

NACHWEIS UND CHARAKTERISIERUNG
DER MUTMASSLICHEN ADENYLATKINASE 7,
EINES EPENDYMALEN PROTEINS

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2009

vorgelegt von
Daniela Gschwend

Tag der mündlichen Prüfung: 03.04.2009

Dekan: Prof. Dr. L. Wesemann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. B. Hamprecht

2. Berichterstatter: PD Dr. S. Verleysdonk

Für meine Familie

Audaces fortuna iuvat.

Danksagung

Mein Dank gilt folgenden Personen:

Prof. Dr. Bernd Hamprecht für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Lehrstuhl durchzuführen, den Workshop in Alba di Canazei zu besuchen sowie für seine hilfreichen Anmerkungen zu meinen Seminaren und zu dieser Arbeit und für den “Wochenend-Einsatz“; PD Dr. Stephan Verleysdonk für die sehr gute Betreuung während meiner Doktorandenzeit, den Ideenaustausch und seine ständige Diskussionsbereitschaft, sowie die Bereitschaft, meine Arbeit Korrektur zu lesen und als zweiter Prüfer zu fungieren; Dr. Wolfgang Hirschner für seine ständige Bereitschaft, geduldig meine Fragen zu beantworten und für die gute Einführung in den Laboralltag; Dr. Bhavani S. Kowtharapu für die Herstellung von Lentiviren zur Transfektion von HEK293T-Zellen und in der Folge die Herstellung von Zelllinien zur permanenten Expression von pAK7, pAK7-EGFP und den AK1-Varianten; Frau Dr. Brigitte Pfeiffer-Guglielmi für die Bereitstellung des GP-BB-Antiserums und die gute Einführung in Mikroskop und Digitalkamera, sowie ihr Interesse an meiner Arbeit;

Prof. Dr. Michael Schwarz für die Möglichkeit, den “Lightcycler“ seines Arbeitskreises zu nutzen; Frau Erika Maier aus dem Pathologischen Institut der Universität Tübingen für die Herstellung der hervorragenden Cryo-Gewebeschnitte; Herrn Prof. Dr. Günther Jung und Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Wiesmüller für die Synthese des in dieser Arbeit verwendeten Peptids; Frau Prof. Dr. Gabriele Dodt für die Möglichkeit, die Röntgenfilm-Entwicklermaschine zu benützen; Herrn Prof. Dr. Hans Bisswanger für die Möglichkeit, alle Messungen des Adenylatkinase-Tests an seinem temperierten Photometer durchzuführen.

... und außerdem:

schulde ich Barbara Birk und Ulrike Thieß vielen Dank für ihre exzellente technische und ständige freundschaftliche Unterstützung;

ferner geht mein großer Dank an Barbara für die Hilfe bei der Klonierung der AK1 aus Ratten-cDNA, das Anlegen der Primärzellkulturen, die gute Einführung in den Laborall-

tag und viele Kleinigkeiten; Ulrike danke ich sehr für die Läufe am Lightcycler und das Tippen vieler Zahlen, die Assistenz bei der Etablierung des TAP-Systems und viele Agarosegele...

Allen anderen derzeitigen und ehemaligen Kolleginnen und Kollegen in den Arbeitskreisen Hamprecht und Verleysdonk danke ich ganz herzlich für meine schnelle Integration, das gute und freundliche Arbeitsklima, die stete Hilfsbereitschaft, die gute Zusammenarbeit bei der Grundkursbetreuung und viele nette Gespräche. Katharina Rehn danke ich für's geduldige Zuhören zu jeder Zeit an jedem Ort, ebenso Ruth Schmid und Erika Mikeler. Julia Hullmann danke ich für ihre produktiven Vorschläge und Aufmunterungen – fachlich und privat. Vielen Dank an Benedikt Dolderer für den regen Ideenaustausch und die schöne Zeit mit ihm und seiner Frau Costa in Alba und bei anderen „meetings“, sowie für's Korrekturlesen und für die konstruktive Kritik.

Katja Nau danke ich ganz herzlich für die Einführung in das Hefe-Zwei-Hybrid-System, viele gemeinsame Abende beim Sport und ein offenes Ohr. Helmut Jungwirth danke ich für seinen Einsatz bei der Verbesserung meiner Hefetrafo, ebenso Eva Herker und Silke Wissing für die stete Bereitschaft, meine Hefen zu begutachten und mir Tipps zu geben. Ebenso bedanke ich mich bei allen Freunden und Bekannten aus den Nachbararbeitsgruppen, vor allem Viola Denninger, Caro Schönfeld, Witta Kaiser, Gordon Eske und Khalid Muhammad, für den fachlichen und kulinarischen Austausch, morgendlichen Kaffee und die abendliche Abwechslung.

