. Der Nachweis von Peptiden und insbesondere die Identifizierung von ANL für die Verifikation des astroglären Ursprungs erfordert jedoch für die Massenspektrometrie eine ausreichende Proteinkonzentration, so dass die Aufkonzentrierung über eine Biotin-Sonde in Kombination mit einer sensitiven Massenspektrometrie notwendig ist, um Proteine zu identifizieren, die als Antwort auf exogene Stimuli in ihrer Expression verändert sind. Für die Identifizierung gering abundanter Proteine kann auch eine Kombination von GINCAT mit weiteren Methoden sinnvoll sein, die eine Zell-spezifische Untersuchung auf Genexpressionsanalysen stützt und die auf Grund ihrer Sensitivität in der Lage sind auch Transkripte einzuschließen, die nur in geringer Kopienzahl vorliegen (Doyle *et al.*, 2008, Cahoy *et al.*, 2008).

Ein weiterer Vorteil der Methode ist die Verwendung von Zell-spezifischen Promotoren, um die Expression der LtoGMetRS sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu regulieren. In Monokultur gehaltene Astrozyten unterscheiden sich sowohl in Morphologie als auch in Physiologie von den Astrozyten *in vivo* und die von Monokultur erhaltenen Daten lassen somit nur bedingt Rückschlüsse auf das physiologische Verhalten von Astrozyten *in vivo* zu (Zhang and Barres, 2010). GINCAT hingegen erlaubt die Proteomanalyse innerhalb eines heterogenen Zellverbundes.

Auch andere Studien nutzen diese Möglichkeit der genetischen Modifikation eines Zelltyps, um so Zellen zu markieren und zu isolieren oder um Proteine wie beispielsweise das ribosomale Protein L10a Zell-spezifisch zu exprimieren und damit translationsaktive mRNA zu isolieren (Doyle *et al.*, 2008). Die Verwendung von Zell-spezifischen Promotoren ermöglicht somit eine Analyse des Zellstatus, der annähernd den *in vivo*-Bedingungen entspricht, ist jedoch darauf angewiesen, dass für den zu untersuchenden Zelltyp entsprechende Promotoren bekannt sind. So gestaltet sich die Suche nach geeigneten Promotoren besonders für die Transgen-Expression in Astrozyten für mögliche *in vivo*-Applikationen als schwierig. Auf Grund der Heterogenität dieser Zellen finden sich Subklassen von Astrozyten, die beispielsweise Unterschiede in der Expression astroglärer Marker, wie S100beta, GFAP oder Vimentin zeigen, doch ein Promoter, der die Expression in allen Subtypen erlaubt, ist bisher nicht bekannt (Freeman, 2010).

Zusammenfassend lässt sich folgern, dass GINCAT für die Analyse Zell-spezifischer Proteinneusynthese anwendbar ist. Diese Methode ergänzt bereits bestehende Methoden auf Grund der vielseitigen Applikation über verschiedene Zell-spezifische Promotoren, die

Möglichkeiten markierte Proteine für die Massenspektrometrie aufzukonzentrieren und Dynamiken der Proteinneusynthese direkt zu visualisieren. So ermöglicht diese Methode einen Einblick in die dynamischen Änderungen auf der Ebene des Proteoms eines Zelltyps innerhalb eines heterogenen Zellverbundes.

4.5 Die Astroprot-Datenbank organisiert Informationen über das astrogläre Proteom

In den letzten Jahren, in denen den Astrozyten stärkeres Interesse entgegen gebracht wird, wurden Methoden entwickelt, um die molekularen Bestandteile dieser Zellen zu charakterisieren und so eine Basis für weitere Analysen der astroglären Funktionen zu schaffen. Auf Grund der Heterogenität dieser Zellen und der Einschränkungen der *in vitro*-Modelle, ist dieses Vorhaben methodisch schwierig und erfordert eine Kombination aus molekularbiologischen, biochemischen und bioinformatischen Techniken.

Um eine Analyse der Fülle von gewonnenen Daten aus Genexpressions und Proteomstudien zu erleichtern, wurden bereits veröffentlichte Daten über astrogläre Proteine in einer Astroprot-Datenbank zusammengefasst, die einen Vergleich mit zukünftig gewonnenen Ergebnissen erlaubt. Diese Datenbank ermöglicht die Suche nach spezifischen Proteinen und bietet Detailinformationen zu den jeweiligen Proteinen sowie zu den dabei verwendeten Methoden an und umfasst bereits über 19 000 Einträge aus bisher 9 Publikationen. Die hohe Zahl an Proteineinträgen resultiert zum Teil aus den verschiedenen methodischen Ansätzen mit denen die Daten gewonnen wurden. Darunter finden sich Genexpressionsanalysen und Massenspektrometrie-Studien, die zum Teil konventionelle Glia-Monokulturen, Astrozyten aus Gewebe oder Glioma-Zelllinien verwenden (Moore *et al.*, 2009; Cahoy *et al.*, 2008). Die hohe methodische Variabilität erfordert einerseits eine objektive Einschätzung bei dem Abgleich von Daten mit der Astroprot-Datenbank, erlaubt andererseits auch eine vielseitige Anwendung für Datenvergleiche, die auf verschiedenen experimentellen Wegen gewonnen wurden. Somit kann, auch nach weiteren Ergänzungen von Daten, die die Aussagekraft der Astroprot Datenbank zukünftig erhöhen wird, diese Datenbank genutzt werden, um vorhandene Expressionsdaten von astroglären Genen und Proteinen zu bündeln und somit experimentell gewonnene Daten zu bekräftigen.

4.6 Etablierung Zell-spezifischer Marker für die Untersuchung lokaler Proteinsynthese in Astrozyten

In Neuronen liegen nicht nur Elemente des Proteintranslationssystems in unmittelbarer Nähe zu Synapsen vor, sondern es findet auch eine lokale Proteinneusynthese in oder nahe dendritischen *Spines* statt, um so auf eine Änderung der neuronalen Aktivität mit der schnellen Bereitstellung von Schlüsselproteinen zu reagieren (Sutton and Schuman, 2006). Es ist

anzunehmen, dass dieser Mechanismus auf Grund der Vorteile, die eine rapide Bereitstellung von Proteinen mit sich bringt, nicht auf neuronale Zellen beschränkt ist und möglicherweise ähnliche Anpassungsmechanismen auch in Astrozyten vorfindbar sind. Dass zelluläre Anpassungen, die auf der Bereitstellung neu synthetisierter Proteine basieren, nicht vollständig durch die kernnahe Proteinsynthese am ER realisiert werden können, würde auf Grund der besonders *in-vivo* stark verzweigten Morphologie für eine lokale Proteinneusynthese sprechen. Lokale Proteinsynthese könnte auch eine gezielte Anpassung von Kontakten zu einer Subpopulation von Synapsen erlauben und so eine Modulation ausschließlich aktiver Synapsen steuern. Tatsächlich zeigen Astrozyten lokal begrenzte Aktivität in Form von Kalzium-Influx als Antwort auf elektrische Stimulation in sogenannten Mikrodomänen der Bergmann-Glia (Grosche et al., 2002).

Molekulare Grundlagen für eine lokale Proteinneusynthese, wie das Vorhandensein der notwendigen Elemente des Translationsapparates, darunter Ribosomen, Translationsinitiationsfaktoren und Elongationsfaktoren sowie entsprechende mRNA und zugehörige Proteine, die Transport und mRNA-Translation organisieren, sind bisher nur in neuronalen Dendriten gezeigt (Tiedge and Brosius, 1996). Hinweise darauf, dass eine Proteinneusynthese nahe oder innerhalb des astroglären Teils der Trisynapse ebenfalls existiert, geben einige experimentelle Befunde. So konnte beispielsweise eine Anreicherung der mRNA des gliaspezifischen Zytoskelettproteins GFAP in einer Synaptoneurosomenpräparation beobachtet werden (Crispino *et al.*, 2001). Mittels *in-situ*-Hybridisierung ließ sich weiterhin die mRNA von GFAP distal in astroglären Filopodia nachweisen. Weiterhin zeigten Astrozyten von FMRP-*Knock out*-Mäusen einen Einfluss auf neuronale Entwicklung und weisen so auf eine Funktion von FMRP, das eine wichtige Rolle im mRNA Transport in neuronalen Dendriten aufweist, in Astrozyten hin (Jacobs und Doering, 2010).

Inwiefern Elemente des Translationsapparates auch in Filopodia der Astrozyten nachweisbar sind, lieferten in dieser Doktorarbeit angefertigte immunzytochemische Färbungen in dem Neuron-Glia-Kokultursystem (Abb. 3.18). In GFAP-positiven Astrozyten, deren Fortsätze durch EGFP-Expression über den humanen GFAP-Promoter eindeutig den Astrozyten zugeordnet werden können und so einen neuronalen Ursprung ausschließen, finden sich vereinzelt Ribosomen sowie der Translationsinitiator eIF4E als auch die Methionyl-tRNA-Synthetase. Dies weist darauf hin, dass eine lokale Proteinneusynthese in Astrozyten in einem Neuron-Glia-Kokultursystem existiert, jedoch eine funktionelle Rolle und die Ausmaße anhand der gefundenen Elemente der Protein-Translationsmaschinerie nicht abzuschätzen sind und in Folgeexperimenten weiter untersucht werden muss. Der Vergleich zu neuronalen, MAP2-positiven Dendriten zeigt in immunzytochemischen Färbungen zum Teil eine weitaus höhere Konzentration an MetRS in den Dendriten, während eine ähnlich geringe Zahl an Granula für

Ribosomen oder EIF4E in Astrozyten und in Dendriten nachweisbar ist (Abb. 3.18).

Inwiefern eine Notwendigkeit für lokale Proteinsynthese in Astrozyten in Neuron-Glia-Kokulturen besonders in Bezug auf synaptische Plastizität besteht, ist mit den vorhandenen experimentellen Methoden nur unzureichend zu klären. Die beobachtete hohe Mobilität der astrozytären Filopodia an der Trisynapse, die durch Veränderungen der neuronalen Aktivität in verschiedenen Modellsystemen nachgewiesen werden konnte, legt jedoch die Vermutung nahe, dass ein erhöhter Bedarf besonders an zytoskelettalen Komponenten vorliegen könnte (Haber *et al.*, 2006). Tatsächlich lässt sich mit immunzytochemischen Färbungen von Astrozyten in Kultur in Kombination mit Zell-spezifischer Markierung von Proteinneusynthese durch ANL zeigen, dass in den Filopodia zum Teil ein erhöhter Bedarf an neu synthetisierten Proteinen existiert (Abb. 3.19). Hier lassen sich Akkumulationen Tamra-markierter Proteine in den Spitzen der Filopodia erkennen. Inwiefern die Tamra-positiven Proteine auf lokale Synthese oder auf Neusynthese im Zellsoma zurückzuführen sind, kann jedoch auf Grund der längeren Inkubationszeiten mit ANL nicht eindeutig beantwortet werden und muss in folgenden Studien näher untersucht werden. Auch die Art der Proteine lässt sich methodisch durch Markierung mit der Tamra-Sonde nicht analysieren. Dennoch erlaubt zukünftig die Zell-spezifische Markierung über ANL in Kombination mit der Affinitätsreinigung über eine Biotin-Sonde und mit Zellfraktionierung eine Identifizierung von ANL-markierten Proteinen in den Filopodia der Astrozyten.

Eine weitere Möglichkeit lokale Synthese nachzuweisen und Proteine, die lokal in gliären Filopodia generiert werden zu identifizieren, besteht darin auch die Markierung der Proteinneusynthese lokal auf Filopodia zu beschränken und so lokal synthetisierte Proteine im Vergleich zu somatisch synthetisierten Proteinen anzureichern. Um diese Möglichkeit zu realisieren, wurde in dieser Arbeit die Lokalisation von EGFP_{LtoGMetRS} an gliären Filopodia etabliert.

Dies wurde durch die Fusion von EGFP_{LtoGMetRS} und der Ferm-Domäne von Ezrin erreicht. Dabei zeigt sich eine Anreicherung von EGFP, N-terminal fusioniert mit der Ezrin-Ferm-Domäne in den Filopodia von Hek293T-Zellen. Die N-terminale Position der Ferm-Domäne scheint dabei für eine Lokalisation über die Bindung an Membranproteine ausschlaggebend zu sein, wie das auch bei weiteren Mitgliedern der ERM-Proteine beobachtbar ist (Fehon *et al.*, 2010). Anschließend konnte für das Fusionsprotein FermEGFP_{LtoGMetRS} eine Lokalisation in Filopodia sowohl in Monokulturen als auch nach Zell-spezifischer Expression über den humanen GFAP Promoter in Astroglia von Neuron-Glia-Kokulturen beobachtet werden, ähnlich wie dies bereits für das endogene Ezrin in Astrozyten beschrieben wurde (Derouiche und Frotscher, 2001). Kulturen, die die zytoplasmatische EGFP_{LtoGMetRS} überexprimieren, weisen weniger EGFP-positive Granula in Filopodia vor (Abb 3.20). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Lokalisation in Filopodia über die Ferm-Domäne

erfolgen kann. Inwiefern jedoch eine verstärkte Bindung der Ferm-Domäne an Membranproteine morphologische Veränderungen der Filopodia auslöst, muss in Folgeexperimenten geklärt werden. So zeigten Laviolle *et al.* einen Kollaps von Filopodia nach Überexpression der Ferm-Domäne von Ezrin als EGFP-Fusionsprotein (Laviolle *et al.*, 2011). Dies kann mit den in dieser Arbeit verwendeten Konstrukten bislang nicht beobachtet werden. Hier zeigt sich zum Teil eine stärkere Ausbildung von Filopodia in Hek293T-Zellen, auch in Abwesenheit der Aktin-bindenden C-terminalen Domäne von Ezrin (Abb. 3.19). Auch in Astrozyten ist es möglich, dass Filopodia zum Teil weitaus stärker ausgeprägt sind, wenn die Zellen Fem-EGFP_{LtoG}MetRS exprimieren. Dass eine Anreicherung eines überexprimierten Proteins in Filopodia über die Ezrin-Ferm-Domäne mögliche Nebeneffekte hat, ist jedoch nur schwierig auszuschließen. Auf Grund fehlender Informationen über den molekularen Aufbau des gliären Teils der Trisynapse kann bisher nicht, wie dies durch Grabrucker *et al.* in Neuronen versucht wurde, auf Bindestellen an Gerüstproteine der astroglialen Filopodia zurückgegriffen werden, um überexprimierte Proteine lokal zu verankern (Grabrucker *et al.*, 2009). FUNCAT Experimente zeigen, dass die Funktionalität der Ferm-EGFP_{LtoG}MetRS nach Fusion erhalten bleibt. So können Tamra-markierte Proteine nach Klick-Reaktion in Astrozyten beobachtet werden (Abb. 3.20, C). Dabei finden sich jedoch Tamra-positive Proteine weitgehend im Kern, zusätzlich sind ebenfalls Tamra-positive Signale in Filopodia erkennbar. Inwiefern dies jedoch auf eine lokale Synthese zurückzuführen ist, ist mit diesem experimentellen Ansatz nicht auszumachen. Schließlich sind auch deutlich Tamra-positive Proteine in den Filopodia von Zellen erkennbar, die mit AHA inkubiert wurden. Eine zukünftige Optimierung der Expressionsrate von FermEGFP_{LtoG}MetRS und Inkubationszeit mit ANL stellt eine Möglichkeit dar, lokale Proteinsynthese in diesem Modellsystem zu untersuchen. Ein weiterer Ansatz für die Untersuchung lokaler Proteinbiosynthese ermöglicht zusätzlich die Visualisierung von Ribosomen nahe synaptischen Endigungen und deren dynamisches Verhalten nach Änderung der neuronalen Aktivität. Um gliäre Ribosomen von neuronalen Ribosomen besonders in der Nähe von dendritischen *Spines* unterscheidbar zu machen, wurde hier ein Protein der ribosomalen Untereinheit mit EGFP fusioniert und mit Hilfe des GFAP-Promoters Zell-spezifisch exprimiert. Der bereits durch Lam *et al.* etablierte Marker, ist in der Lage in ribosomale Untereinheiten integriert zu werden ohne die generelle Funktion der Ribosomen zu beeinflussen (Lam *et al.*, 2007). Auch unsere Koimmunpräzitationsstudien belegen den Einbau von RPL27EGFP in Ribosomen (Abb 3.21, B). Dies zeigt, dass zumindest anteilig RPL27EGFP in ribosomale Komplexe integriert wird und diese in Assoziation mit der kleinen ribosomalen Untereinheit als funktionelle Einheit vorliegen. Auch nach Generierung eines Lentiviruses, der RPL27EGFP-Expression in Astrozyten ermöglicht, zeigt sich eine Lokalisation von RPL27EGFP, die stark dem Muster der endogenen Ribosomen ähnelt. Zusätzlich unterscheidet sich die Organisation in EGFP-positive Granula

eindeutig von der Lokalisation des unverankerten EGFP. Ebenso zeigt eine partielle Kolokalisation mit einem Antikörper gegen ribosomale RNA, dass ein Anteil von RPL27EGFP in Ribosomen integriert wird. Inwiefern die RPL27EGFP Granula, die keine Kolokalisation mit ribosomaler RNA aufweisen, auf fehlende Assoziation mit Ribosomen oder auf eine unvollständige Anfärbung der endogenen Ribosomen zurückzuführen ist, ist nicht eindeutig zu klären, so dass die Verwendung von RPL27EGFP und mögliche Schlüsse auf ribosomale Lokalisation in gliären Fortsätzen als ribosomalen Marker kritisch beurteilt und die RPL27-Integration durch Folgeexperimente weiter untersucht werden muss. Erste immunzytochemische Färbungen in Kombination mit der Überexpression von RPL27EGFP zeigen EGFP-positive Granula sowohl in Ezrin positiven Fortsätzen der Astrozyten, als auch in direkter Nähe des präsynaptischen Markers Synapsin. Des Weiteren kann der Marker auch zukünftig für die Untersuchung dynamischer Relokalisation der Ribosomen verwendet werden. So konnte Kim *et al.* zeigen, dass nach Stimulation neuronaler Kulturen Ribosomen verstärkt in distalen Dendriten angereichert vorzufinden sind, aber auch Studien in Neuronen existieren, die eine Erhöhung der dendritischen Lokalisation von mRNA bindenden Proteinen wie ZBP1 oder auch mRNA selbst beschreiben (Kim *et al.*, 2005; Tiruchinapalli *et al.*, 2003). Der hier verwendete Marker stellt somit ein nützliches Werkzeug dar, um den zellulären Ursprung von Ribosomen zu verifizieren und um eine potenzielle Relokalisation durch Änderungen der neuronalen Aktivität zu beleuchten.

4.7 Ausblick

Die Stimulation kortikaler Neuron-Glia-Kokulturen zeigte, dass als Antwort auf die BDNF-Applikation Proteinsynthese in Astrozyten erhöht wird und dass dieser Effekt abhängig von direktem oder indirektem neuronalen Kontakt ist. Welche molekularen Mechanismen diesem Phänotyp zugrunde liegen, ist anhand der hier durchgeführten Experimente nicht beantwortet und muß in Folgeexperimenten näher analysiert werden. Inwieweit dieser Effekt indirekt durch neuronale Botenstoffe, über einen direkten neuronalen Kontakt oder über ein verändertes, gliäres Expressionsmuster im Vergleich zu Monokulturen zustande kommt, kann zusätzlich Bestandteil weiterer Experimente sein. Interessant ist zudem die Analyse der Proteine, deren Expression durch die BDNF-Applikation induziert wird. So lässt sich das hier etablierte GINCAT für eine zukünftige Analyse des Proteoms der Astrozyten in Kokultur anwenden. Die so gewonnenen Informationen erlauben im Anschluss potentielle Rückschlüsse auf eine Reaktion der Astrozyten *in vivo*, wenn BDNF auf Grund von erhöhter, neuronaler Aktivität von Neuronen synthetisiert und ausgeschüttet wird.

Das hier etablierte GINCAT kann zudem auch für die Untersuchung in unterschiedlichen Kontexten verwendet werden. Dabei leistet eine Analyse veränderter Proteinexpression unter verschiedenen Stimuli oder die Untersuchung von sekretierten, gliären Proteinen einen Beitrag

für das Verständnis der Neuron-Glia-Interaktion. Interessant ist auch welche Proteine zu komplexen Strukturen, wie der extrazellulären Matrix, oder der Trisynapse von den Astrozyten beigetragen werden. So kann das Wissen um die molekulare Zusammensetzung von astroglären Filopodia das Verständnis des modulativen Beitrags der Astrozyten auf neuronale Aktivität verbessern. Diese Fragestellungen lassen sich über die Astrozyten-spezifische Markierung von Proteinen mit Hilfe von GINCAT beantworten.

Zusätzlich erlaubt ein lentiviraler Gentransfer diese Methode auf hippokampale Gehirnschnitte zu übertragen, um die in Zellkultur gewonnenen Erkenntnisse unter *in situ*-Bedingungen zu überprüfen. GINCAT kann zudem durch die Generierung von transgenen Mausmodellen helfen, Informationen über das astrogläre Proteom *in vivo* zu sammeln.

Eine weitere Analyse und Optimierung des ribosomalen Markers RPL27EGFP, sowie der in Filopodia verankerten LtoGMetRS kann zusätzliche Methoden schaffen, die helfen eine mögliche lokale Proteinsynthese in Astrozyten durch Analyse von Dynamiken der astroglären Ribosomen oder der Identifizierung lokal markierter, neu synthetisierter Proteine über ANL oder die Assoziation von mRNA an markierte Ribosomen zu untersuchen. Dabei erlaubt auch hier die Verwendung des lentiviralen Gentransfersystems einen Einsatz in Gehirnschnitten nach Etablierung dieser molekularen Werkzeuge. So kann beispielsweise eine Relokalisation des ribosomalen Markers oder eine mögliche Akkumulation neu synthetisierter Proteine in Astrozyten unter veränderten neuronalen Aktivitäten in Folgeexperimenten analysiert werden. Die hier entwickelten Methoden erlauben somit die Verfolgung verschiedenster, experimenteller Ansätze und sind so in der Lage zukünftig zum Erkenntnisgewinn über die Neuron-Glia-Kommunikation beizutragen.

5 Literatur

- Abdeljabbar, D.M., Klein, T.J., Zhang, S., und Link, A.J. (2009). A single genomic copy of an engineered methionyl-tRNA synthetase enables robust incorporation of azidonorleucine into recombinant proteins in *E. coli*. *J. Am. Chem. Soc.* *131*, 17078–17079.
- Alberi, L., Liu, S., Wang, Y., Badie, R., Smith-Hicks, C., Wu, J., Pierfelice, T.J., Abazyan, B., Mattson, M.P., Kuhl, D., et al. (2011). Activity-induced Notch signaling in neurons requires Arc/Arg3.1 and is essential for synaptic plasticity in hippocampal networks. *Neuron* *69*, 437–444.
- Angulo, M.C., Kozlov, A.S., Charpak, S., und Audinat, E. (2004). Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus. *J. Neurosci.* *24*, 6920–6927.
- Araque, A., Martín, E.D., Perea, G., Arellano, J.I., und Buño, W. (2002). Synaptically released acetylcholine evokes Ca²⁺ elevations in astrocytes in hippocampal slices. *J. Neurosci.* *22*, 2443–2450.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidmann, J.A., Smith, K., und Struhl, K. (1990). *Current protocols in molecular biology* (New York: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons).
- Baskin, J.M., Prescher, J.A., Laughlin, S.T., Agard, N.J., Chang, P.V., Miller, I.A., Lo, A., Codelli, J.A., und Bertozzi, C.R. (2007). Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 16793–16797.
- Besnard, F., Brenner, M., Nakatani, Y., Chao, R., Purohit, H.J., und Freese, E. (1991). Multiple interacting sites regulate astrocyte-specific transcription of the human gene for glial fibrillary acidic protein. *J. Biol. Chem.* *266*, 18877–18883.
- Brenner, M., Kisseberth, W.C., Su, Y., Besnard, F., und Messing, A. (1994). GFAP promoter directs astrocyte-specific expression in transgenic mice. *J. Neurosci.* *14*, 1030–1037.
- Brewer, G.J., und Price, P.J. (1996). Viable cultured neurons in ambient carbon dioxide and hibernation storage for a month. *Neuroreport* *7*, 1509–1512.
- Burgin, K.E., Waxham, M.N., Rickling, S., Westgate, S.A., Mobley, W.C., und Kelly, P.T. (1990). In situ hybridization histochemistry of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in developing rat brain. *J. Neurosci.* *10*, 1788–1798.
- Cahoy, J.D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L.C., Zamanian, J.L., Christopherson, K.S., Xing, Y., Lubischer, J.L., Krieg, P.A., Krupenko, S.A., et al. (2008). A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J. Neurosci.* *28*, 264–278.
- Chaudhry, F.A., Lehre, K.P., van Lookeren Campagne, M., Ottersen, O.P., Danbolt, N.C., und Storm-Mathisen, J. (1995). Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. *Neuron* *15*, 711–720.
- Christopherson, K.S., Ullian, E.M., Stokes, C.C.A., Mullowney, C.E., Hell, J.W., Agah, A., Lawler, J., Mosher, D.F., Bornstein, P., und Barres, B.A. (2005). Thrombospondins

- are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* 120, 421–433.
- Climent, E., Sancho-Tello, M., Miñana, R., Baretino, D., und Guerri, C. (2000). Astrocytes in culture express the full-length Trk-B receptor and respond to brain derived neurotrophic factor by changing intracellular calcium levels: effect of ethanol exposure in rats. *Neurosci. Lett.* 288, 53–56.
- Crispino, M., Capano, C.P., Aiello, A., Iannetti, E., Cupello, A., und Giuditta, A. (2001). Messenger RNAs in synaptosomal fractions from rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 97, 171–176.
- Derouiche, A., und Frotscher, M. (2001). Peripheral astrocyte processes: Monitoring by selective immunostaining for the actin-binding ERM proteins. *Glia* 36, 330–341.
- Dieterich, D.C. (2006). Selective identification of newly synthesized proteins in mammalian cells using bioorthogonal noncanonical amino acid tagging (BONCAT). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 9482–9487.
- Dieterich, D.C., Hodas, J.J.L., Gouzer, G., Shadrin, I.Y., Ngo, J.T., Triller, A., Tirrell, D.A., und Schuman, E.M. (2010). In situ visualization and dynamics of newly synthesized proteins in rat hippocampal neurons. *Nat Neurosci* 13, 897–905.
- Dieterich, D.C., Lee, J.J., Link, A.J., Graumann, J., Tirrell, D.A., und Schuman, E.M. (2007). Labeling, detection and identification of newly synthesized proteomes with bioorthogonal non-canonical amino-acid tagging. *Nat Protoc* 2, 532–540.
- Dittgen, T., Nimmerjahn, A., Komai, S., Licznanski, P., Waters, J., Margrie, T.W., Helmchen, F., Denk, W., Brecht, M., und Osten, P. (2004). Lentivirus-based genetic manipulations of cortical neurons and their optical and electrophysiological monitoring in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 101, 18206–18211.
- Dowell, J.A., Johnson, J.A., und Li, L. (2009). Identification of astrocyte secreted proteins with a combination of shotgun proteomics and bioinformatics. *J. Proteome Res.* 8, 4135–4143.
- Doyle, J.P., Dougherty, J.D., Heiman, M., Schmidt, E.F., Stevens, T.R., Ma, G., Bupp, S., Shrestha, P., Shah, R.D., Doughty, M.L., et al. (2008). Application of a translational profiling approach for the comparative analysis of CNS cell types. *Cell* 135, 749–762.
- Elmariah, S.B., Oh, E.J., Hughes, E.G., und Balice-Gordon, R.J. (2005). Astrocytes regulate inhibitory synapse formation via Trk-mediated modulation of postsynaptic GABAA receptors. *J. Neurosci.* 25, 3638–3650.
- Fehon, R.G., McClatchey, A.I., und Bretscher, A. (2010). Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 276–287.
- Fellin, T., Pascual, O., Gobbo, S., Pozzan, T., Haydon, P.G., und Carmignoto, G. (2004). Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron* 43, 729–743.
- Freeman, M.R. (2010). Specification and morphogenesis of astrocytes. *Science* 330, 774–778.
- Freitag, C. (2010). Zellspezifische Detektion und Visualisierung de novo synthetisierter Proteine mittels [3+2]-Azido-Alkin-Cycloaddition. Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg. (Diplomarbeit)

- Ge, W.-P., Yang, X.-J., Zhang, Z., Wang, H.-K., Shen, W., Deng, Q.-D., und Duan, S. (2006). Long-term potentiation of neuron-glia synapses mediated by Ca²⁺-permeable AMPA receptors. *Science* *312*, 1533–1537.
- Goslin, K., Asmussen, H., und Banker, G. (1998). Rat hippocampal neurons in low-density culture. In *Culturing Nerve Cells* (Banker G. Und Goslin K. Eds), (Cambridge, MA: MIT Press), pp. 339–370.
- Grabrucker, A.M., Vaida, B., Bockmann, J., und Boeckers, T.M. (2009). Efficient targeting of proteins to post-synaptic densities of excitatory synapses using a novel pSDTarget vector system. *J. Neurosci. Methods* *181*, 227–234.
- Greco, T.M., Seeholzer, S.H., Mak, A., Spruce, L., und Ischiropoulos, H. (2010). Quantitative mass spectrometry-based proteomics reveals the dynamic range of primary mouse astrocyte protein secretion. *J. Proteome Res.* *9*, 2764–2774.
- Grosche, J., Kettenmann, H., und Reichenbach, A. (2002). Bergmann glial cells form distinct morphological structures to interact with cerebellar neurons. *J. Neurosci. Res.* *68*, 138–149.
- Guizzetti, M., und Costa, L.G. (1996). Inhibition of muscarinic receptor-stimulated glial cell proliferation by ethanol. *J. Neurochem.* *67*, 2236–2245.
- Haber, M., Zhou, L., und Murai, K.K. (2006). Cooperative Astrocyte and Dendritic Spine Dynamics at Hippocampal Excitatory Synapses. *J. Neurosci.* *26*, 8881–8891.
- Hamada, K., Shimizu, T., Matsui, T., Tsukita, S., und Hakoshima, T. (2000). Structural basis of the membrane-targeting and unmasking mechanisms of the radixin FERM domain. *Embo J.* *19*, 4449–4462.
- Henneberger, C., Papouin, T., Oliet, S.H.R., und Rusakov, D.A. (2010). Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature* *463*, 232–236.
- Heukeshoven, J., Dernick, R., Heukeshoven, J., und Dernick, R. (1985). Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining, Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *ELECTROPHORESIS, ELECTROPHORESIS* *6*, *6*, 103, 103–112, 112.
- Hughes, E.G., Elmariah, S.B., und Balice-Gordon, R.J. (2010). Astrocyte secreted proteins selectively increase hippocampal GABAergic axon length, branching, and synaptogenesis. *Mol. Cell. Neurosci.* *43*, 136–145.
- Jacobs, S., und Doering, L.C. (2010). Astrocytes prevent abnormal neuronal development in the fragile x mouse. *J. Neurosci.* *30*, 4508–4514.
- Jakobsson, J., und Lundberg, C. (2006). Lentiviral vectors for use in the central nervous system. *Mol. Ther.* *13*, 484–493.
- Jones, E.V., Bernardinelli, Y., Tse, Y.C., Chierzi, S., Wong, T.P., und Murai, K.K. (2011). Astrocytes control glutamate receptor levels at developing synapses through SPARC-beta-integrin interactions. *J. Neurosci.* *31*, 4154–4165.
- Jones, T.A., Hawrylak, N., und Greenough, W.T. (1996). Rapid laminar-dependent changes in GFAP immunoreactive astrocytes in the visual cortex of rats reared in a complex environment. *Psychoneuroendocrinology* *21*, 189–201.

- Kähne, T., und Kolodziej, A. (2012). Synaptic proteome changes in mouse brain regions upon auditory discrimination learning. *Proteomics*, (in press)
- Keene, S.D., Greco, T.M., Parastatidis, I., Lee, S.-H., Hughes, E.G., Balice-Gordon, R.J., Speicher, D.W., and Ischiropoulos, H. (2009). Mass spectrometric and computational analysis of cytokine-induced alterations in the astrocyte secretome. *Proteomics* 9, 768–782.
- Kelleher, R.J., 3rd, Govindarajan, A., und Tonegawa, S. (2004). Translational regulatory mechanisms in persistent forms of synaptic plasticity. *Neuron* 44, 59–73.
- Kiick, K.L., Saxon, E., Tirrell, D.A., und Bertozzi, C.R. (2002). Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 99, 19–24.
- Kim, H.K., Kim, Y.-B., Kim, E.-G., und Schuman, E. (2005). Measurement of dendritic mRNA transport using ribosomal markers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328, 895–900.
- Kobler, O., Erdmann, I., Mueller, A., Thomas, U., und Dieterich, D.C. (2012). Cell-selective labelling of proteomes in *Drosophila melanogaster*. (in preparation)
- Koulakoff, A., Ezan, P., und Giaume, C. (2008). Neurons control the expression of connexin 30 and connexin 43 in mouse cortical astrocytes. *Glia* 56, 1299–1311.
- Kucukdereli, H., Allen, N.J., Lee, A.T., Feng, A., Ozlu, M.I., Conatser, L.M., Chakraborty, C., Workman, G., Weaver, M., Sage, E.H., et al. (2011). Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte-secreted proteins Hevin and SPARC. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, E440–449.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lam, Y.W., Lamond, A.I., Mann, M., und Andersen, J.S. (2007). Analysis of nucleolar protein dynamics reveals the nuclear degradation of ribosomal proteins. *Curr. Biol.* 17, 749–760.
- Landry, C.F., Watson, J.B., Kashima, T., und Campagnoni, A.T. (1994). Cellular influences on RNA sorting in neurons and glia: an in situ hybridization histochemical study. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 27, 1–11.
- Lavialle, M., Aumann, G., Anlauf, E., Pröls, F., Arpin, M., und Derouiche, A. (2011). Structural plasticity of perisynaptic astrocyte processes involves ezrin and metabotropic glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 12915–12919.
- Lee, Y., Messing, A., Su, M., und Brenner, M. (2008). GFAP promoter elements required for region-specific and astrocyte-specific expression. *Glia* 56, 481–493.
- de Leeuw, B., Su, M., ter Horst, M., Iwata, S., Rodijk, M., Hoeben, R.C., Messing, A., Smitt, P.S., und Brenner, M. (2006). Increased glia-specific transgene expression with glial fibrillary acidic protein promoters containing multiple enhancer elements. *J. Neurosci. Res.* 83, 744–753.
- Liao, L., Pilotte, J., Xu, T., Wong, C.C.L., Edelman, G.M., Vanderklish, P., und Yates, J.R., 3rd (2007). BDNF induces widespread changes in synaptic protein content and up-regulates components of the translation machinery: an analysis using high-throughput proteomics. *J. Proteome Res.* 6, 1059–1071.

- Link, A.J., Vink, M.K.S., Agard, N.J., Prescher, J.A., Bertozzi, C.R., und Tirrell, D.A. (2006). Discovery of aminoacyl-tRNA synthetase activity through cell-surface display of noncanonical amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *103*, 10180–10185.
- Link, A.J., Vink, M.K.S., und Tirrell, D.A. (2004). Presentation and detection of azide functionality in bacterial cell surface proteins. *J. Am. Chem. Soc* *126*, 10598–10602.
- Link, A.J., Vink, M.K.S., und Tirrell, D.A. (2007). Preparation of the functionalizable methionine surrogate azidohomoalanine via copper-catalyzed diazo transfer. *Nat Protoc* *2*, 1879–1883.
- Lois, C., Hong, E.J., Pease, S., Brown, E.J., und Baltimore, D. (2002). Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* *295*, 868–872.
- Lyford, G.L., Yamagata, K., Kaufmann, W.E., Barnes, C.A., Sanders, L.K., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Lanahan, A.A., und Worley, P.F. (1995). Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron* *14*, 433–445.
- Malenka, R.C., und Bear, M.F. (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* *44*, 5–21.
- Manadas, B., Santos, A.R., Szabadfi, K., Gomes, J.R., Garbis, S.D., Fountoulakis, M., und Duarte, C.B. (2009). BDNF-induced changes in the expression of the translation machinery in hippocampal neurons: protein levels and dendritic mRNA. *J. Proteome Res.* *8*, 4536–4552.
- McBee, J.K., Yu, L.-R., Kinoshita, Y., Uo, T., Beyer, R.P., Veenstra, T.D., und Morrison, R.S. (2007). Proteomic analysis of protein expression changes in a model of gliomagenesis. *Proteomics Clin Appl* *1*, 1485–1498.
- McClatchey, A.I., und Fehon, R.G. (2009). Merlin and the ERM proteins--regulators of receptor distribution and signaling at the cell cortex. *Trends Cell Biol.* *19*, 198–206.
- Messaoudi, E., Kanhema, T., Soulé, J., Tiron, A., Dagyte, G., da Silva, B., und Bramham, C.R. (2007). Sustained Arc/Arg3.1 synthesis controls long-term potentiation consolidation through regulation of local actin polymerization in the dentate gyrus in vivo. *J. Neurosci.* *27*, 10445–10455.
- Moon, I.S., Cho, S.-J., Seog, D.-H., und Walikonis, R. (2009). Neuronal activation increases the density of eukaryotic translation initiation factor 4E mRNA clusters in dendrites of cultured hippocampal neurons. *Exp Mol Med* *41*, 601–610.
- Moore, N.H., Costa, L.G., Shaffer, S.A., Goodlett, D.R., und Guizzetti, M. (2009). Shotgun proteomics implicates extracellular matrix proteins and protease systems in neuronal development induced by astrocyte cholinergic stimulation. *J. Neurochem.* *108*, 891–908.
- Murai, K.K., Nguyen, L.N., Irie, F., Yamaguchi, Y., und Pasquale, E.B. (2003). Control of hippocampal dendritic spine morphology through ephrin-A3/EphA4 signaling. *Nat. Neurosci.* *6*, 153–160.
- Musil, L.S., und Goodenough, D.A. (1991). Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques. *J. Cell Biol.* *115*, 1357–1374.

- Nägler, K., Mauch, D.H., und Pfrieder, F.W. (2001). Glia-derived signals induce synapse formation in neurones of the rat central nervous system. *J. Physiol. (Lond.)* 533, 665–679.
- Ngo, J.T., Champion, J.A., Mahdavi, A., Tanrikulu, I.C., Beatty, K.E., Connor, R.E., Yoo, T.H., Dieterich, D.C., Schuman, E.M., und Tirrell, D.A. (2009). Cell-selective metabolic labeling of proteins. *Nat. Chem. Biol* 5, 715–717.
- Nolte, C., Matyash, M., Pivneva, T., Schipke, C.G., Ohlemeyer, C., Hanisch, U.K., Kirchhoff, F., und Kettenmann, H. (2001). GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: a tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue. *Glia* 33, 72–86.
- Nwe, K., und Brechbiel, M.W. (2009). Growing applications of “click chemistry” for bioconjugation in contemporary biomedical research. *Cancer Biother. Radiopharm.* 24, 289–302.
- Ohira, K., Funatsu, N., Homma, K.J., Sahara, Y., Hayashi, M., Kaneko, T., und Nakamura, S. (2007). Truncated TrkB-T1 regulates the morphology of neocortical layer I astrocytes in adult rat brain slices. *Eur. J. Neurosci* 25, 406–416.
- Oldham, M.C., Konopka, G., Iwamoto, K., Langfelder, P., Kato, T., Horvath, S., und Geschwind, D.H. (2008). Functional organization of the transcriptome in human brain. *Nat. Neurosci.* 11, 1271–1282.
- Panatier, A., und Oliet, S.H.R. (2006). Neuron-glia interactions in the hypothalamus. *Neuron Glia Biol.* 2, 51–58.
- Park, M., Penick, E.C., Edwards, J.G., Kauer, J.A., und Ehlers, M.D. (2004). Recycling endosomes supply AMPA receptors for LTP. *Science* 305, 1972–1975.
- Pasti, L., Pozzan, T., und Carmignoto, G. (1995). Long-lasting changes of calcium oscillations in astrocytes. A new form of glutamate-mediated plasticity. *J. Biol. Chem* 270, 15203–15210.
- Perea, G., und Araque, A. (2005). Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes. *J. Neurosci* 25, 2192–2203.
- Perea, G., und Araque, A. (2007). Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science* 317, 1083–1086.
- Pielot, R., Smalla, K.-H., Müller, A., Landgraf, P., Lehmann, A.-C., Eisenschmidt, E., Haus, U.-U., Weismantel, R., Gundelfinger, E.D., und Dieterich, D.C. (2012). SynProt: A comprehensive Database for Proteins of the Detergent-resistant synaptic junctions fraction.
- Pozzo-Miller, L.D., Gottschalk, W., Zhang, L., McDermott, K., Du, J., Gopalakrishnan, R., Oho, C., Sheng, Z.H., und Lu, B. (1999). Impairments in high-frequency transmission, synaptic vesicle docking, and synaptic protein distribution in the hippocampus of BDNF knockout mice. *J. Neurosci.* 19, 4972–4983.
- Righi, M., Tongiorgi, E., und Cattaneo, A. (2000). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) induces dendritic targeting of BDNF and tyrosine kinase B mRNAs in hippocampal neurons through a phosphatidylinositol-3 kinase-dependent pathway. *J. Neurosci.* 20, 3165–3174.

- Rose, C.R., Blum, R., Pichler, B., Lepier, A., Kafitz, K.W., und Konnerth, A. (2003). Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signalling in glia cells. *Nature* *426*, 74–78.
- Rouach, N., Glowinski, J., und Giaume, C. (2000). Activity-dependent neuronal control of gap-junctional communication in astrocytes. *J. Cell Biol.* *149*, 1513–1526.
- Rudge, J.S., Pasnikowski, E.M., Holst, P., und Lindsay, R.M. (1995). Changes in neurotrophic factor expression and receptor activation following exposure of hippocampal neuron/astrocyte cocultures to kainic acid. *J. Neurosci.* *15*, 6856–6867.
- Sambrook, J.E.F.F., und Maniatis, T. (1989). Molecular cloning - a laboratory manual. In *Molecular Cloning - a Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press),.
- Santos, A.R., Comprido, D., und Duarte, C.B. (2010). Regulation of local translation at the synapse by BDNF. *Prog. Neurobiol.* *92*, 505–516.
- Schratt, G.M., Nigh, E.A., Chen, W.G., Hu, L., und Greenberg, M.E. (2004). BDNF regulates the translation of a select group of mRNAs by a mammalian target of rapamycin-phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway during neuronal development. *J. Neurosci.* *24*, 7366–7377.
- Seyfried, N.T., Huysentruyt, L.C., Atwood, J.A., 3rd, Xia, Q., Seyfried, T.N., und Orlando, R. (2008). Up-regulation of NG2 proteoglycan and interferon-induced transmembrane proteins 1 and 3 in mouse astrocytoma: a membrane proteomics approach. *Cancer Lett.* *263*, 243–252.
- Suen, P.C., Wu, K., Levine, E.S., Mount, H.T., Xu, J.L., Lin, S.Y., und Black, I.B. (1997). Brain-derived neurotrophic factor rapidly enhances phosphorylation of the postsynaptic N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *94*, 8191–8195.
- Sutton, M.A., und Schuman, E.M. (2006). Dendritic Protein Synthesis, Synaptic Plasticity, and Memory. *Cell* *127*, 49–58.
- Szychowski, J., Mahdavi, A., Hodas, J.J.L., Bagert, J.D., Ngo, J.T., Landgraf, P., Dieterich, D.C., Schuman, E.M., und Tirrell, D.A. (2010). Cleavable biotin probes for labeling of biomolecules via azide-alkyne cycloaddition. *J. Am. Chem. Soc* *132*, 18351–18360.
- Takei, N., Inamura, N., Kawamura, M., Namba, H., Hara, K., Yonezawa, K., und Nawa, H. (2004). Brain-derived neurotrophic factor induces mammalian target of rapamycin-dependent local activation of translation machinery and protein synthesis in neuronal dendrites. *J. Neurosci.* *24*, 9760–9769.
- Tanrikulu, I.C., Schmitt, E., Mechulam, Y., Goddard, W.A., 3rd, und Tirrell, D.A. (2009). Discovery of *Escherichia coli* methionyl-tRNA synthetase mutants for efficient labeling of proteins with azidonorleucine in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 15285–15290.
- Theis, M., Söhl, G., Eiberger, J., und Willecke, K. (2005). Emerging complexities in identity and function of glial connexins. *Trends Neurosci.* *28*, 188–195.
- Theodosios, D.T., Poulain, D.A., und Oliet, S.H.R. (2008). Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. *Physiol. Rev.* *88*, 983–1008.

- Tiedge, H., und Brosius, J. (1996). Translational machinery in dendrites of hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* *16*, 7171–7181.
- Tiruchinapalli, D.M., Oleynikov, Y., Kelic, S., Shenoy, S.M., Hartley, A., Stanton, P.K., Singer, R.H., und Bassell, G.J. (2003). Activity-dependent trafficking and dynamic localization of zipcode binding protein 1 and beta-actin mRNA in dendrites and spines of hippocampal neurons. *J. Neurosci.* *23*, 3251–3261.
- Tongiorgi, E., Armellin, M., Giulianini, P.G., Bregola, G., Zucchini, S., Paradiso, B., Steward, O., Cattaneo, A., und Simonato, M. (2004). Brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein are targeted to discrete dendritic laminae by events that trigger epileptogenesis. *J. Neurosci.* *24*, 6842–6852.
- Towbin, H., Staehelin, T., und Gordon, J. (1992). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* *24*, 145–149.
- Ullian, E.M., Sapperstein, S.K., Christopherson, K.S., und Barres, B.A. (2001). Control of synapse number by glia. *Science* *291*, 657–661.
- Witcher, M.R., Kirov, S.A., und Harris, K.M. (2007). Plasticity of perisynaptic astroglia during synaptogenesis in the mature rat hippocampus. *Glia* *55*, 13–23.
- Yang, J.-W., Rodrigo, R., Felipe, V., und Lubec, G. (2005). Proteome analysis of primary neurons and astrocytes from rat cerebellum. *J. Proteome Res.* *4*, 768–788.
- Yang, Y., Ge, W., Chen, Y., Zhang, Z., Shen, W., Wu, C., Poo, M., und Duan, S. (2003). Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through release of D-serine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *100*, 15194–15199.
- Yang, Y., Gozen, O., Watkins, A., Lorenzini, I., Lepore, A., Gao, Y., Vidensky, S., Brennan, J., Poulsen, D., Won Park, J., et al. (2009). Presynaptic regulation of astroglial excitatory neurotransmitter transporter GLT1. *Neuron* *61*, 880–894.
- Ying, S.-W., Futter, M., Rosenblum, K., Webber, M.J., Hunt, S.P., Bliss, T.V.P., und Bramham, C.R. (2002). Brain-derived neurotrophic factor induces long-term potentiation in intact adult hippocampus: requirement for ERK activation coupled to CREB and upregulation of Arc synthesis. *J. Neurosci.* *22*, 1532–1540.
- Zhang, Y., und Barres, B.A. (2010). Astrocyte heterogeneity: an underappreciated topic in neurobiology. *Curr. Opin. Neurobiol.* *20*, 588–594.
- Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R.J., Naldini, L., und Trono, D. (1997). Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat. Biotechnol.* *15*, 871–875.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AHA	Azidohomoalanin
AMPA	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>
Aniso	Anisomycin
ANL	Azidonorleucin
ATP	<i>Adenosintriphosphat</i>
BCA	Bicinchinonsäure
BDNF	<i>Brain derived neurotrophic factor</i>
Bisbenz	Bisbenzimidazole
BONCAT	<i>Bio-orthogonal noncanonical amino acid tagging</i>
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
C	Celsius
CA1	<i>Cornu ammonis 1</i>
cDNA	Komplementäre Desoxyribonucleinsäure
CNTR	Kontrolle
CO ₂	Kohlendioxid
CoIP	Koimmunpräzipitation
DIV	<i>Days in vitro</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphate
DST	Disulfide-Tag
E.-coli	<i>Escherichia coli</i>
EAAT	<i>Excitatory amino acid transporter</i>
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
E-LTP	Early long-time potentiation
EPSC	<i>Excitatory postsynaptic potential</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERM	Ezrin/Radixin/Moesin
et al.	et alias
Exp.	Experiment

FKS	Fötales Kälberserum
FUNCAT	<i>Fluorescence noncanonical amino acid tagging</i>
g	Erdbeschleunigung
GABA	<i>Gamma-aminobutyric acid</i>
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GINCAT	<i>Genetically introduced noncanonical amino acid tagging</i>
h	Stunden
HBSS	<i>Hank' balanced salt solution</i>
HIB	Hibernate
His	Histidin
IP	Immunpräzipitation
kDa	Kilo Dalton
LB	Luria Bertani
Leu	Leucin
L-LTP	<i>Late long-time potentiation</i>
LTD	<i>Long-term depression</i>
LTP	<i>Long-term potentiation</i>
M	Molar
mA	Milliampere
MAP2	<i>Microtubule-associated protein 2</i>
Met	Methionin
MetRS	Methionyl-tRNA-Synthetase
min	Minuten
mind.	mindestens
Mio	Millionen
mRNA	<i>Messenger RNA/ Boten-Ribonukleinsäure</i>
mV	Millivolt
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NP	Non-phosphorylated
ORF	<i>Open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>Phoshat-buffered Saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PI	Protease Inhibitor
RGC	<i>Retinal ganglion cell</i>
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure

RT	Raumtemperatur
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunden
SEM	Standardfehler/ Standard error of the mean
SOC	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>
T	Tausend
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	<i>Titanic burst stimulation</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TRAP	<i>translating ribosome affinity purification</i>
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
TTX	Tetrodotoxin
Tyr	Tyrosin
U	units
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
z.B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

6.2 Verwendete Primer für Klonierungen

Die Tabelle enthält die für Klonierung, Subklonierung und Punktmutation verwendeten Primer. Die Primerbindesequenzen entsprechen den Sequenzen des Open reading frames (ORF) der entsprechenden cDNA, bzw. der gesamten cDNA-Sequenz(cDNA).

Nr.	Bezeichnung	Primer-Sequenz (5'→3')	DNA-Vorlage/ Position	Verwendung/ Vektor
1	mRPL27 rev	ggt gga tcc cga aag cga agc t	mRPL27 (cDNA) bp: 218-209	Vektorklonierung pEGFP-N1
2	mRPL27 fwd	gct agg gaa ttc gtc gag atg g	mRPL27 (cDNA) bp: 622-607	Vektorklonierung pEGFP-N1
3	L274P_IPM fwd	tcaccagtgccggcccctatgtca	mMetRS (cDNA) bp: 966-989	Mutagenese
4	L274P_IPM rev	tga cat agg gtg ggg cac tgg tga	mMetRS (cDNA)	Mutagenese

			bp: 989-966	
5	Y527L_ IPM rev	tgatggacaccaagccaatagta	mMetRS (cDNA) bp: 1748-1726	Mutagenese
6	Y527L_ IPM fwd	tactattggcttgggtccatca	mMetRS (cDNA) bp: 1726-1748	Mutagenese
7	L274N_ IPM fwd	tcaccactgccaaccctatgtca	mMetRS (cDNA) bp: 966-989	Mutagenese
8	L274N_ IPM rev	tgacataggggttggcactgggta	mMetRS (cDNA) bp: 989-966	Mutagenese
9	L274G_ IPM fwd	tcaccagtgccggcccctatgtca	mMetRS (cDNA) bp: 966-989	Mutagenese
10	L274G_ IPM rev	tgacataggggcccggcactgggta	mMetRS (cDNA) bp: 989-966	Mutagenese
11	EzrinC1fwd	at act cga gat atgccaagccaatc	mEzrin (cDNA) bp:483-497	Vektorklonierung PEGFP-C1
12	EzrinC1rev	tgtgaattcgtctacatggcctcaaac	mEzrin (cDNA) bp: 2243-2228	Vektorklonierung pEGFP-C1
13	EzrinFermC1 rev	tgtgaattcgtctacctgctggcgcatgta	mEzrin (ORF) bp: 1367-1353	Vektorklonierung pEGFP-C1
14	EzrinN2 fwd	actc gag aug atg ccaagccaatcaa	mEzrin (cDNA) bp: 483-495	Vektorklonierung pEGFP-N2
15	EzrinN2 rev	tgtgaattcagtcattggcctcaaactc	mEzrin (cDNA) bp: 2243-2226	Vektorklonierung pEGFP-N2
16	EzrinFermN2 rev	tgtgaattcagtcctgctggcgcatgta	mEzrin (cDNA) bp: 1367-1353	Vektorklonierung pEGFP-N2
17	EzrinFermIBsrGI rev	tcagtcctgctggcgcatgtacagctc	mEzrin (cDNA) bp: 1368-1347	Vektorklonierung pEGFP-C1
18	EzrinFermIBsrGI fwd	atccgctagccaccatgccaagccaatc	mEzrin (cDNA) bp: 483-497	Vektorklonierung pEGFP-C1
19	EzrinFermIBsrGI fwd	gagctgtacatgcgccgaggactga	mEzrin (cDNA) bp: 1347-1368	Vektorklonierung pEGFP-C1
20	EzrinFermIBsrGI rev	gactgtacagctcgtccatgccgagag	EGFP (ORF)	Vektorklonierung pEGFP-C1

			bp: 718-689	
21	MetRSstart C1 fwd	Tc gaa ttc ggc acg agg ccg agg c	mMetRS (cDNA) bp: 148-156	Vektorklonierung pEGFP-C1
22	MetRSstopC1 rev	Gca gaa ttc gcc ctt gcg cga aat	pEGFP-C1 1367-1359	Vektorklonierung pEGFP-C1
23	MetRSstart N2 fwd	ccg ctcgag gccacc atg aga ctg ttc gtg ag	mMetRS bp: 158-176	Vektorklonierung pEGFP-N2
24	MetRSstopN2 rev	Cgg aat tcc ttt ttc ttc ttg cct tta gga gtt	mMetRS bp: 2887-2863	Vektorklonierung pEGFP-N2
25	FUGW MCS linker fwd	gat cgg cta gca tgg atc cta gat aac tga c	FUGW	Insertion NheI/BamHI Schnittstellen
26	FUGW MCS linker rev	gat cgt cag tta tct agg atc cat gct agc c	FUGW	Insertion NheI/BamHI Schnittstellen
27	MetRSstopC1-PA rev	gtc gaa ttc atc act ttt tct tct tgc c	mMetRS ORF bp: 2890-2873	Lentivektor-Klonierung

Tabelle 6.1 Primer für die Vektor-Klonierungen

6.3 Vektoren und cDNA-Expressionskonstrukte

Vektor	System	Firma
pEGFP-C1	Living Colors™ Fluorescent Proteins	Clontech
pEGFP-N1	Living Colors™ Fluorescent Proteins	Clontech
pEGFP-N2	Living Colors™ Fluorescent Proteins	Clontech
pCMV-VSV-G	Lentivirales Expressionskonstrukt	Addgene
pSPAX2	Lentivirales Expressionskonstrukt	Addgene

Tabelle 6.2: Expressionsvektoren

Nr.	Bezeichnung	Insert	Vektor	Restriktions-schnittstelle	Verwendung
1	EGFP-wtMetRS	wtMetRS bp: 1-2709 (ORF)	EGFP-C1	XhoI-EcoRI	Expression
2	EGFP-LtoGMetRS	wtMetRS bp: 1-2709 (ORF)	EGFP-C1	XhoI-EcoRI	Expression
3	EGFP-NLLMetRS	wtMetRS bp: 1-2709 (ORF)	EGFP-C1	XhoI-EcoRI	Expression
4	EGFP-PLLMetRS	wtMetRS bp: 1-2709 (ORF)	EGFP-C1	EcoRI-EcoRI	Expression
5	LtoGMetRS-EGFP	wtMetRS bp: 1-2709 (ORF)	EGFP-N2	EcoRI-EcoRI	Expression
6	RPL27EGFP	RPL27 bp: 1-414(ORF)	EGFP-N1	EcoRI-BamHI	Expression
7	Ferm-EGFP	Ferm bp: 1-885 (ORF)	EGFP-N2	EcoRI-XhoI	Expression

8	EGFP-Ferm	Ferm bp: 1-885 (ORF)	EGFP-C1	EcoRI-XhoI	Expression
9	Ezrin-EGFP	Ferm bp: 1-1761 (ORF)	EGFP-N2	EcoRI-XhoI	Expression
10	EGFP-Ezrin	Ferm bp: 1-1761(ORF)	EGFP-C1	EcoRI-XhoI	Expression
11	Ferm- EGFPLtoGMetRS	Ferm bp: 1-885(ORF)	EGFP-C1	BsrGI-XhoI	Expression
12	EGFP	EGFP	EGFP-C1		Expression

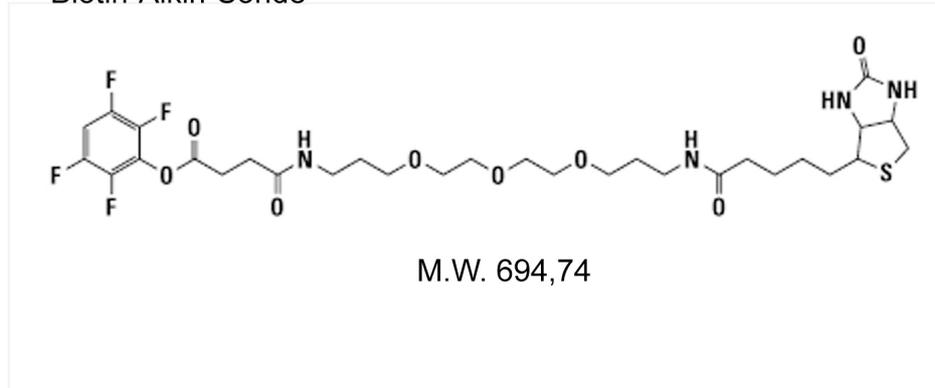
Tabelle 6.3: verwendete cDNA-Konstrukte

Nr.	Bezeichnung	Insert	Vektor	Restriktions- schnittstelle	Verwend- ung
1	LVpGfaABC1D- EGFP	EGFP bp: 1-720	LVpGfaABC1D- MCS	NheI-BamHI	Ex- pression
2	LVpGfaABCmC 1.1D-EGFP	EGFP bp: 1-720	LVpGfaABCmC1.1D -MCS	NheI-BamHI	Ex- pression
3	LVpGfa2(B)3- EGFP	EGFP bp: 1-720	LVpGfa2(B)3- MCS	NheI-BamHI	Ex- pression
4	LVpGfa2(ABD)3 -EGFP	EGFP bp: 1-720	LVpGfa2(ABD)3- MCS	NheI-BamHI	Ex- pression
5	LVpGfaABC1D- EGFP- LtoGMetRS	EGFP- LtoGMetRS bp: 1-720, 1-2709 bp	LVpGfaABC1D- MCS	NheI-BamHI	Ex- pression
6	LVpGfaABC1D- RPL27EGFP	RPL27EGFP bp:	LVpGfaABC1D- MCS	NheI-BsrGI	Ex- pression
7	LVpGfaABC1D- FermEGFP- LtoGMetRS	FermEGFP- LtoGMetRS bp:	LVpGfaABC1D- MCS	NheI-BamHI	Ex- pression
8	LVUbiP-EGFP- LtoGMetRS	EGFP- LtoGMetRS bp: 1-720, 1-2709 bp	FUGW-MCS	NheI-BamHI	Ex- pression

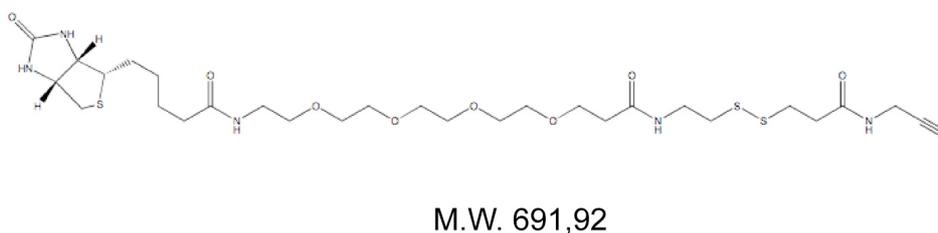
Tabelle 6.4: Verwendte Vektoren für den lentiviralen Gentransfer

6.4 Struktur der Alkin-Sonden

A Biotin-Alkin-Sonde



B DST-Biotin-Alkin-Sonde



6.5 Proteine/mRNA mit veränderter Expression nach BDNF-Stimulation

Literatur

- 1 Liao L *et al.*, J Proteome Res., 2007
Methode: *Rattus n.*, kortikale Kultur DIV15, BDNF Stimulation 30min, SNS prep, MudPIT
- 2 Manadas B *et al.*, J Proteome Res., 2009
Methode: *Rattus n.*, hippocampale Kultur, DIV7, BDNF für 12h, Radioisotopmarkierung, 2D-Gel, MS/MS
- 3 Schrott GM *et al.*, J Neurosci., 2004
Methode: *Rattus n.*, kortikale Kultur, DIV14, 20 min BDNF Stimul., Polysom fraction, mRNA Extraktion, Affymetrix

Nr.	Uniprot	Gen-name	Proteinname	Vergleich Astroprot	Literatur
1	SEPT2_RAT	sept2	specific protein 11	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
2	SEPT7_RAT	Sept7	Septin-7	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
3	ABCA5_RAT	Abca5	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 5	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
4	COA1_RAT	Acaca	Acetyl-CoA carboxylase 1	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
6	ACADL_RAT	Acadl	acyl-CoA dehydrogenase, long chain	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
8	ACDSB_RAT	Acadsb	acyl-CoA dehydrogenase, short/branched chain	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
10		Acat2	acetyl-CoA acetyltransferase 2	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
11	IREB1_RAT	Aco1	Iron-responsive element binding protein 1	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
12	ACON_RAT	Aco2	aconitase 2, mitochondrial	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
13		Acot2	acyl-CoA thioesterase 2	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
14	PPAC_RAT	Acp1	acid phosphatase 1, soluble	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
15	ACSL1_RAT	Acs1	Long-chain-fatty-acid--CoAligase	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
16	ACTB_RAT	Actb	actin, beta	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
17	ACTG_RAT	Actg1	actin, gamma 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009

					2009
18		Actr1a	ARP1 actin-related protein 1 homolog A, centractin alpha (yeast)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
19		Actr1b	ARP1 actin-related protein 1 homolog B, centractin (yeast)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
20	ARP2_RAT	Actr2	Actin-like protein 2	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
21	ARP2_RAT	Actr2	ARP2 actin-related protein 2 homolog (yeast)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
22	ACY1A_RAT ACY1B_RAT	Acy1	aminoacylase 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
23	ADK_RAT	Adk	adenosine kinase	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
24		Adprhl2	ADP-ribosylhydrolase like 2	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
25	ADRM1_RAT	Adrm1	adhesion regulating molecule 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
26		Adss	adenylosuccinate synthase	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
27	SAHH_RAT	Ahcy	adenosylhomocysteinase	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
28		Ahsa1	AHA1, activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 1 (yeast)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
29		Ak1	adenylate kinase 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
30	AK1A1_RAT	Akr1a1	aldo-keto reductase family 1, member A1 (aldehyde reductase)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
31		Akr1b1	aldo-keto reductase family 1, member B1 (aldose reductase)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
32	ARK72_RAT	Akr7a2	aldo-keto reductase family 7, member A2 (aflatoxin aldehyde reductase)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
33	CD166_RAT	Alcam	CD166 antigen precursor	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
34	ALDH2_RAT	Aldh2	aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
35	SSDH_RAT	Aldh5a1	Splice Isoform Short of Succinate semialdehydedehydrogenase	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
36	SSDH_RAT	Aldh5a1	aldehyde dehydrogenase 5 family, member A1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
37	AL7A1_RAT	Aldh7a1	aldehyde dehydrogenase 7 family, member A1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
38	AL9A1_RAT	Aldh9a1	aldehyde dehydrogenase 9 family, member A1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
39	ALDOA_RAT	Aldoa	aldolase A, fructose-bisphosphate	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
40	ALDOC_RAT	Aldoc	Aldoc protein	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
41	ALDOC_RAT	Aldoc	aldolase C, fructose-bisphosphate	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
42	ANXA5_RAT	Anxa5	annexin A5	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
43	APOE_RAT	ApoE	Apolipoprotein E precursor	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
44		Aprt	adenine phosphoribosyltransferase	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
45	COPD_RAT	Arcn1	archain 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
46	ARF1_RAT	Arf1	ADP-ribosylation factor 5	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
47	ARFP1_RAT	Arfp1	ADP-ribosylation factor interacting protein 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
48		Arhgdia	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
49		Arpc2	actin related protein 2/3 complex, subunit 2, 34kDa	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
50		Asna1	arsA arsenite transporter, ATP-binding, homolog 1 (bacterial)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
51	PUR9_RAT	Atic	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
52		Atp1b2	Na ⁺ /K ⁺ -ATPase beta 2 subunit	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
53	AT2B3_RAT	Atp2b3	Splice Isoforms of Plasma membrane calcium-transporting ATPase 3	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007

54	ATPA_RAT	Atp5a1	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit 1, cardiac muscle	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
55	ATPB_RAT	Atp5b	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
56	ATPD_RAT	Atp5d	ATP synthase delta chain, mitochondrial precursor	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
57		Atp5h	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit d	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
58		Atp5o	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, O subunit	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
59		Atp6v1a	ATPase, H+ transporting, lysosomal 70kDa, V1 subunit A	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
60	VATB2_RAT	Atp6v1b2	ATPase, H+ transporting, lysosomal 56/58kDa, V1 subunit B2	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
61	VATE1_RAT	Atp6v1e1	ATPase, H+ transporting, lysosomal 31kDa, V1 subunit E1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
62	ATIF1_RAT	ATPIF1	ATPase inhibitor protein	Ja	Schratt <i>et al.</i> , 2004
63	ODBA_RAT	Bckdha	branched chain keto acid dehydrogenase E1, alpha polypeptide	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
64	ODBB_RAT	Bckdhb	branched chain keto acid dehydrogenase E1, beta polypeptide	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
65	BIN1_RAT	Bin1	Myc box-dependent-interacting protein 1	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
66	BIEA_RAT	Blvra	biliverdin reductase A	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
67		Blvrb	biliverdin reductase B (flavin reductase (NADPH))	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
68	BPNT1_RAT	Bpnt1	3'(2'), 5'-bisphosphate nucleotidase 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
69	BR44L_RAT	Brp44l	Splice Isoforms of Brain protein 44	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
70	BASI_RAT	Bsg	Splice Isoform 1 of Basigin precursor	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
71		Bub3	budding uninhibited by benzimidazoles 3 homolog (yeast)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
72		Cab39	calcium binding protein 39	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
73	CYBP_RAT	Cacybp	calcyclin binding protein	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
74	CALR_RAT	Calr	calreticulin	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
75	KKCC2_RAT	Camkk2	Calcium- calmodulin-dependent protein kinase II	Ja	Schratt <i>et al.</i> , 2004
76	CAZA2_RAT	Capza2	Capping protein (aCtin filament) musCle Z-line, alpha 2 Fasciclin II transmembrane	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
77	CAZA2_RAT	Capza2	capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 2	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
78	CAPZB_RAT	Capzb	F-actin capping protein betasubunit	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
79	CAPZB_RAT	Capzb	capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
80	CASP3_RAT	Casp3	caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
81	CATA_RAT	Cat	catalase	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
82		CBX1	chromobox homolog 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
83	CCD51_RAT	Ccdc51	coiled-coil domain containing 51	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
84		Ccnl1	Ania-6	Ja	Schratt <i>et al.</i> , 2004
85	TCPB_RAT	Cct2	chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
86	TCPG_RAT	Cct3	chaperonin containing TCP1, subunit 3 (gamma)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
87	TCPD_RAT	Cct4	T-complex protein 1, delta subunit	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
88	TCPE_RAT	Cct5	chaperonin containing TCP1, subunit 5 (epsilon)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
89		Cct6a	chaperonin containing TCP1, subunit 6A (zeta 1)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
90	CDC42_RAT	CDC42	Cell division cycle 42	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007

91		Cdh13	T-cadherin	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
92		Cdk4	cyclin-dependent kinase 4	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
93	COF1_RAT	Cfl1	cofilin 1 (non-muscle)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
94		Chchd3	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 3	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
95	CHP1_RAT	Chp		Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
96	KCRB_RAT	Ckb	Creatine kinase B-type	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
97	KCRB_RAT	Ckb	creatine kinase, brain	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
98	CLAP2_RAT	Clasp2	CLIP-associating proteinCLASP2	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
99		Clip2	CLIP-115 protein	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
100	CNN3_RAT	Cnn3	calponin 3, acidic	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
101		Cnp	CNP	Ja	Schratt <i>et al.</i> , 2004
102	COMD3_RAT	Commd3	COMM domain containing 3	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
103		COPE	coatomer protein complex, subunit epsilon	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
104		Cops5	COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 5 (Arabidopsis)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
105	CSN8_RAT	Cops8	COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 8 (Arabidopsis)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
106	COR1A_RAT	Coro1a	coronin, actin binding protein, 1A	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
107		Crkl	v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
108		Crym	crystallin, mu	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
109	DBPA_RAT	Csda	cold shock domain protein A	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
110		Csde1	cold shock domain containing E1, RNA-binding	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
111	CTBP1_RAT	Ctbp1	C-terminal binding protein 1	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
112	CTBP1_RAT	Ctbp1	C-terminal binding protein 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
113		Ctnna1	Catenin (Cadherin-associated protein), alpha 1, 102kDa	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
114	CATB_RAT	Ctsb	cathepsin B	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
115	CATD_RAT	Ctsd	cathepsin D	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
116	CYB5_RAT	Cyb5	cytochrome b5 type A (microsomal)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
117	CYB5B_RAT	CYB5B	Cytochrome b5 outermitochondrial membrane isoform precursor	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
118	SYDC_RAT	Dars	aspartyl-tRNA synthetase	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
119		Dbi	Acyl-CoA-binding protein	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
120	DBNL_RAT	Dbnl	Drebrin-like protein	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
121	DBNL_RAT	Dbnl	drebrin-like	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
122	DCPS_RAT	Dcps	decapping enzyme, scavenger	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
123	DCTN2_RAT	Dctn2	dynactin 2 (p50)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
124		Ddah1	dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
125	DOPD_RAT	Ddt	D-dopachrome tautomerase	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
126		Ddx3x	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, X-linked	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
127	DLDH_RAT	Dld	dihydrolipoamide dehydrogenase	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009

128	ODO2_RAT	Dlst	Dihydrolipoyllysine-residuesuccinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial precursor	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
129	DYN2_RAT	Dnm2	Splice Isoform II of Dynamin-2	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
130	DPP3_RAT	Dpp3	dipeptidyl-peptidase 3	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
131	DPYL2_RAT	Dpysl2	dihydropyrimidinase-like 2	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
132	DPYL3_RAT	Dpysl3	dihydropyrimidinase-like 3	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
133	DPYL4_RAT	Dpysl4	dihydropyrimidinase-like 4	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
134	DPYL5_RAT	Dpysl5	dihydropyrimidinase-like 5	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
135	DYHC_RAT	Dync1h1	dynein, cytoplasmic 1, heavy chain 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
136		Dync1i2	dynein, cytoplasmic 1, intermediate chain 2	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
137		Dync1li2	Dynein light intermediate chain 2, cytosolic	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
138	ECHD1_RAT	Echdc1	enoyl CoA hydratase domain containing 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
139	ECHM_RAT	Echs1	enoyl CoA hydratase, short chain, 1, mitochondrial	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
140		Eef1a1	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
141		Eef1d	Translation elongation factor 1delta subunit	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
142		Eef1d	eukaryotic translation elongation factor 1 delta (guanine nucleotide exchange protein)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
143	EF1G_RAT	Eef1g	eukaryotic translation elongation factor 1 gamma	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
144	EF2_RAT	Eef2	Elongation factor 2	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
145	EF2_RAT	Eef2	eukaryotic translation elongation factor 2	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
146	EFHD2_RAT	Efhd2	EF-hand domain family, member D2	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
147		Ehd1	EH-domain containing 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
148	RL9_RAT	Ehd2	EH-domain containing protein 2	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
149	EI2BB_RAT	Eif2b2	eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 2 beta, 39kDa	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
150	IF2A_RAT	Eif2s1	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 1 alpha, 35kDa	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
151		Eif4a1	eukaryotic translation initiation factor 4A1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
152	IF4A2_RAT	Eif4a2	eukaryotic translation initiation factor 4A2	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
153		Eif4b	Eukaryotic translation initiation factor 4B	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
154	IF5A1_RAT	Eif5a	eukaryotic translation initiation factor 5A	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
155	ENOA_RAT	Eno1	enolase 1, (alpha)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
156	ENOG_RAT	Eno2	enolase 2 (gamma, neuronal)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
157	ENOB_RAT	Eno3	Beta enolase	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
158	ERP29_RAT	Erp29	endoplasmic reticulum protein 29	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
159	ETFA_RAT	Etfa	Alpha-ETF	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
160	ETFA_RAT	Etfa	Electron transfer flavoprotein alpha-subunit, mitochondrial precursor	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
161	ETFA_RAT	Etfa	electron-transfer-flavoprotein, alpha polypeptide	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
162		Ezr	Ezrin	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
163		Fabp5	Fatty acid-binding protein, epidermal	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
164		Fabp5	fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
165		Fabp7	Fatty acid-binding protein, brain	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
166		Fam49b	family with sequence similarity 49, member B	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009

					2009
167	FKB1A_RAT	Fkbp1a	FK506 binding protein 1A, 12kDa	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
168		Fscn1	fascin homolog 1, actin-bundling protein (Strongylocentrotus purpuratus)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
169	FRIL1_RAT	Ftl1	ferritin light chain 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
170	FYN_RAT	Fyn	Proto-oncogene FYN	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
171		G3bp2	GTPase activating protein (SH3 domain) binding protein 2	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
172	G6PD_RAT	G6pdx		Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
173		Galk1	galactokinase 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
174	GAMT_RAT	Gamt	guanidinoacetate N-methyltransferase	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
175	G3P_RAT	Gapdh	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
176		Gars	glycyl-tRNA synthetase	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
177		Gdi1	GDP dissociation inhibitor 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
178	GDIB_RAT	Gdi2	GDP dissociation inhibitor 2	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
179	GFAP_RAT	Gfap	glial fibrillary acidic protein	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
180	GIPC1_RAT	Gipc1	GIPC PDZ domain containing family, member 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
181	LGUL_RAT	Glo1	Glyoxylase 1	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
182	LGUL_RAT	Glo1	glyoxalase I	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
183		Glrx	Glutaredoxin-1	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
184		Gls	Kidney-type glutaminase GAC isoform	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
185		Gls	glutaminase	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
186	DHE3_RAT	Glud1	glutamate dehydrogenase 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
187		Glul	Glutamine synthetase	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
188	GMFB_RAT	Gmfb	glia maturation factor, beta	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
189		Gmps	guanine monphosphate synthetase	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
190	GNAI1_RAT	Gnai3	Guanine nucleotide-bindingprotein G(k), alpha subunit	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
191		Gnao1	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha activating activity polypeptide O	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
192	GBB1_RAT	Gnb1	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
193	GORS2_RAT	Gorasp2	golgi reassembly stacking protein 2, 55kDa	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
194	AATM_RAT	Got2	Aspartate aminotransferase, mitochondrial precursor	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
195		Gpd2	Glycerol-3-phosphatedehydrogenase, mitochondrial precursor	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
196		Gpd2	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 (mitochondrial)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
197	GEPH_RAT	Gphn	Splice Isoform 1-6 of Gephyrin	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
198		Gpm6a	Glycoprotein m6a	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
199	GRB2_RAT	Grb2	growth factor receptor-bound protein 2	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
200	GRB2_RAT	GRB2	growth factor receptor-bound protein 2	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
201	NMD3A_RAT	GRIN3A	NMDA receptor-like long variant (NR3)	Ja	Schratt <i>et al.</i> , 2004
202	GRPE1_RAT	Grpel1	GrpE-like 1, mitochondrial (E. coli)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
203	GSTA4_RAT	Gsta4	glutathione S-transferase alpha 4	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
204	GSTM1_RAT	Gstm1	glutathione S-transferase mu 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009

205		Gstm5	glutathione S-transferase mu 5	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
206		Gstp1	glutathione S-transferase pi 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
207	HDGF_RAT	Hdgf	hepatoma-derived growth factor	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
208	3HIDH_RAT	Hibadh	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial precursor	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
209	HINT1_RAT	Hint1	histidine triad nucleotide binding protein 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
210	H2B1_RAT	Hist1h2bh	Histone H2B	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
211	H4_RAT	Hist1h4b	histone cluster 1, H4c	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
212		Hist3h2a	Histone H2a	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
213		Hk1	hexokinase 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
214		Hmgb1	high-mobility group box 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
215	HMCS1_RAT	Hmgcs1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 1 (soluble)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
216		Hnrmpa1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
217		Hnrmpd	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
218		HnrmpH1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
219		Hnrmpk	Hnrpk protein	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
220	HNRPK_RAT	Hnrpk	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
221		Hprt1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
222		Hsp90aa1	Heat shock protein 86	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
223		Hsp90ab1	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
224		Hsp90b1	heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
225	HSP74_RAT	Hspa4	heat shock 70kDa protein 4	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
226	GRP78_RAT	Hspa5	heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
227		Hspa8	heat shock 70kDa protein 8	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
228		Hspa9	heat shock 70kDa protein 9 (mortalin)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
229	CH60_RAT	HSPD1	heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
230	CH60_RAT	Hspd1	heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
231		Hsph1	heat shock 105kDa/110kDa protein 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
232	HYOU1_RAT	Hyou1	hypoxia up-regulated 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
233	IDHC_RAT	ldh1	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
234	IDH3A_RAT	ldh3a	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
235	IDI1_RAT	Idi1	isopentenyl-diphosphate delta isomerase 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
236	ILKAP_RAT	Ilkap	integrin-linked serine/threonine phosphatase kinase-associated	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
237		Immt	inner membrane protein, mitochondrial	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
238	IMPA1_RAT	Impa1	inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
239		Inpp1	inositol polyphosphate-1-phosphatase	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
240		ltpa	inosine triphosphatase (nucleoside triphosphate pyrophosphatase)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
241	ITSN1_RAT	ltsn1	Splice Isoforms of Intersectin 1	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
242	IVD_RAT	lvd	isovaleryl-CoA dehydrogenase	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
243	PLAK_RAT	Jup	Plakoglobin	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007

244		Kctd12	potassium channel tetramerisation domain containing 12	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
245		Khsrp	KH-type splicing regulatory protein	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
246		Kif5c	Kinesin heavy chain isoform 5C	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
247	KLF9_RAT	Klf9	Kruppel-like factor 9	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
248		Lactb2	lactamase, beta 2	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
249		Lancl2	LanC lantibiotic synthetase component Clike 2	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
250	AMPL_RAT	Lap3	leucine aminopeptidase 3	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
251		Lasp1	LIM and SH3 domain protein 1	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
252		Lasp1	LIM and SH3 protein 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
253	LDHA_RAT	Ldha	lactate dehydrogenase A	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
254	LDHB_RAT	Ldhb	lactate dehydrogenase B	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
255	LDLR_RAT	LDLR	LDL-receptor	Ja	Schratt <i>et al.</i> , 2004
256		LGALS3BP	Cyclophilin c	Ja	Schratt <i>et al.</i> , 2004
257	LIN7C_RAT	Lin7c	LIN-7 homolog C	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
258	LMNB1_RAT	Lmnb1	lamin B1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
259	AMRP_RAT	Lrpap1	low density lipoprotein receptor-related protein associated protein 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
260		Lrpprc	leucine-rich PPR-motif containing	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
261	LKHA4_RAT	Lta4h	leukotriene A4 hydrolase	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
262	LXN_RAT	Lxn	latexin	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
263		Map1a	Microtubule associated protein 1A	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
264		Map2k6	mitogen-activated protein kinase kinase 6	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
265	MK01_RAT	Mapk1	mitogen-activated protein kinase 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
266	MK03_RAT	Mapk3	mitogen-activated protein kinase 3	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
267	MARE1_RAT	Mapre1	microtubule-associated protein, RP/EB family, member 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
268		Mapre3	Microtubule-associated protein RP/EB family member 3	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
269		Mapre3	microtubule-associated protein, RP/EB family, member 3	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
270	METK2_RAT	Mat2a	methionine adenosyltransferase II, alpha	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
271	MATR3_RAT	Matr3	matrin 3	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
272		Mccc1	methylcrotonoyl-CoA carboxylase 1 (alpha)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
273	MDHC_RAT	Mdh1	malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
274	MDHM_RAT	Mdh2	Malate dehydrogenase, mitochondrial	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
275	MDHM_RAT	Mdh2	Malate dehydrogenase, mitochondrial precursor	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
276	MDHM_RAT	Mdh2	malate dehydrogenase 2, NAD (mitochondrial)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
277	MAOX_RAT	Me1	malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
278		Me2	malic enzyme 2, NAD(+)-dependent, mitochondrial	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
279	NCOAT_RAT	Mgea5	O-GlcNAcase	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
280		Milt4	Splice Isoforms of Afadin	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
281	THTM_RAT	Mpst	mercaptopyruvate sulfurtransferase	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
282		Mrps22	mitochondrial ribosomal protein S22	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
283	MOES_RAT	Msn	Moesin	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
284	MSRA_RAT	Msra	methionine sulfoxide reductase A	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009

285		Mtap	methylthioadenosine phosphorylase	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
286	MTPN_RAT	Mtpn	Myotrophin	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
287	ERG19_RAT	Mvd	mevalonate (diphospho) decarboxylase	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
288		Mvk	Mevalonate kinase	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
289	NP1L4_RAT	Nap1l4	Nucleosome assembly protein 1-like 4	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
290	SNAA_RAT	Napa	N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein, alpha	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
291		Nars	LRRGT00113	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
292		Ncald	neurocalcin delta	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
293	NCAM1_RAT	Ncam1	Neural cell adhesion molecule 1, 140 kDa isoform precursor	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
294		Ncam2		Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
295	NDRG1_RAT	Ndr1	N-myc downstream regulated 1	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
296	NDRG1_RAT	Ndr1	N-myc downstream regulated 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
297		Ndr3	NDRG family member 3	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
298	NDUAA_RAT	Ndufa10	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 10, 42kDa	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
299		Ndufa13	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 13	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
300	NDUS1_RAT	Ndufs1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1, (NADH-coenzyme Q reductase) 75kDa	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
301		Ndufs3	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 3, (NADH-coenzyme Q reductase) 30kDa	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
302	NDUV2_RAT	Ndufv2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2, 24kDa	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
303		Nit2	nitrilase family, member 2	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
304	NDKA_RAT	Nme1	non-metastatic cells 1, protein (NM23A) expressed in	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
305	NDKB_RAT	Nme2	non-metastatic cells 2, protein (NM23B) expressed in	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
306		Nnt	Nicotinamide nucleotide transhydrogenase	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
307	NOS3_RAT	NOS3	eNOS	Ja	Schratt <i>et al.</i> , 2004
308	NPM_RAT	Npm1	nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
309		Nras	Transforming protein N-Ras	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
310	NSF_RAT	Nsf	N-ethylmaleimide-sensitive factor	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
311	NSF1C_RAT	Nsf1c	NSFL1 (p97) cofactor (p47)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
312		Nt5c3l	5'-nucleotidase, cytosolic III-like	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
313	NUCB1_RAT	Nucb1	nucleobindin 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
314	NUDC_RAT	Nudc	nuclear distribution gene C homolog (A. nidulans)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
315	8ODP_RAT	NUDT1	8-oxo-dGTPase	Ja	Schratt <i>et al.</i> , 2004
316		Nudt16	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 16	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
317		Nup50	nucleoporin 50kDa	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
318	OAT_RAT	Oat	ornithine aminotransferase	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
319		Ogdh	oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase (lipoamide)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
320		Otub1	OTU domain, ubiquitin aldehyde binding 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
321		Oxct1	3-oxoacid CoA transferase 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009

322	PDIA1_RAT	P4hb	prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
323		Pa2g4	Proliferation-associated 2G4	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
324		Pa2g4	proliferation-associated 2G4, 38kDa	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
325		Pafah1b3	platelet-activating factor acetylhydrolase 1b, catalytic subunit (29kDa)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
326		Pank3	pantothenate kinase 3	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
327		Papss1	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
328	PARK7_RAT	Park7	DJ-1 protein	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
329	PARK7_RAT	Park7	Parkinson disease (autosomal recessive, early onset) 7	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
330	PYC_RAT	Pc	Pyruvate carboxylase, mitochondrial precursor	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
331	PYC_RAT	Pc	pyruvate carboxylase	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
332		Pcbp1	poly(rC) binding protein 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
333		Pcbp2	Pcbp2_predicted protein	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
334		Pcbp2	poly(rC) binding protein 2	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
335	PCCA_RAT	Pcca	propionyl CoA carboxylase, alpha polypeptide	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
336	PCCB_RAT	Pccb	propionyl CoA carboxylase, beta polypeptide	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
337	PCY2_RAT	Pcyt2	phosphate cytidylyltransferase 2, ethanolamine	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
338	HAP28_RAT	Pdap1	PDGFA associated protein 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
339		Pdcd6	programmed cell death 6	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
340	ODPA_RAT	Pdha1	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
341	ODPB_RAT	Pdhb	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
342	PDIA3_RAT	Pdia3	protein disulfide isomerase family A, member 3	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
343		Pdia6	protein disulfide isomerase family A, member 6	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
344	PDXK_RAT	Pdxk	pyridoxal (pyridoxine, vitamin B6) kinase	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
345	PEBP1_RAT	Pebp1	phosphatidylethanolamine binding protein 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
346	K6PL_RAT	Pfkl	6-phosphofructokinase, liver type	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
347	PROF2_RAT	Pfn2	profilin 2	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
348		Pgam1	Phosphoglycerate mutase 1,2	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
349		Pgam1	phosphoglycerate mutase 1 (brain)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
350		Pgd	Cc2-27	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
351	PGK1_RAT	Pgk1	phosphoglycerate kinase 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
352		Pgls	6-phosphogluconolactonase	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
353	PGM1_RAT	Pgm1	Phosphoglucomutase 1	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
354	PGM1_RAT	Pgm1	phosphoglucomutase 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
355		Phb	Prohibitin	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
356		Phb	prohibitin	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
357	SERA_RAT	Phgdh	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
358	SERA_RAT	Phgdh	phosphoglycerate dehydrogenase	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
359		Phpt1	phosphohistidine phosphatase 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
360		Phyhipl	phytanoyl-CoA 2-hydroxylase interacting protein-like	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
361	PIGS_RAT	Pigs	GPI transamidase component PIG-S	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007

362	PIPNA_RAT	Pitpna	Phosphatidylinositol transferprotein alpha isoform	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
363	PIPNA_RAT	Pitpna	phosphatidylinositol transfer protein, alpha	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
364	PIPNB_RAT	Pitpnb	phosphatidylinositol transfer protein, beta	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
365	KPYM_RAT	Pkm2	Pkm2 protein	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
366	KPYM_RAT	Pkm2	pyruvate kinase, muscle	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
367		Ppa1	pyrophosphatase (inorganic) 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
368		PPARD	PPAR gamma	Ja	Schratt <i>et al.</i> , 2004
369		Ppia	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
370	PPID_RAT	Ppid	peptidylprolyl isomerase D	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
371	PPM1A_RAT	Ppm1a	protein phosphatase, Mg2+/Mn2+ dependent, 1A	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
372	PP1A_RAT	Ppp1ca	Serine/threonine proteinphosphatase PP1-alpha catalytic subunit	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
373	PP1A_RAT	Ppp1ca	protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isozyyme	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
374	PP1B_RAT	Ppp1cb	protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isozyyme	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
375	PP1R7_RAT	Ppp1r7	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 7	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
376	PP2AA_RAT	Ppp2ca	Serine/threonine proteinphosphatase 2A, catalytic subunit, alpha isoform	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
377	PP2AA_RAT	Ppp2ca	protein phosphatase 2, catalytic subunit, alpha isozyyme	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
378	PP2AB_RAT	Ppp2cb	Serine/threonine proteinphosphatase 2A, catalytic subunit, beta isoform	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
379	PP2AB_RAT	Ppp2cb	protein phosphatase 2, catalytic subunit, beta isozyyme	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
380		Ppp2r1a	protein phosphatase 2, regulatory subunit A, alpha	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
381	2ABA_RAT	Ppp2r2a	protein phosphatase 2, regulatory subunit B, alpha	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
382		Ppp2r4	protein phosphatase 2A activator, regulatory subunit 4	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
383	CANB1_RAT	Ppp3r1	Splice Isoform 2 of CalcineurinB subunit isoform 1	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
384	PRDX1_RAT	Prdx1	peroxiredoxin 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
385		Prdx2	peroxiredoxin 2	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
386	PRDX3_RAT	Prdx3	peroxiredoxin 3	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
387		Prdx4	peroxiredoxin 4	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
388	PRDX5_RAT	Prdx5	Peroxioredoxin 5, mitochondrial precursor	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
389	PRDX5_RAT	Prdx5	peroxiredoxin 5	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
390	PRDX6_RAT	Prdx6	peroxiredoxin 6	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
391		Prep	RPOP	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
392		Prkar1a	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha (tissue specific extinguisher 1)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
393		Prmt1	protein arginine methyltransferase 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
394		Prpf19	PRP19/PSO4 pre-mRNA processing factor 19 homolog (S. cerevisiae)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
395	PRPS1_RAT	Prps1	Ribose-phosphatepyrophosphokinase I	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
396	PRPS1_RAT	Prps1	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
397	PRPS2_RAT	Prps2	Ribose-phosphatepyrophosphokinase II	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007

398	PRPS2_RAT	Prps2	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 2	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
399	KPRA_RAT	Prpsap1	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase-associated protein 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
400	KPRB_RAT	Prpsap2	Phosphoribosyl pyrophosphatesynthetase-associated protein 2	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
401	KPRB_RAT	Prpsap2	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase-associated protein 2	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
402		Psat1	Phosphoserineaminotransferase	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
403	PSA1_RAT	Psma1	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
404		Psma2	Proteasome subunit alpha type 2	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
405		Psma2	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 2	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
406		Psma3	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 3	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
407	PSA5_RAT	Psma5	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 5	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
408	PSA6_RAT	Psma6	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 6	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
409	PSA7_RAT	Psma7	Splice Isoform RC6-IL ofProteasome subunit alpha type	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
410	PSB2_RAT	Psemb2	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 2	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
411	PSB3_RAT	Psemb3	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 3	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
412	PSB6_RAT	Psemb6	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 6	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
413	PSB7_RAT	Psemb7	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 7	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
414	PRS7_RAT	Psmc2	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 2	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
415	PRS6A_RAT	Psmc3	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 3	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
416	PRS6B_RAT	Psmc4	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 4	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
417	PRS8_RAT	Psmc5	26S protease regulatory subunit8	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
418	PRS8_RAT	Psmc5	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 5	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
419		Psmc6	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 6	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
420	PSMD1_RAT	Psmc1	26S proteasome non-ATPaseregulatory subunit 1	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
421		Psmc11	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 11	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
422		Psmc14	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 14	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
423		Psmc7	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 7	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
424		Psmc8	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 8	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
425	PSMD9_RAT	Psmc9	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 9	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
426	PSME1_RAT	Psmc1	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 1 (PA28 alpha)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
427		Psmc3	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 3 (PA28 gamma; Ki)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
428		Pspc1	paraspeckle component 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
429	SERB_RAT	Pspc1	phosphoserine phosphatase	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
430	PTN11_RAT	PTPN11	Tyrosine-protein phosphatase, non-receptor type 11	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
431		Ptpnf	LAR receptor-linked tyrosine phosphatase	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
432		PTRH2	Bcl-2 inhibitor of transcription	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007

433	PYGB_RAT	Pygb	phosphorylase, glycogen; brain	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
434	RAB18_RAT	Rab18	RAB18, member RAS oncogene family	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
435	RAB35_RAT	Rab35	Ras-related protein Rab-35	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
436		Rab3b	Rab3b protein	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
437	RAB4B_RAT	Rab4b	RAB4B, member RAS oncogene family	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
438	RAB7A_RAT	Rab7	Ras-related protein Rab-7	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
439	RD23B_RAT	Rad23b	RAD23 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
440	RAN_RAT	Ran	GTP-binding nuclear protein Ran	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
441		Ranbp1	RAN binding protein 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
442		Ranbp1	RAN binding protein 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
443		Rbbp4	retinoblastoma binding protein 4	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
444		Rdx	Radixin	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
445	RHOB_RAT	Rhob	Rho-related GTP-binding protein RhoB	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
446	RL13_RAT	Rpl13	60S ribosomal protein L13	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
447	RL14_RAT	Rpl14	60S ribosomal protein L14	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
448	RL19_RAT	Rpl19	60S ribosomal protein L19	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
449	RL21_RAT	Rpl21	60S ribosomal protein L21	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
450	RL23A_RAT	Rpl23a	60S ribosomal protein L23a	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
451	RL24_RAT	Rpl24	60S ribosomal protein L24	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
452		Rpl6	60S ribosomal protein L6	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
453		Rpl7a	60S ribosomal protein L7a	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
454		Rplp0	ribosomal protein, large, P0	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
455	RS10_RAT	Rps10	ribosomal protein S10	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
456	RS17_RAT	Rps17	40S ribosomal protein S17	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
457		Rps2	40S ribosomal protein S2	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
458	RS24_RAT	Rps24	Ribosomal protein S24	Ja	Schratt <i>et al.</i> , 2004
459	RS27A_RAT UBIQ_RAT	Rps27a	ribosomal protein S27a	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
460	RS3_RAT	Rps3	ribosomal protein S3	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
461	RS4X_RAT	Rps4x	ribosomal protein S4, X-linked	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
462	RS7_RAT	Rps7	40S ribosomal protein S7	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
463	RS7_RAT	Rps7	ribosomal protein S7	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
464	RSSA_RAT	Rpsa	ribosomal protein SA	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
465		RSAD2	BEST5	Ja	Schratt <i>et al.</i> , 2004
466		Rtn1	Splice Isoform RTN1-S of Reticulon 1	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
467	RTN4_RAT	Rtn4	Splice Isoform 2,4 of Reticulon 4	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
468	RUVB1_RAT	Ruvbl1	RuvB-like 1 (<i>E. coli</i>)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
469	SCAM1_RAT	Scamp1	Secretory carrier-associated membrane protein 1	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
470	SCRIB2_RAT	Scarb2	Lysosome membrane protein II	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
471	SCRN1_RAT	Scrn1	secernin 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
472	DHSA_RAT	Sdha	succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
473		Sec31a	Sec3111 protein	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
474	SGTA_RAT	Sgta	small glutamine-rich tetratricopeptide repeat (TPR)-containing, alpha	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
475		Shmt2	serine hydroxymethyltransferase 2 (mitochondrial)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
476	EAA2_RAT	Slc1a2	Glutamate transporter GLT1b	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
477	TXTP_RAT	Slc25a1	Tricarboxylate transport protein, mitochondrial precursor	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007

478	M2OM_RAT	Slc25a11	Mitochondrial-2 oxoglutarate/malate carrier protein	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
479		Snd1	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
480		Snx27	PDZ protein Mrt1a,b	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
481		Snx6	sorting nexin 6	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
482		Sod1	superoxide dismutase 1, soluble	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
483		Srm	Spermidine synthase	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
484		Srm	spermidine synthase	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
485	F10A1_RAT	St13	suppression of tumorigenicity 13 (colon carcinoma) (Hsp70 interacting protein)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
486	STABP_RAT	Stampb	STAM binding protein	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
487	STIP1_RAT	Stip1	stress-induced-phosphoprotein 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
488	STMN1_RAT	Stmn1	stathmin 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
489	STML2_RAT	Stoml2	stomatin (EPB72)-like 2	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
490	STRAP_RAT	Strap	serine/threonine kinase receptor associated protein	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
491		Stx12	Syntaxin 12	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
492		Suclg2	succinate-CoA ligase, GDP-forming, beta subunit	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
493		Sugt1	SGT1, suppressor of G2 allele of SKP1 (<i>S. cerevisiae</i>)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
494	HNRPQ_RAT	Syncrip	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
495	HNRPQ_RAT	Syncrip	synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
496	TALDO_RAT	Taldo1	transaldolase 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
497		Tardbp	TAR DNA binding protein	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
498	TCPA_RAT	Tcp1	T-complex protein 1, alpha subunit	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
499	MEPD_RAT	Thop1	thimet oligopeptidase 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
500		Timm50	translocase of inner mitochondrial membrane 50 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
501	TMOD2_RAT	Tmod2	Tropomodulin-2 Vascular endothelial cell	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
502	TMOD2_RAT	Tmod2	tropomodulin 2 (neuronal)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
503		Tmx2	Thioredoxin-related transmembrane protein 2	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
504		Tollip	toll interacting protein	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
505	TPIS_RAT	Tpi1	triosephosphate isomerase 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
506	TPM1_RAT	Tpm1	Tropomyosin-1	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
507		Tpm2	Splice Isoform 1,2 of Tropomyosin beta chain	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
508	TPM3_RAT	Tpm3	tropomyosin 3	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
509	TPM4_RAT	Tpm4	tropomyosin 4	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
510		Tpmt	thiopurine S-methyltransferase	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
511	TCTP_RAT	Tpt1	tumor protein, translationally-controlled 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
512	TRAP1_RAT	Trap1	TNF receptor-associated protein 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
513		Trappc4	trafficking protein particle complex 4	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
514		Tsnax	translin-associated factor X	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
515	TBB5_RAT	Tubb5		Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
516	TBG1_RAT	Tubg1	tubulin, gamma 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009

					2009
517		Tufm	Tu translation elongation factor, mitochondrial	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
518	TXD12_RAT	Txndc12	thioredoxin domain containing 12 (endoplasmic reticulum)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
519	TXNL1_RAT	Txn1	thioredoxin-like 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
520	TRXR1_RAT	Txnrd1	thioredoxin reductase 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
521	UBIQ_RAT	Ubb	Polyubiquitin	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
522	UBE2N_RAT	Ube2n	ubiquitin-conjugating enzyme E2N (UBC13 homolog, yeast)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
523	UB2V2_RAT	Ube2v2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2 IPI00391519 22 kDa protein	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
524	UCHL1_RAT	Uchl1	ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (ubiquitin thioesterase)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
525		Uchl3	ubiquitin carboxyl-terminal esterase L3 (ubiquitin thioesterase)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
526		Ufd1l	ubiquitin fusion degradation 1 like (yeast)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
527		Ugp2	pyrophosphorylase 2	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
528	UQCR1_RAT	Uqcrc1	ubiquinol-cytochrome c reductase core protein I	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
529	DCUP_RAT	Urod	uroporphyrinogen decarboxylase	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
530		Usp14	ubiquitin specific peptidase 14 (tRNA-guanine transglycosylase)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
531		Usp5	ubiquitin specific peptidase 5 (isopeptidase T)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
532	TERA_RAT	Vcp	valosin containing protein	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
533	VDAC1_RAT	Vdac1	voltage-dependent anion channel 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
534	VDAC2_RAT	Vdac2	voltage-dependent anion channel 2	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
535	VIME_RAT	VIM	vimentin	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
536		Vps29	vacuolar protein sorting 29 homolog (S. cerevisiae)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
537		Vps4b	vacuolar protein sorting 4 homolog B (S. cerevisiae)	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
538	SYWC_RAT	Wars	tryptophanyl-tRNA synthetase	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
539	WDR1_RAT	Wdr1	WD repeat domain 1	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
540	WDR61_RAT	Wdr61	WD repeat domain 61	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
541	SYYC_RAT	Yars	tyrosyl-tRNA synthetase	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
542	1433B_RAT	Ywhab	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta polypeptide	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
543	1433E_RAT	Ywhae	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
544	1433G_RAT	Ywhag	14-3-3 protein gamma	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
545	1433G_RAT	Ywhag	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, gamma polypeptide	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
546	1433F_RAT	Ywhah	14-3-3 protein eta	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
547	1433F_RAT	Ywhah	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptide	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009
548	1433T_RAT	Ywhaq	14-3-3 protein theta	Ja	Liao <i>et al.</i> , 2007
549	1433T_RAT	Ywhaq	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide	Ja	Manadas <i>et al.</i> , 2009

Tabelle 6.6: Proteine/mRNA mit veränderter Expression nach BDNF-Stimulation

Die Tabelle listet die Gene deren Proteine oder mRNA nach BDNF-Stimulation als reguliert in den oben aufgeführten Publikationen vorgefunden wurden und ebenfalls in der Astroprot Datenbank enthalten sind. Beispielhaft finden sich Gene, die für gläre Proteine kodieren, wie Glutamin Synthetase oder EAAT1 bzw. EAAT2.

6.6 Massenspektrometrie Ergebnis GINCAT

Nr	Uniprot	Genname	Proteinname	Lokalisation	Funktion	MW [kDa]	ANL >25	score	Astroprot
1	ACTB_RAT	Actb	Actin, cytoplasmic 1	Cytoplasm	Cytoskeleton/ - associated	41.7	ANL	> 30	WAHR
2	EI2BB_RAT	Eif2b2	Translation initiation factor eIF-2B subunit beta	Cytoplasm	translation regulator	38.9	ANL	> 30	WAHR
3	GABT_RAT	Abat	4-aminobutyrate aminotransferase, mitochondrial	Cytoplasm	enzyme	56.4	ANL	> 30	WAHR
4	GTF2I_RAT	Gtf2i	General transcription factor II-I	Nucleus	transcription regulator	110.1	ANL		WAHR
5	HNRPM_RAT	Hnrpm	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	Nucleus	transcription regulator	73.7	ANL	> 30	WAHR
6	MYH10_RAT	Myh10	Myosin-10	Cytoplasm	Cytoskeleton/ - associated	228.8	ANL		WAHR
7	MYO5A_RAT	Myo5a	Myosin-Va	Cytoplasm	Cytoskeleton/ - associated	211.6	ANL	> 30	WAHR
8	NCOAT_RAT	Mgea5	Bifunctional protein NCOAT	Cytoplasm	enzyme	102.9	ANL		WAHR
9	NONO_RAT	Nono	Non-POU domain-containing octamer-binding protein	Nucleus	transcription regulator	54.9	ANL	> 30	WAHR
10	PHAR3_RAT	Phactr3	Phosphatase and actin regulator 3	Nucleus	regulatory protein	58.4	ANL		WAHR
11	PSPC1_RAT	Pspc1	Paraspeckle component 1	Nucleus	transcription regulator	58.7	ANL	> 30	WAHR
12	SPTA2_RAT	Sptan1	Spectrin alpha chain, brain	Plasma Membrane	Cytoskeleton/ - associated	284.5	ANL		WAHR
13	SRP54_RAT	Srp54	Signal recognition particle 54 kDa protein	Cytoplasm	regulatory protein	55.7	ANL	> 30	WAHR
14	TM111_RAT	Tmem111	Transmembrane protein 111	unknown	other	30.0	ANL	> 30	WAHR
15	UBF1_RAT	Ubf1	Nucleolar transcription factor 1	Nucleus	transcription regulator	89.4	ANL	> 30	WAHR
16	VINC_RAT	Vcl	Vinculin	Plasma Membrane	enzyme	116.5	ANL		WAHR
17	ADCYA_RAT	Adcy10	Adenylate cyclase type 10	Cytoplasm	enzyme	185.7	ANL		FALSCH
18	CBP_RAT	Crebbp	CREB-binding protein	Nucleus	transcription regulator	265.3	ANL		FALSCH
19	DDX4_RAT	Ddx4	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX4	Nucleus	enzyme	77.9	ANL	> 30	FALSCH
20	DYH1_RAT	Dnah1	Dynein heavy chain 1, axonemal	Cytoplasm	Cytoskeleton/ - associated	514.7	ANL		FALSCH
21	EPHA7_RAT	Epha7	Ephrin type-A receptor 7	Plasma Membrane	transmembrane receptor	111.9	ANL	> 30	FALSCH
22	FRITZ_RAT	Wdpcp	WD repeat-containing and planar cell polarity effector protein fritz homolog	Plasma Membrane	Cytoskeleton/ - associated	81.9	ANL	> 30	FALSCH
23	GSTA6_RAT	Gsta6	Glutathione S-transferase A6	Cytoplasm	enzyme	25.8	ANL	> 30	FALSCH
24	IGS10_RAT	Igsf10	Immunoglobulin superfamily member 10	unknown	other	284.6	ANL	> 30	FALSCH
25	KCMA1_RAT	Kcnma1	Calcium-activated potassium channel subunit alpha-1	Plasma Membrane	ion channel	134.3	ANL	> 30	FALSCH
26	KIF2A_RAT	Kif2a	Kinesin-like protein KIF2A	Cytoplasm	Cytoskeleton/ - associated	79.7	ANL	> 30	FALSCH
27	MEP1A_RAT	Mep1a	Meprin A subunit alpha	Plasma Membrane	peptidase	85.1	ANL	> 30	FALSCH
28	NOS2_RAT	Nos2	Nitric oxide synthase, inducible	Cytoplasm	enzyme	130.5	ANL	> 30	FALSCH
29	PERT_RAT	Tpo	Thyroid peroxidase	Plasma Membrane	enzyme	101.4	ANL	> 30	FALSCH

30	PRIC1_RAT	Prickle1	Prickle-like protein 1	Nucleus	regulatory protein	94.1	ANL		FALSCH
31	RFIP1_RAT	Rab11fip1	Rab11 family-interacting protein 1	Cytoplasm	regulatory protein	71.1	ANL		FALSCH
32	S26A4_RAT	Slc26a4	Pendrin	Plasma Membrane	transporter	85.7	ANL		FALSCH
33	SCNBA_RAT	Scn11a	Sodium channel protein type 11 subunit alpha	Plasma Membrane	ion channel	201.7	ANL	> 30	FALSCH
34	SO1A1_RAT	Slco1a1	Solute carrier organic anion transporter family member 1A1	Plasma Membrane	transporter	74.1	ANL	> 30	FALSCH
35	TAOK2_RAT	Taok2	Serine/threonine-protein kinase TAO2	Plasma Membrane	kinase	138.7	ANL	> 30	FALSCH
36	TCPR1_RAT	Tecpr1	Tectonin beta-propeller repeat-containing protein 1	unknown	other	130.1	ANL	> 30	FALSCH
37	TMPS7_RAT	Tmprss7	Transmembrane protease serine 7	Plasma Membrane	peptidase	93.2	ANL	> 30	FALSCH
38	UN13A_RAT	Unc13a	Protein unc-13 homolog A	Plasma Membrane	regulatory protein	196.2	ANL	> 30	FALSCH
39	1433Z_RAT	YWHAZ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	Cytoplasm	enzyme				WAHR
40	A1I3_RAT	A1i3	Alpha-1-inhibitor 3	Cytoplasm	enzyme	163.7		> 30	FALSCH
41	ACHA6_RAT	Actb	Actin, cytoplasmic 1	Cytoplasm	other	41.7			WAHR
42	ACK1_RAT	Ankle2	Ankyrin repeat and LEM domain-containing protein 2	Nucleus	transcription regulator	103.3		> 30	WAHR
43	ACTB_RAT	Arhgdia	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	Cytoplasm	other	23.4			WAHR
44	ANGP1_RAT	ANGPT1	angiotensin 1	Extracellular Space	growth factor				WAHR
45	ANKL2_RAT	Asah2	Neutral ceramidase	Cytoplasm	enzyme	83.4		> 30	FALSCH
46	APAF_RAT	APAF1	apoptotic peptidase activating factor 1	Cytoplasm	other				WAHR
47	ASA2_RAT	Atic	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	Cytoplasm	enzyme	64.2		> 30	WAHR
48	AT1A1_RAT	Atp1a1	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	Plasma Membrane	transporter	113.0			WAHR
49	AT1A2_RAT	Atp1a2	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2	Plasma Membrane	transporter	112.1			WAHR
50	AT1A3_RAT	Atp1a3	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3	Plasma Membrane	transporter	111.6			WAHR
51	ATPA_RAT	Atp5a1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	Cytoplasm	transporter	59.7			WAHR
52	BECN1_RAT	Becn1	Beclin-1	Cytoplasm	other	51.5		> 30	FALSCH
53	CALB2_RAT	CALB2	calbindin 2	Cytoplasm	other				FALSCH
54	CD5_RAT	CD5	CD5 molecule	Plasma Membrane	transmembrane receptor				FALSCH
55	CNTN1_RAT	Cmpk1	UMP-CMP kinase	Nucleus	kinase	22.2			WAHR
56	CNTN5_RAT	Cntn1	Contactin-1	Plasma Membrane	enzyme	113.4		> 30	WAHR
57	COG7_RAT	Cntn5	Contactin-5	Plasma Membrane	other	120.5			FALSCH
58	CXB4_RAT	GJB4	gap junction protein, beta 4, 30.3kDa	Plasma Membrane	transporter				FALSCH
59	DDX52_RAT	Cog7	Conserved oligomeric Golgi complex subunit 7	Cytoplasm	transporter	86.2		> 30	FALSCH
60	DNJA1_RAT	Crmp1	Dihydropyrimidinase-related protein 1	Cytoplasm	enzyme	62.2		> 30	FALSCH
61	DPEP2_RAT	Ddx52	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX52	Nucleus	enzyme	67.2		> 30	FALSCH
62	DPOG1_RAT	Dnah12	Dynein heavy chain 12, axonemal	unknown	other	357.0		> 30	FALSCH
63	DPYL1_RAT	Dnah7	Dynein heavy chain 7, axonemal	Cytoplasm	other	464.3			FALSCH
64	DPYL5_RAT	Dnaja1	DnaJ homolog subfamily A member 1	Nucleus	other	44.8			WAHR
65	DUOX1_RAT	Dpep2	Dipeptidase 2	Plasma Membrane	peptidase	53.3			FALSCH

66	DYH12_RAT	Dpysl5	Dihydropyrimidinase-related protein 5	Cytoplasm	enzyme	61.5		> 30	WAHR
67	DYH7_RAT	Duox1	Dual oxidase 1	Plasma Membrane	enzyme	177.1		> 30	FALSCH
68	DYHC2_RAT	Dync2h1	Cytoplasmic dynein 2 heavy chain 1	Cytoplasm	other	491.9		> 30	WAHR
69	ECH1_RAT	Ech1	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial	Cytoplasm	enzyme	36.1		> 30	WAHR
70	EF1A1_RAT	Eef1a1	Elongation factor 1-alpha 1	Cytoplasm	translation regulator	50.1			WAHR
71	ENOB_RAT	Eno3	Beta-enolase	Cytoplasm	enzyme	47.0			WAHR
72	EPHA5_RAT	Epha5	Ephrin type-A receptor 5	Plasma Membrane	kinase	110.9			WAHR
73	FA71B_RAT	Fabp7	Fatty acid-binding protein, brain	Cytoplasm	transporter	14.9		> 30	WAHR
74	FABP7_RAT	Fam71b	Protein FAM71B	unknown	other	68.0			FALSCH
75	FABP7_RAT	FABP7	fatty acid binding protein 7, brain	Cytoplasm	transporter			> 30	WAHR
76	FBRL_RAT	FBL	fibrillarlin	Nucleus	other			> 30	WAHR
77	FLIP1_RAT	Filip1	Filamin-A-interacting protein 1	Cytoplasm	other	137.7		> 30	FALSCH
78	G3P_RAT	Gak	Cyclin-G-associated kinase	Nucleus	kinase	143.6			FALSCH
79	GAK_RAT	Galns	N-acetylgalactosamine-6-sulfatase	Cytoplasm	enzyme	58.3		> 30	WAHR
80	GALNS_RAT	Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Cytoplasm	enzyme	35.8			WAHR
81	GDIR1_RAT	Gdf10	Bone morphogenetic protein 3B	Extracellular Space	growth factor	52.9			WAHR
82	GNAS1_RAT	Gnas	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms XLas	Plasma Membrane	other	122.8		> 30	WAHR
83	GOLI4_RAT	Golim4	Golgi integral membrane protein 4	Cytoplasm	other	76.6		> 30	WAHR
84	GRIP1_RAT	GRIP1	glutamate receptor interacting protein 1	Plasma Membrane	other				FALSCH
85	GRK5_RAT	Grk5	G protein-coupled receptor kinase 5	Plasma Membrane	kinase	67.7		> 30	FALSCH
86	GRP75_RAT	Grpr	Gastrin-releasing peptide receptor	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor	43.2		> 30	FALSCH
87	GRP78_RAT	HSPA5	heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)	Cytoplasm	enzyme				WAHR
88	GRPR_RAT	Gtf3c1	General transcription factor 3C polypeptide 1	Nucleus	transcription regulator	242.2		> 30	FALSCH
89	GUC2E_RAT	Gucy2e	Guanylyl cyclase GC-E	Plasma Membrane	kinase	120.7			FALSCH
90	GXLT1_RAT	Gxytl1	Glucoside xylosyltransferase 1	unknown	other	50.2		> 30	FALSCH
91	H12_RAT	Hcn1	Potassium/sodium hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 1	Plasma Membrane	ion channel	102.4		> 30	FALSCH
92	H2A3_RAT	Hint1	Histidine triad nucleotide-binding protein 1	Nucleus	enzyme	13.8			WAHR
93	H2B1_RAT	Hist1h1c	Histone H1.2	Nucleus	other	22.0			WAHR
94	H2B1A_RAT	Hist1h2ba	Histone H2B type 1	Nucleus	other	14.0			FALSCH
95	H2B1A_RAT	Hist1h2ba	histone cluster 1, H2ba	Nucleus	other				FALSCH
96	HCN1_RAT	Hmgb1	High mobility group protein B1	Nucleus	transcription regulator	24.9		> 30	WAHR
97	HINT1_RAT	Hnmpa2b1	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	Nucleus	other	37.5			WAHR
98	HMGB1_RAT	Hnmpa3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	Nucleus	other	39.6			WAHR
99	HS90B_RAT	HSP90AB1	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1	Cytoplasm	enzyme				WAHR
100	HTF4_RAT	TCF12	transcription factor 12	Nucleus	transcription regulator				WAHR
101	IF172_RAT	Hspa9	Stress-70 protein, mitochondrial	Cytoplasm	other	73.8			WAHR

102	INSR_RAT	Ift172	Intraflagellar transport protein 172 homolog	Nucleus	other	197.5		> 30	WAHR
103	ITPR1_RAT	Insr	Insulin receptor	Plasma Membrane	kinase	156.7			WAHR
104	K1C10_RAT	Itp1	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1	Cytoplasm	ion channel	313.1		> 30	WAHR
105	K1C13_RAT	Kif1b	Kinesin-like protein KIF1B	Cytoplasm	transporter	204.0			WAHR
106	K1C14_RAT	Klc1	Kinesin light chain 1	Cytoplasm	other	63.7			WAHR
107	KCY_RAT	CMPK1	cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 1, cytosolic	Nucleus	kinase				WAHR
108	KIF1B_RAT	KIF1B	kinesin family member 1B	Cytoplasm	transporter				WAHR
109	KLC1_RAT	Lgals9	Galectin-9	Cytoplasm	other	39.9		> 30	FALSCH
110	KS6B1_RAT	Lin54	Protein lin-54 homolog	unknown	other	79.2			FALSCH
111	LCAP_RAT	Lnpep	Leucyl-cystinyl aminopeptidase	Cytoplasm	peptidase	117.1			WAHR
112	LEG9_RAT	Lrfr2	Leucine-rich repeat and fibronectin type-III domain-containing protein 2	unknown	other	84.9		> 30	FALSCH
113	LIN54_RAT	Lrp2	Low-density lipoprotein receptor-related protein 2	Plasma Membrane	transporter	518.9		> 30	WAHR
114	LPPRC_RAT	Lrpprc	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial	Cytoplasm	other	156.6		> 30	WAHR
115	LRP2_RAT	Mark2	Serine/threonine-protein kinase MARK2	Cytoplasm	kinase	80.8			FALSCH
116	MA2C1_RAT	Mbtps1	Membrane-bound transcription factor site-1 protease	Cytoplasm	peptidase	117.4		> 30	WAHR
117	MAP2_RAT	MAP2	microtubule-associated protein 2	Cytoplasm	other			> 30	WAHR
118	MARK2_RAT	Med24	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 24	Nucleus	transcription regulator	110.0		> 30	FALSCH
119	MBTP1_RAT	Mvp	Major vault protein	Nucleus	other	95.7		> 30	WAHR
120	MED24_RAT	Myh9	Myosin-9	Cytoplasm	enzyme	226.2		> 30	WAHR
121	MPCP_RAT	Myt1l	Myelin transcription factor 1-like protein	Nucleus	transcription regulator	132.8			FALSCH
122	MVP_RAT	Nckap1	Nck-associated protein 1	Plasma Membrane	other	128.8			WAHR
123	MYH9_RAT	Ncl	Nucleolin	Nucleus	other	77.1			WAHR
124	MYOME_RAT	Nolc1	Nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1	Nucleus	transcription regulator	73.5		> 30	FALSCH
125	MYT1L_RAT	Npl	N-acetylneuraminatase lyase	unknown	enzyme	35.1			WAHR
126	NCKP1_RAT	Nxt2	NTF2-related export protein 2	Nucleus	transporter	16.4			WAHR
127	NEUM_RAT	GAP43	growth associated protein 43	Plasma Membrane	other				FALSCH
128	NEXN_RAT	NEXN	nexilin (F actin binding protein)	Plasma Membrane	other				FALSCH
129	NUCL_RAT	Pcsk1	Neuroendocrine convertase 1	Extracellular Space	peptidase	84.1		> 30	FALSCH
130	ODPA_RAT	Pdha1	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 1	Cytoplasm	enzyme				WAHR
131	PACN1_RAT	Pde4dip	Myomegalin	Cytoplasm	enzyme	261.9		> 30	FALSCH
132	PACS1_RAT	Pdlim2	PDZ and LIM domain protein 2	Cytoplasm	other	37.6			WAHR
133	PAIRB_RAT	Pdzd2	PDZ domain-containing protein 2	Plasma Membrane	other	293.7			FALSCH
134	PDE4A_RAT	Pes1	Pescadillo homolog	Nucleus	other	67.6		> 30	FALSCH
135	PDIA1_RAT	Pgr	Progesterone receptor	Nucleus	ligand-dependent nuclear receptor	99.3		> 30	FALSCH
136	PDLI2_RAT	Phgdh	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	Cytoplasm	enzyme	56.5		> 30	WAHR
137	PDZD2_RAT	Pkn2	Serine/threonine-protein kinase N2	Cytoplasm	kinase	112.0		> 30	WAHR
138	PESC_RAT	Plaa	Phospholipase A-2-activating protein	Cytoplasm	other	87.0		> 30	FALSCH

139	PKHF1_RAT	Plekhf1	Pleckstrin homology domain-containing family F member 1	Cytoplasm	other	31.4	> 30	WAHR
140	PLAP_RAT	Ppara	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha	Nucleus	ligand-dependent nuclear receptor	52.3	> 30	WAHR
141	PLEC_RAT	Prdx1	Peroxiredoxin-1	Cytoplasm	enzyme	22.1	> 30	WAHR
142	PLOD3_RAT	PLOD3	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3	Cytoplasm	enzyme			WAHR
143	PP14B_RAT	PPP1R14B	protein phosphatase 1, regulatory subunit 14B (inhibitor)	Cytoplasm	phosphatase			WAHR
144	PPARA_RAT	Prodh2	Probable proline dehydrogenase 2	Cytoplasm	enzyme	51.0	> 30	FALSCH
145	PRDX1_RAT	Psap	Sulfated glycoprotein 1	Extracellular Space	other	61.1		WAHR
146	PRGR_RAT	Ptgs1	Prostaglandin G/H synthase 1	Cytoplasm	enzyme	69.0	> 30	WAHR
147	PROD2_RAT	Ptprs	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase S	Plasma Membrane	phosphatase	211.8	> 30	WAHR
148	PTPRS_RAT	Rasa1	Ras GTPase-activating protein 1	Cytoplasm	transporter	115.4		WAHR
149	PUR9_RAT	Rph3a	Rabphilin-3A	Plasma Membrane	transporter	75.8	> 30	FALSCH
150	PYC_RAT	PC	pyruvate carboxylase	Cytoplasm	enzyme		> 30	WAHR
151	RASA1_RAT	Rps6kb1	Ribosomal protein S6 kinase beta-1	Cytoplasm	kinase	59.1	> 30	FALSCH
152	RL40_RAT	Scn5a	Sodium channel protein type 5 subunit alpha	Plasma Membrane	ion channel	227.2		WAHR
153	ROA3_RAT	Si	Sucrase-isomaltase, intestinal	Cytoplasm	enzyme	210.2	> 30	FALSCH
154	RP3A_RAT	Slc25a3	Phosphate carrier protein, mitochondrial	Cytoplasm	transporter	39.4	> 30	WAHR
155	S2539_RAT	Slc25a39	Solute carrier family 25 member 39	Cytoplasm	other	39.2		WAHR
156	SAP_RAT	Smarca4	Transcription activator BRG1	Nucleus	transcription regulator	181.3		FALSCH
157	SCN5A_RAT	Smndc1	Survival of motor neuron-related-splicing factor 30	Nucleus	other	26.8	> 30	WAHR
158	SERA_RAT	Sod1	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	Cytoplasm	enzyme	15.9	> 30	WAHR
159	SFTPD_RAT	SFTPD	surfactant protein D	Extracellular Space	other			FALSCH
160	SMCA4_RAT	Srsf2	Serine/arginine-rich splicing factor 2	Nucleus	transcription regulator	25.5		FALSCH
161	SODC_RAT	Sspo	SCO-spondin	Cytoplasm	other	550.3		WAHR
162	SRSF2_RAT	Stau2	Double-stranded RNA-binding protein Staufen homolog 2	Cytoplasm	other	62.6		FALSCH
163	SSPO_RAT	Strn3	Striatin-3	Nucleus	transcription regulator	87.1		WAHR
164	SSRP1_RAT	Stxbp5	Syntaxin-binding protein 5	Plasma Membrane	other	127.6	> 30	FALSCH
165	STAU2_RAT	Taok3	Serine/threonine-protein kinase TAO3	Cytoplasm	kinase	105.4	> 30	FALSCH
166	STXB5_RAT	Tdrd3	Tudor domain-containing protein 3	Nucleus	transcription regulator	73.0	> 30	WAHR
167	SUIS_RAT	Tdrd7	Tudor domain-containing protein 7	Cytoplasm	other	125.2		WAHR
168	T230_RAT	Tfb2m	Dimethyladenosine transferase 2, mitochondrial	Cytoplasm	enzyme	46.0	> 30	WAHR
169	TANC1_RAT	TANC1	tetratricopeptide repeat, ankyrin repeat and coiled-coil containing 1	Plasma Membrane	other			WAHR
170	TAOK3_RAT	Tgm3	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E	Cytoplasm	enzyme	77.2	> 30	FALSCH
171	TBA3_RAT	Tmem43	Transmembrane protein 43	Nucleus	other	44.7		WAHR
172	TBB2A_RAT	Tnk2	Activated CDC42 kinase 1	Cytoplasm	kinase	115.0	> 30	FALSCH
173	TBB2B_RAT	Tnni1	Troponin I, slow skeletal muscle	Cytoplasm	other	21.7		FALSCH

174	TBB3_RAT	Trpa1	Transient receptor potential cation channel subfamily A member 1	Plasma Membrane	transporter	128.5			FALSCH
175	TBB5_RAT	Tuba3a	Tubulin alpha-3 chain	Cytoplasm	other	49.9			WAHR
176	TDRD7_RAT	Tubb2b	Tubulin beta-2B chain	Cytoplasm	other	49.9		> 30	WAHR
177	TF3C1_RAT	Tubb3	Tubulin beta-3 chain	Cytoplasm	other	50.4		> 30	WAHR
178	TGM3_RAT	Uba52	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	Cytoplasm	enzyme	14.7		> 30	WAHR
179	TMM43_RAT	Unc13b	Protein unc-13 homolog B	Cytoplasm	other	183.9		> 30	FALSCH
180	TNNI1_RAT	Upb1	Beta-ureidopropionase	Cytoplasm	enzyme	44.0		> 30	FALSCH
181	TPM1_RAT	TPM1 (includes EG:22003)	tropomyosin 1 (alpha)	Cytoplasm	other				FALSCH
182	TRPA1_RAT	Usp48	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 48	Plasma Membrane	peptidase	118.7			FALSCH
183	UBP48_RAT	Vim	Vimentin	Cytoplasm	other	53.7		> 30	WAHR
184	UN13B_RAT	Wdsub1	WD repeat, SAM and U-box domain-containing protein 1	unknown	other	52.2		> 30	WAHR
185	XYLT1_RAT		Histone H2B type 1-A	Nucleus	other	14.2		> 30	WAHR

Tabelle 6.6 Massenspektrometrie GINCAT-CNTR

Kortikale Kulturen (DIV21) wurden nach Infektion mit LVpGfaABS1D-EGFPLtoGMetRS (DIV16) für 4h mit 4 mM ANL in Abwesenheit von Methionin inkubiert, ANL-markierte Proteine über Klick-Reaktion mit DST-Biotin-Alkin-Sonde markiert, über Affinitätsaufreinigung isoliert und mittels Massenspektrometrie analysiert. Gelistet sind Proteine mit identifizierter ANL-Markierung (ANL) und ohne gefundene ANL-Markierung. Zusätzlich sind Proteine aufgeführt, die mit einem Peptid-Score von mind. 30 (>30) gefunden wurden.

Nr	Uniprot	Genname	Proteinname	Lokalisation	Funktion	MW [kDa]	ANL >25	score	Astroprot
1	ACCN1_RAT	Accn1	Amiloride-sensitive cation channel 1, neuronal	Plasma Membrane	ion channel	27.8	ANL	> 30	FALSCH
2	ADCK3_RAT	Adcy3	Chaperone activity of bc1 complex-like, mitochondrial	Cytoplasm	kinase	93.2	ANL		FALSCH
3	BEX3_RAT	Ngfrap1	Protein BEX3	Plasma Membrane	other	57.7	ANL	> 30	FALSCH
4	CHM4C_RAT	Chmp4c	Charged multivesicular body protein 4c	Cytoplasm	other	41.7	ANL		FALSCH
5	CUL3_RAT	Cul3	Cullin-3	Nucleus	enzyme	41.8	ANL	> 30	WAHR
6	DYHC1_RAT	Dync1h1	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	Cytoplasm	peptidase	41.8	ANL	> 30	WAHR
7	EGFLA_RAT	Egflam	Pikachurin	Extracellular Space	other	48.9	ANL	> 30	FALSCH
8	FA70A_RAT	Fam70a	Protein FAM70A	unknown	other	72.2	ANL	> 30	FALSCH
9	G45IP_RAT	Gadd45	Growth arrest and DNA damage-inducible proteins-interacting protein 1	Nucleus	other	29.2	ANL		FALSCH
10	ITA1_RAT	Itga1	Integrin alpha-1	Plasma Membrane	other	128.9	ANL	> 30	WAHR
11	LRRN1_RAT	Lrrn1	Leucine-rich repeat neuronal protein 1	unknown	other	32.9	ANL		FALSCH
12	MTU1_RAT	Trmu	Mitochondrial tRNA-specific 2-thiouridylase 1	Cytoplasm	enzyme	95.9	ANL	> 30	FALSCH
13	PTPRA_RAT	Ptpra	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase alpha	Plasma Membrane	phosphatase	68.7	ANL	> 30	WAHR
14	RFIP1_RAT	Rab11fip	Rab11 family-interacting protein 1	Cytoplasm	other	31.0	ANL	> 30	FALSCH
15	UN13A_RAT	Unc13a	Protein unc-13 homolog A	Plasma Membrane	other	103.3	ANL	> 30	FALSCH
16	1433Z_RAT	Ywhaz	14-3-3 protein zeta/delta	Cytoplasm	enzyme	59.5			WAHR
17	ABCB6_RAT	Abcb6	ATP-binding cassette subfamily B member 6, mitochondrial	Cytoplasm	transporter	54.9		> 30	FALSCH
18	ACTB_RAT	Actb	Actin, cytoplasmic 1	Cytoplasm	other	168.4			WAHR

19	ACTG_RAT	Actg1	Actin, cytoplasmic 2	Cytoplasm	other	33.4		> 30	WAHR
20	ACTG_RAT	Adra2a	Actin, cytoplasmic 2	Cytoplasm	other	127.0			WAHR
21	ADCY3_RAT	Adcy3	Adenylate cyclase type 3	Plasma Membrane	enzyme	113.0		> 30	FALSCH
22	ADCYA_RAT	Adcy10	Adenylate cyclase type 10	Cytoplasm	enzyme	112.1			FALSCH
23	ADT2_RAT	Slc25a5	ADP/ATP translocase 2	Cytoplasm	transporter	113.9			WAHR
24	ALBU_RAT	Alb	Serum albumin	Extracellular Space	transporter	77.4			WAHR
25	AN32B_RAT	Anp32b	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein family member B 32	Nucleus	other	60.5			WAHR
26	ANKL2_RAT	Ankle2	Ankyrin repeat and LEM domain-containing protein 2	Nucleus	transcription regulator	59.7		> 30	WAHR
27	ANPRB_RAT	Npr2	Atrial natriuretic peptide receptor 2	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor	21.3		> 30	WAHR
28	AOFA_RAT	Maoa	Amine oxidase [flavin-containing] A	Cytoplasm	enzyme	15.3		> 30	WAHR
29	APBB3_RAT	Apbb3	Amyloid beta A4 precursor protein-binding family B member 3	Cytoplasm	other	55.1		> 30	FALSCH
30	ARMX6_RAT	Armcx6	Protein ARMCX6	unknown	other	97.4			WAHR
31	ASGL1_RAT	ASRGL1	asparaginase like 1	Cytoplasm	enzyme				WAHR
32	AT1A1_RAT	Atp1a1	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	Plasma Membrane	transporter	82.7			WAHR
33	AT1A2_RAT	Atp1a2	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2	Plasma Membrane	transporter	67.3			WAHR
34	AT1A4_RAT	Atp1a4	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-4	Plasma Membrane	transporter	398.7			FALSCH
35	AT2B3_RAT	Atp2b3	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 3	Plasma Membrane	transporter	88.9		> 30	WAHR
36	ATG7_RAT	Atg7	Autophagy-related protein 7	Cytoplasm	enzyme	65.4		> 30	WAHR
37	ATLA3_RAT	Ati3	Atlastin-3	Cytoplasm	other	118.9		> 30	WAHR
38	ATPA_RAT	Atp5a1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	Cytoplasm	transporter	77.3			WAHR
39	BIN2_RAT	Bin2	Bridging integrator 2	unknown	other	464.3		> 30	FALSCH
40	CAC1G_RAT	Cacna1g	Voltage-dependent T-type calcium channel subunit alpha-1G	Plasma Membrane	ion channel	531.9		> 30	FALSCH
41	CAGE1_RAT	Cage1	Cancer-associated gene 1 protein homolog	unknown	other	50.1		> 30	FALSCH
42	CH60_RAT	Hspd1	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	Cytoplasm	enzyme	109.6			WAHR
43	CNTLN_RAT	Cntln	Centlein (Fragment)	unknown	other	38.6			FALSCH
44	CUBN_RAT	Cubn	Cubilin	Plasma Membrane	transmembrane receptor	501.8		> 30	FALSCH
45	DCE2_RAT	Gad2	Glutamate decarboxylase 2	Cytoplasm	enzyme	68.3		> 30	FALSCH
46	DLGP2_RAT	Dlgap2	Disks large-associated protein 2	Plasma Membrane	other	35.8		> 30	FALSCH
47	DLL1_RAT	Dll1	Delta-like protein 1	Plasma Membrane	enzyme	26.5		> 30	FALSCH
48	DNM1L_RAT	DNM1L	dynamitin 1-like	Cytoplasm	enzyme			> 30	WAHR
49	DPYL1_RAT	Crmp1	Dihydropyrimidinase-related protein 1	Cytoplasm	enzyme	37.3			FALSCH
50	DYH7_RAT	Dnah7	Dynein heavy chain 7, axonemal	Cytoplasm	other	77.5		> 30	FALSCH
51	EF1A1_RAT	Eef1a1	Elongation factor 1-alpha 1	Cytoplasm	translation regulator	23.4			WAHR
52	FA71B_RAT	Fam71b	Protein FAM71B	unknown	other	49.9			FALSCH
53	FABP7_RAT	Fabp7	Fatty acid-binding protein, brain	Cytoplasm	transporter	34.1			WAHR
54	FAT3_RAT	Fat3	Protocadherin Fat 3	unknown	other	25.6		> 30	FALSCH
55	FETA_RAT	Afp	Alpha-fetoprotein	Extracellular Space	transporter	14.0			FALSCH
56	G3P_RAT	Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Cytoplasm	enzyme	14.0			WAHR
57	GCYA3_RAT	Gucy1a3	Guanylate cyclase soluble subunit alpha-3	Cytoplasm	enzyme	74.7		> 30	FALSCH

58	GDIR1_RAT	ARHGDI3	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	Cytoplasm	other				WAHR
59	GFAP_RAT	Gfap	Glial fibrillary acidic protein	Cytoplasm	other	96.6		> 30	WAHR
60	GHC2_RAT	Slc25a18	Mitochondrial glutamate carrier 2	unknown	other	24.9		> 30	WAHR
61	GSTA1_RAT	Gsta1	Glutathione S-transferase alpha-1	Cytoplasm	enzyme	73.7			FALSCH
62	H2AJ_RAT	H2afj	Histone H2A.J	Nucleus	other	83.2			WAHR
63	H2B1_RAT	Hist1h2bl	Histone H2B type 1	Nucleus	other	111.2			WAHR
64	H4_RAT	Hist1h4b	Histone H4	Nucleus	other	51.3		> 30	WAHR
65	HBS1L_RAT	Hbs1l	HBS1-like protein	Cytoplasm	translation regulator	130.7			WAHR
66	HERC4_RAT	Herc4	Probable E3 ubiquitin-protein ligase HERC4	unknown	enzyme	269.8		> 30	FALSCH
67	HMDH_RAT	Hmgcr	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase	Cytoplasm	enzyme	56.5			FALSCH
68	HMGB1_RAT	Hmgb1	High mobility group protein B1	Nucleus	transcription regulator	48.8			WAHR
69	HNRPM_RAT	Hnmpm	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	Nucleus	other	44.6			WAHR
70	HS90B_RAT	Hsp90ab1	Heat shock protein HSP 90-beta	Cytoplasm	enzyme	48.3			WAHR
71	HYOU1_RAT	Hyou1	Hypoxia up-regulated protein 1	Cytoplasm	other	69.1		> 30	WAHR
72	ILK_RAT	Ilk	Integrin-linked protein kinase	Plasma Membrane	kinase	64.8		> 30	WAHR
73	K1731_RAT		Leucine-rich repeat-containing protein KIAA1731 homolog	Cytoplasm	other	57.2		> 30	WAHR
74	KALRN_RAT	Kalrn	Kalirin	Cytoplasm	kinase	67.9		> 30	WAHR
75	KCC2A_RAT	Camk2a	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha	Cytoplasm	kinase	102.0		> 30	WAHR
76	KCRB_RAT	Ckb	Creatine kinase B-type	Cytoplasm	kinase	55.8			WAHR
77	KCY_RAT	Cmpk1	UMP-CMP kinase	Nucleus	kinase	117.1			WAHR
78	KLH20_RAT	Klhl20	Kelch-like protein 20	Plasma Membrane	enzyme	80.6			FALSCH
79	KPCD1_RAT	Prkd1	Serine/threonine-protein kinase D1	Cytoplasm	kinase	24.7		> 30	WAHR
80	KTNA1_RAT	Katna1	Katanin p60 ATPase-containing subunit A1	Cytoplasm	enzyme	93.1			WAHR
81	LCAP_RAT	Lnpep	Leucyl-cystinyl aminopeptidase	Cytoplasm	peptidase	269.3			WAHR
82	LYPA1_RAT	Lypla1	Acyl-protein thioesterase 1	Cytoplasm	enzyme	60.7			WAHR
83	M3K11_RAT	Map3k11	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 11	Cytoplasm	kinase	49.7			FALSCH
84	MAP2_RAT	Map2	Microtubule-associated protein 2	Cytoplasm	other	102.9			WAHR
85	MK15_RAT	Mapk15	Mitogen-activated protein kinase 15	Cytoplasm	kinase	316.9		> 30	FALSCH
86	NCAM1_RAT	Ncam1	Neural cell adhesion molecule 1	Plasma Membrane	other	35.1		>40	WAHR
87	NCOAT_RAT	Mgea5	Bifunctional protein NCOAT	Cytoplasm	enzyme	40.9		> 30	WAHR
88	NF1_RAT	Nf1	Neurofibromin	Cytoplasm	other	63.6			WAHR
89	NPL_RAT	Npl	N-acetylneuraminase lyase	unknown	enzyme	114.0			WAHR
90	NR1I3_RAT	Nr1i3	Nuclear receptor subfamily 1 group I member 3	Nucleus	ligand-dependent nuclear receptor	61.1		> 30	FALSCH
91	NT5D2_RAT	Nt5dc2	5'-nucleotidase domain-containing protein 2	unknown	other	28.9			WAHR
92	P20L1_RAT	Phf20l1	PHD finger protein 20-like protein 1	unknown	other	149.4		> 30	FALSCH
93	P4HA3_RAT	P4ha3	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-3	unknown	enzyme	77.9		> 30	WAHR
94	P5CR3_RAT	Pycrl	Pyroline-5-carboxylate reductase 3	unknown	enzyme	85.0			WAHR
95	PARD3_RAT	Pard3	Partitioning defective 3 homolog	Plasma Membrane	other	14.9			WAHR
96	PLK2_RAT	Plk2	Serine/threonine-protein kinase PLK2	Nucleus	kinase	29.5			FALSCH

97	PNRC2_RAT	Pnrc2	Proline-rich nuclear receptor coactivator 2	Nucleus	other	90.2			WAHR
98	PSPC1_RAT	Pspc1	Paraspeckle component 1	Nucleus	other	129.7		> 30	WAHR
99	PTPRS_RAT	Ptprs	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase S	Plasma Membrane	phosphatase	71.1			WAHR
100	PYC_RAT	Pc	Pyruvate carboxylase, mitochondrial	Cytoplasm	enzyme	33.4		> 30	WAHR
101	RGN_RAT	Rgn	Regucalcin	Nucleus	enzyme	210.2		> 30	FALSCH
102	RGPA2_RAT	Ralgapa2	Ral GTPase-activating protein subunit alpha-2	Cytoplasm	other	142.6		> 30	FALSCH
103	RGRF1_RAT	Rasgrf1	Ras-specific guanine nucleotide-releasing factor 1	Cytoplasm	other	30.0			WAHR
104	RL7A_RAT	Rpl7a	60S ribosomal protein L7a	Cytoplasm	other	149.0			WAHR
105	RN123_RAT	Rnf123	E3 ubiquitin-protein ligase RNF123	Cytoplasm	other	34.2		> 30	WAHR
106	ROA3_RAT	Hnmpa3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	Nucleus	other	17.9			WAHR
107	RS27A_RAT	Rps27a	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	Cytoplasm	other	141.7			WAHR
108	RTEL1_RAT	Rtel1	Regulator of telomere elongation helicase 1	Nucleus	enzyme	42.7		> 30	FALSCH
109	S38A9_RAT	Slc38a9	Putative sodium-coupled neutral amino acid transporter 9	unknown	other	104.5		> 30	FALSCH
110	SAFB1_RAT	Safb	Scaffold attachment factor B1	Nucleus	other	61.1		> 30	FALSCH
111	SBNO1_RAT	Sbno1	Protein strawberry notch homolog 1	unknown	enzyme	226.2		> 30	FALSCH
112	SHAN1_RAT	Shank1	SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 1	Cytoplasm	other	101.9		> 30	FALSCH
113	SND1_RAT	Snd1	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	Nucleus	enzyme	15.9		> 30	WAHR
114	SODC_RAT	SOD1	superoxide dismutase 1, soluble	Cytoplasm	enzyme				WAHR
115	SPICE_RAT	SPICE1	spindle and centriole associated protein 1	Cytoplasm	other				FALSCH
116	SPTA2_RAT	Sptan1	Spectrin alpha chain, brain	Plasma Membrane	other	210.2			WAHR
117	SUIS_RAT	Si	Sucrase-isomaltase, intestinal	Cytoplasm	enzyme	116.4			FALSCH
118	SYCP1_RAT	Sycp1	Synaptonemal complex protein 1	Nucleus	other	22.5			FALSCH
119	TAOK3_RAT	Taok3	Serine/threonine-protein kinase TAO3	Cytoplasm	kinase	50.1			FALSCH
120	TBA1A_RAT	Tuba1a	Tubulin alpha-1A chain	Cytoplasm	other	49.9			WAHR
121	TBA3_RAT	Tuba3a	Tubulin alpha-3 chain	Cytoplasm	other	49.9			WAHR
122	TBB2A_RAT	Tubb2a	Tubulin beta-2A chain	Cytoplasm	other	49.9			WAHR
123	TBB2B_RAT	Tubb2b	Tubulin beta-2B chain	Cytoplasm	other	49.8			WAHR
124	TBB2C_RAT	Tubb3	Tubulin beta-2C chain	Cytoplasm	other	50.4		> 30	WAHR
125	TBB3_RAT	Tubb4b	Tubulin beta-3 chain	Cytoplasm	other	57.4			FALSCH
126	TCPB_RAT	Cct2	T-complex protein 1 subunit beta	Cytoplasm	kinase	125.2		> 30	WAHR
127	TDRD7_RAT	Tdrd7	Tudor domain-containing protein 7	Cytoplasm	other	52.8		> 30	WAHR
128	TINAL_RAT	Tinagl1	Tubulointerstitial nephritis antigen-like	Extracellular Space	transporter	36.4		> 30	FALSCH
129	TISB_RAT	Zfp36l1	Butyrate response factor 1	Nucleus	transcription regulator	24.1		> 30	WAHR
130	TRPC3_RAT	Trpc3	Short transient receptor potential channel 3	Plasma Membrane	ion channel	32.2			FALSCH
131	TXNL1_RAT	Txn1	Thioredoxin-like protein 1	Cytoplasm	enzyme	60.1		> 30	WAHR
132	UD13_RAT	Ugt1	UDP-glucuronosyltransferase 1-3	Cytoplasm	enzyme	60.0			WAHR
133	UD18_RAT	Ugt1	UDP-glucuronosyltransferase 1-8	Cytoplasm	enzyme	196.2			WAHR
134	VINC_RAT	Vcl	Vinculin	Plasma Membrane	enzyme	116.5		> 30	WAHR
135	XIRP2_RAT	Xirp2	Xin actin-binding repeat-containing protein 2	unknown	other	373.8		> 30	FALSCH

Tabelle 6.7: Massenspektrometrie GINCAT-BDNF-Stimulation

Kortikale Kulturen DIV21 wurden nach Infektion mit LVpGfaABS1D-EGFPLtoGMetRS (DIV16) für 4h mit 4 mM ANL, 50 ng/ml BDNF in Abwesenheit von Methionin inkubiert, ANL-markierte Proteine über Klick-Reaktion mit DST-Biotin-Alkin-Sonde markiert, über Affinitätsaufreinigung isoliert und mittels Massenspektrometrie analysiert. Gelistet sind Proteine mit identifizierter ANL-Markierung (ANL) und ohne gefundene ANL-Markierung. Zusätzlich sind Proteine aufgeführt, die mit einem Peptid-Score von mind. 30 (>30) gefunden wurden.

6.7 Massenspektrometrie Ergebnis sekretierte Proteine

40	CLAT_RAT	CLAT	Choline O-acetyltransferase	Nucleus	enzyme	71.8		Nein
41	CLUS_RAT	Ciu	Clusterin	Extracellular Space	other	51.3		Ja
42	CN050_RAT	RGD1309051	Uncharacterized protein C14orf50 homolog	Extracellular Space	other	47.7		Ja
43	CO1A1_RAT	COL1A1	Collagen alpha-1(I) chain	Extracellular Space	other	137.9		Ja
44	CO1A2_RAT	Col1a2	Collagen alpha-2(I) chain	Extracellular Space	other	129.5		Ja
45	CO3_RAT	C3	Complement C3 OS=Rattus norvegicus	Extracellular Space	peptidase	186.3	AHA	Ja
46	CSF1_RAT	Csf1	Macrophage colony-stimulating factor 1	Extracellular Space	cytokine	62.1		Nein
47	CYP5A_RAT	CNTNAP5	Contactin-associated protein like 5-1	unknown	other	145.4	AHA	Nein
48	CYTC_RAT	Cst3	Cystatin-C	Extracellular Space	other	15.4		Ja
49	DAXX_RAT	Daxx	Death domain-associated protein 6	Nucleus	transcription regulator	80.6		Nein
50	DDX1_RAT	Ddx1	ATP-dependent RNA helicase DDX1	Nucleus	enzyme	82.4		Ja
51	DESM_RAT	Des	Desmin	Cytoplasm	other	53.4	AHA	Nein
52	DPOG1_RAT	Polg	DNA polymerase subunit gamma-1	Cytoplasm	enzyme	136.8		Nein
53	DTNB_RAT	Dtnb	Dystrobrevin beta	Plasma membrane	enzyme	73.8	AHA	Nein
54	DYH7_RAT	DNAH7	Dynein heavy chain 7, axonemal	Cytoplasm	other	464.3	AHA	Nein
55	DYHC1_RAT	DYHC1H1	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	Cytoplasm	peptidase	531.9		Ja
56	DYN2_RAT	Dnm2	Dynammin-2	Plasma membrane	enzyme	98.2	AHA	Ja
57	ECE1_RAT	Ece1	Endothelin-converting enzyme 1	Plasma membrane	peptidase	86.1	AHA	Nein
58	ENPP6_RAT	ENPP6	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 6	Cytoplasm	enzyme	50.7		Nein
59	EPHA6_RAT	EPHA6	Ephrin type-A receptor 6	Plasma membrane	kinase	116.1		Nein
60	ERC2_RAT	ERC2	ERC protein 2	Cytoplasm	other	110.5		Nein
61	EST2_RAT	Gestc	Liver carboxylesterase 1	Cytoplasm	enzyme	60.1	AHA	Nein
62	EVL_RAT	Evl	Ena/VASP-like protein	Cytoplasm	other	42.1	AHA	Nein
63	F122A_RAT	FAM122A	Protein FAM122A	unknown	other	30.5		Ja
64	F134B_RAT	FAM134B	Protein FAM134B	Cytoplasm	other	52.7		Nein
65	FAT7B_RAT	LOC497888	Protein FAM71B	unknown	other	68.0		Nein
66	FAK1_RAT	Plk2	Focal adhesion kinase 1	Cytoplasm	kinase	119.6	AHA	Nein
67	FAKD3_RAT	RGD1309729	FAST kinase domain-containing protein 3	Cytoplasm	other	75.2	AHA	Nein
68	FGR1_RAT	Fgfr1	Fibroblast growth factor receptor-like 1	Plasma membrane	transmembrane receptor	57.1	AHA	Ja
69	FINC_RAT	Fkbp1	Fibronectin	Extracellular Space	enzyme	272.3		Ja
70	FKBP1_RAT	Fkbp1	FK506-binding protein-like	Nucleus	other	37.9		Ja
71	FMOD_RAT	Fmod	Fibromodulin	Extracellular Space	other	43.2		Ja
72	GBRA2_RAT	LOC289606	Gamma-aminobutyric acid receptor subunit alpha-2	Plasma membrane	ion channel	51.1		Ja
73	GCC2_RAT	GCC*	GRIP and coiled-coil domain-containing protein 2	Cytoplasm	other	195.0	AHA	Ja
74	GDAP2_RAT	GDAP2	Ganglioside-induced differentiation-associated-protein 2	unknown	other	56.1		Nein
75	GELS_RAT	Gsn	Gelsolin	Extracellular Space	other	86.0		Ja
76	GFP11_RAT	Gfp11	Glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 1	Cytoplasm	enzyme	76.8		Ja
77	GLRX3_RAT	GLRX3	Glutaredoxin-3	Cytoplasm	enzyme	37.8	AHA	Ja
78	GLYR1_RAT	GLYR1	Putative oxidoreductase GLYR1	unknown	other	60.4	AHA	Nein
79	GRIP2_RAT	Grip2	Glutamate receptor-interacting protein 2	Plasma membrane	other	112.4	AHA	Nein
80	GRRK6_RAT	Gprk6	G protein-coupled receptor kinase 6	Plasma membrane	kinase	65.9		Nein

81	GSTM5_RAT	GSTM3	Glutathione S-transferase Mu 5	Cytoplasm	enzyme	26.6	AHA	Ja
82	GTF2I_RAT	GTF2I	General transcription factor II-I	Nucleus	transcription regulator	110.1	AHA	Ja
83	GXLT1_RAT	GXLT1	Glucoside xylosyltransferase 1	unknown	other	50.2	AHA	Nein
84	HBB2_RAT		Hemoglobin subunit beta-2	Nucleus	other	16.0		Ja
85	HNRPM1_RAT	Hnrpm	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	Cytoplasm	kinase	73.7	AHA	Ja
86	HXX3_RAT	Hk3	Hexokinase-3	Extracellular Space	other	100.2	AHA	Nein
87	IC1_RAT	Serping1	Plasma protease C1 inhibitor	unknown	other	55.6		Ja
88	IQCAL_RAT		IQ and AAA domain-containing protein 1-like	unknown	other	95.6		Nein
89	IRK10_RAT	Kcni10	ATP-sensitive inward rectifier potassium channel 10	Plasma membrane	ion channel	42.5		Ja
90	KCNB1_RAT	KCNB1	Potassium voltage-gated channel subfamily B member 1	Plasma membrane	ion channel	95.6	AHA	Nein
91	KCNH4_RAT	Kcni4	Potassium voltage-gated channel subfamily H member 4	Plasma membrane	ion channel	111.3		Nein
92	KCNN3_RAT	Kcnn3	Small conductance calcium-activated potassium channel protein 3	Plasma membrane	ion channel	81.4	AHA	Nein
93	KHDR1_RAT	KHDRBS1	KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 1	Nucleus	transcription regulator	48.3		Nein
94	KIF1B_RAT	Kif1b	Kinesin-like protein KIF1B	Cytoplasm	Transporter	204.0		Ja
95	KIF3C_RAT	Kif3c	Kinesin-like protein KIF3C	Cytoplasm	other	89.8	AHA	Nein
96	KINH_RAT	Kif5b	Kinesin-1 heavy chain	Cytoplasm	other	109.5	AHA	Ja
97	KSGB1_RAT	RPSS6KB1	Ribosomal protein S6 kinase beta-1	Cytoplasm	kinase	59.1	AHA	Nein
98	KTNA1_RAT	Katna1	Katanin p60 ATPase-containing subunit A1	Cytoplasm	enzyme	55.8		Ja
99	LKAP_RAT	KIAA0430	Linkain-b1	unknown	other	192.6		Nein
100	LUM_RAT	LUM	Lumican	Extracellular Space	other	38.3		Nein
101	LYAG_RAT	GAA	Lysosomal alpha-glucosidase	Cytoplasm	enzyme	106.1		Ja
102	MACF1_RAT	MACF1	Microtubule-actin cross-linking factor 1	Cytoplasm	enzyme	619.2	AHA	Ja
103	MAGI1_RAT	MAGI1	Membrane-associated guanylate kinase, WW and PDZ domain-containing protein 1	Plasma membrane	kinase	136.2		Nein
104	MDGA1_RAT	MDGA1	MAM domain-containing glycosylphosphatidylinositol anchor protein 1	Plasma membrane	other	105.9		Nein
105	MDGA2_RAT	Mamdc1	MAM domain-containing glycosylphosphatidylinositol anchor protein 2	unknown	other	106.7		Ja
106	MED23_RAT	MED23	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 23	Nucleus	transcription regulator	156.1		Nein
107	MSH2_RAT	Msh2	DNA mismatch repair protein Msh2	Nucleus	enzyme	104.0		Nein
108	MYH9_RAT	Myh9	Myosin-9	Cytoplasm	enzyme	226.2	AHA	Ja
109	MYO9A_RAT	MYO9A	Myosin-IXa	Cytoplasm	enzyme	301.2	AHA	Nein
110	MYP11_RAT	PPP1R12A	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A	Cytoplasm	phosphatase	115.2		Ja
111	NAC3_RAT	Slc8a3	Sodium/calcium exchanger 3	Plasma membrane	Transporter	103.1		Nein
112	NCOAT_RAT	Mgea5	Bifunctional protein NCOAT	Cytoplasm	enzyme	102.9	AHA	Ja
113	NEB2_RAT	Ppp1r9b	Neurabin-2	Cytoplasm	other	89.6	AHA	Nein
114	NMT1_RAT	Nmt1	Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 1	Cytoplasm	enzyme	56.8		Nein
115	NOLC1_RAT	Nolic1	Nucleolar and colicd-body phosphoprotein 1	Nucleus	transcription regulator	73.5		Nein
116	NONO_RAT	NONO	Non-POU domain-containing octamer-binding protein	Nucleus	other	54.9	AHA	Ja
117	NUJ53_RAT	Nup153	Nuclear pore complex protein Nup153	Nucleus	Transporter	152.7	AHA	Ja
118	OTOF_RAT	Otof	Otofelin	Plasma membrane	other	226.2	AHA	Nein

119	PACN1_RAT	PACSN1	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 1	Cytoplasm	kinase	50.4		Nein
120	PARD3_RAT	PARD3	Partitioning defective 3 homolog	Plasma membrane	other	149.4	AHA	Ja
121	PCSK4_RAT	Pcsk4	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 4	Extracellular Space	peptidase	75.7		Nein
122	PDE4B_RAT	Pde4b	cAMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 4B	Cytoplasm	enzyme	83.3	AHA	Ja
123	PGH1_RAT	Ptgs1	Prostaglandin G/H synthase 1	Cytoplasm	enzyme	69.0		Ja
124	PGS2_RAT	Dcn	Decorin OS=Rattus norvegicus GN=Dcn PE=1 SV=1	Extracellular Space	other	39.8		Nein
125	PLEC_RAT	PLEC	Plectin	Cytoplasm	other	533.2	AHA	Ja
126	PLST_RAT	PLS3	Plastin-3	Cytoplasm	other	70.6	AHA	Ja
127	PRGR_RAT	Pgr	Progesterone receptor	Nucleus	ligand dependent nuclear transcription factor	99.3	AHA	Nein
128	PRVA_RAT	Pvalb	Parvalbumin alpha	Cytoplasm	other	11.9	AHA	Nein
129	PSB8_RAT	PSMB8	Proteasome subunit beta type-8	Cytoplasm	peptidase	30.5	AHA	Ja
130	PTN9_RAT	Ptpn9	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 9	Cytoplasm	phosphatase	67.9		Ja
131	PTPRA_RAT	Ptpra	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase alpha	Plasma membrane	phosphatase	90.2		Ja
132	RAB1A_RAT	Rab1	Ras-related protein Rab-1A	Cytoplasm	enzyme	22.7	AHA	Ja
133	RAD50_RAT	Rad50	DNA repair protein RAD50	Nucleus	enzyme	153.7	AHA	Nein
134	RHDF1_RAT	RHDF1	Inactive rhomboid protein 1	unknown	other	97.2		Ja
135	RHG29_RAT	ARHGAP29	Rho GTPase-activating protein 29	Cytoplasm	other	141.9	AHA	Nein
136	RIC8A_RAT	Ric8a	Synebrin-A	Cytoplasm	other	59.8		Nein
137	RL7_RAT	Rpl7	60S ribosomal protein L7	Cytoplasm	other	30.3		Ja
138	RL7A_RAT	Gm5619	60S ribosomal protein L7a	Cytoplasm	other	30.0		Nein
139	RS19_RAT	RPS19	40S ribosomal protein S19	Cytoplasm	other	16.1	AHA	Ja
140	SAE1_RAT	SAE1	SUMO-activating enzyme subunit 1	Cytoplasm	enzyme	38.5	AHA	Ja
141	SAP_RAT	PSAP	Sulfated glycoprotein 1	Extracellular Space	other	61.1		Ja
142	SCN9A_RAT	Scn9a	Sodium channel protein type 9 subunit alpha	Plasma membrane	ion channel	225.9	AHA	Nein
143	SHAN2_RAT	SHANK2	SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 2	Plasma membrane	other	158.6	AHA	Nein
144	SLIT1_RAT	Slit1	Slit homolog 1 protein	Extracellular Space	other	167.4	AHA	Nein
145	SMK_RAT	RGD1562638	Sperm motility kinase	unknown	other	73.8	AHA	Nein
146	SPG7_RAT	SPG7	Paraplegin	Cytoplasm	peptidase	82.1	AHA	Nein
147	SPRC_RAT	SPARC	SPARC	Extracellular Space	other	34.3		Ja
148	SPRL1_RAT	Sparc1	SPARC-like protein 1	Extracellular Space	other	70.6		Ja
149	SRP54_RAT	Srp54	Signal recognition particle 54 kDa protein	Cytoplasm	other	55.7	AHA	Ja
150	SSDH_RAT	Aldh5a1	Succinate-semialdehyde dehydrogenase, mitochondrial	Cytoplasm	other	56.1		Ja
151	ST18_RAT	St18	Suppression of tumorigenicity 18 protein	Cytoplasm	enzyme	113.4		Nein
152	STX1A_RAT	Stx1a	Syntaxin-1A	Cytoplasm	Transporter	33.0	AHA	Nein
153	SVVC_RAT	VARS	Valyl-RNA synthetase	Cytoplasm	enzyme	140.3		Ja
154	TAB2_RAT	Map3k7ip2	TGF-beta-activated kinase 1 and MAP3K7-binding protein 2	Cytoplasm	other	76.3	AHA	Nein
155	TANC1_RAT	TANC1	Protein TANC1	Plasma membrane	other	200.4		Ja
156	TAOK1_RAT	Taok1	Serine/threonine-protein kinase TAO1	Cytoplasm	kinase	115.9		Nein
157	TCPB_RAT	Cct2	T-complex protein 1 subunit beta	Cytoplasm	kinase	57.4		Ja
158	TERRA_RAT	Vcp	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	Cytoplasm	enzyme	89.3	AHA	Ja
159	TM209_RAT	TMEM209	Transmembrane protein 209	unknown	other	62.9	AHA	Ja

160	TMPS7_RAT	TMPRSS7	Transmembrane protease serine 7	Plasma membrane	peptidase	93.2	AHA	Nein
161	TTC5_RAT	Ttc5	Tetratricopeptide repeat protein 5	unknown	other	48.8		Nein
162	TXNIP_RAT	TXNIP	Thioredoxin-interacting protein	Cytoplasm	other	44.0	AHA	Ja
163	UBA1_RAT	UBA1	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	Cytoplasm	enzyme	117.7	AHA	Ja
164	UBP48_RAT	Usp48	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 48	Plasma membrane	peptidase	118.7		Nein
165	UNC5A_RAT	Unc5a	Netrin receptor UNC5A	Plasma membrane	transmembrane receptor	98.8		Nein
166	UT1_RAT	SLC14A1	Urea transporter 1	Plasma membrane	Transporter	42.0		Ja
167	UTP15_RAT	UTP15	U3 small nuclear RNA-associated protein 15 homolog	Nucleus	other	59.5		Nein
168	VINC_RAT	VCL	Vinculin	Plasma membrane	enzyme	116.5	AHA	Ja
169	VLDLR_RAT	Vldlr	Very low-density lipoprotein receptor	Plasma membrane	Transporter	96.5		Nein
170	VP33B_RAT	Vps33b	Vacuolar protein sorting-associated protein 33B	Cytoplasm	Transporter	70.6		Nein
171	VPP1_RAT	ATP6V0A1	V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 1	Cytoplasm	Transporter	96.3		Ja
172	XIRP2_RAT	XIRP	Xin actin-binding repeat-containing protein 2	Nucleus	other	373.8	AHA	Nein
173	ZCH18_RAT	ZC3H18	Zinc finger CCH domain-containing protein 18	unknown	other	105.5		Nein
174	ZFY26_RAT	ZFYVE26	Zinc finger FYVE domain-containing protein 26	Cytoplasm	other	284.0		Nein

Tabelle 6.8: Ergebnis Massenspektrometrie sekretierte Proteine

Astrozyten in Monokultur (DIV14) wurden für 24 h mit 4 mM AHA in Methionin-freiem Medium inkubiert, Proteine aus dem Medium gereinigt und aufkonzentriert. Nach Markierung von Proteinen mit integriertem AHA mit der DST-Biotin-Alkin-Sonde und einer folgenden Aufreinigung über NeutrAvidin wurden die isolierten Proteine mittels Massenspektrometrie identifiziert. Die Tabelle enthält sowohl Proteine mit identifiziertem AHA (AHA), als auch Proteine, die kein Peptid mit AHA aufweisen. Ein Vergleich mit der Astroprot-Datenbank weist teilweise Übereinstimmung mit den gefundenen Proteinen auf.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Geburtstag	09.11.1980
Geburtsort	Potsdam
Staatsbürgerschaft	Deutsch
Geburtsname	Müller
Eltern	Karin Müller (geb. Schütze) Max Müller

Ausbildung

1987 – 1993	Grundschule
1993 – 2000	Gymnasium mit dem Abschluss Abitur
April 2001 – April 2006	Studium der Biologie an der FU Berlin mit den Schwerpunkten Genetik, Biochemie, Zellbiologie und Tierphysiologie
26.03.2006	Vordiplom
Ab September 2003	Studium des internationalen Masterprogramms <i>Medical-Neurosciences</i> als Teilzeitstudent an der Charité, Berlin
Juli 2005 – Februar 2006	Anfertigung der Diplomarbeit Biologie am MDC Berlin mit molekularbiologischer Tätigkeit
23.02.2006	Diplom Biologin
Ab März 2006	Anfertigung der Masterarbeit für das internationale Masterprogramm <i>Medical Neurosciences</i> an der Charité Berlin
11.12.2006	Master of <i>Medical Neurosciences</i> (MScNS)
März 2007 Mai 2008	Anfertigung der Promotion AG Dr. B. Qualmann
August 2008- Mai 2012	Anfertigung der Promotion AG Dr. D.C. Dieterich

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Referierte Originalarbeiten:

Koch D., Spiwoks-Becker I., Sabanov V., Sinning A., Dugladze T., Stellmacher A., Ahuja R., Grimm J., Schüler S., Müller A., Angenstein F., Ahmed T., Diesler A., Moser M., Tom Dieck S., Spessert R., Boeckers TM., Fässler R., Hübner CA., Balschun D., Gloveli T., Kessels M.M., Qualmann B.(2011): Proper synaptic vesicle formation and neuronal network activity critically rely on syndapin I. *EMBO J.* 30(24):4955-69.

Pielot, R., Smalla, K.H., Müller A., Landgraf P., Lehmann A.C., Eisenschmidt E., Haus U.U., Weismantel R., Gundelfinger E.D., Dieterich D.C. (2012). SynProt: A Database for Proteins of Detergent-Resistant Synaptic Protein Preparations. *Front Synaptic Neurosci.* 4:1

Tom Dieck S., Müller A., Nehring A., Hinz F., Bartnik I., Schuman EM., Daniela C. Dieterich (2012): Metabolic labeling with noncanonical amino acids and visualization by chemoselective fluorescent tagging. *Curr Protoc Cell Biol.* Chapter 7:Unit7:1

Im Druck:

Kowalska E., Ripperger J.A., Hoegger D.C., Bruegger P., Buch T., Birchler T., Mueller A., Albrecht U., Contaldo C., Brown S.A. (2012): NONO couples the circadian clock to the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* *Im Druck*