Holger Scheible bin ich sehr dankbar, dass er immer für mich da war und mich unterstützt hat, wenn ich ihn gebraucht habe.

All meinen Kolleginnen und Kollegen, die mich die letzten Jahre immer wieder bestärkt haben weiterzumachen, möchte ich ebenfalls herzlich danken.

Im Bedarfsfall hatte ich immer gute Freunde, die mir zur Seite gestanden sind und in jeglicher Hinsicht für mein Wohlbefinden gesorgt haben. Fühlt Euch dafür umarmt!

Markus Kaupp und Christian Köhn haben mir durch ihre geduldige Beantwortung all meiner Computer-Fragen und -Probleme immer sehr geholfen. Christian danke ich außerdem für die leckeren Abendessen und den Spaß beim Aufbauen von diversen Regalen; Markus danke ich dafür, dass ich ihn immer wieder in Beschlag nehmen durfte, auch wenn dadurch seine Freizeit mit Sohn Felix kürzer ausfiel.

Birte – einfach DANKE! für alles.

Patrick danke ich für die anfängliche Konditionierung auf 14.30 Uhr dank Unmengen an Kaffee sowie wunderschöne Stunden mit ihm, seinen Humor und scheinbar nie endende Geduld.

Meiner Familie möchte ich auf diesem Weg einmal mehr danken, dass sie mich immer – auch in schwierigen Zeiten – unterstützt hat.

Abkürzungen

3-AT	3-Amino-1,2,4-triazol
Aa	Aminoacylreste
AA/BA	Acrylamid / Bisacrylamid
Abb.	Abbildung
AD	DNA-Aktivierungsdomäne (engl.: <i>activation domain</i>)
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid
al.	andere (lat.: <i>alii</i>)
AK(s)	Adenylatkinase(n)
AMV-RT	Reverse Transkriptase des Vogel-Myeloblastose-Virus (engl.: <i>avian myeloblastosis virus</i>)
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
AP	Alkalische Phosphatase
APK	astrogliareiche Primärkultur(en)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AQP	Aquaporin
BD	DNA-Bindungsdomäne (engl.: <i>binding domain</i>)
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: <i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise

ABKÜRZUNGEN

ca.	circa
Carb	Carbenicillin
CBP	Calmodulinbindungsprotein
cfu	koloniebildende Einheiten (engl.: <i>colony forming units</i>)
cDNA(s)	durch reverse Transkription aus mRNA entstandene DNA (engl.: <i>complementary DNA(s)</i>)
CDS	kodierender Strang (engl.: <i>coding strand</i>)
CIAP	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (engl.: <i>calf intestine alkaline phosphatase</i>)
CP	Schnittpunkt der Kurven mit dem Schwellenwert (engl.: <i>crossing point</i>)
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
Cy3	Carbocyanin 3
d	Tag(e) (lat.: <i>dies</i>)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DDO	Selektionsmedium, in dem zwei Aminosäuren fehlen (engl.: double dropout)
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E</i>	Effizienz der PCR-Reaktion
E	Extinktion
ECL	verstärkte Chemilumineszenz (engl.: <i>enhanced chemoluminescence</i>)

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (engl.: <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
EGFP	verstärkt grün fluoreszierendes Protein(engl.: <i>enhanced green fluorescent protein</i>)
ELISA	Enzymtest (engl.: enzyme-linked immunosorbent assay)
EPK(s)	ependymreiche Primärkultur(en)
EST	engl.: <i>expressed sequence tag</i>
EtOH	Ethanol
FCS	fötale Kälberserum (engl.: <i>fetal calf serum</i>)
g	Erdbeschleunigung (9.81 m/s ²)
GFAP	gliales fibrilläres saures Protein (engl.: <i>glial fibrillary acidic protein</i>)
GFP	grün fluoreszierendes Protein (engl.: <i>green fluorescent protein</i>)
GP BB	Gehirnisofom der Glycogenphosphorylase
H ₂ O _{dd}	doppelt deionisiertes Wasser
H ₂ O _{dd,a}	doppelt deionisiertes Wasser, autoklaviert
HBS	HEPES-gepufferte physiologische Kochsalzlösung (engl.: <i>HEPES buffered saline</i>)
HBSS	Hank's balanced salt solution
HEK-Zellen	Nierenzellen aus menschlichen Embryos (engl.: <i>human embryonic kidney cells, HEK cells</i>)
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IFT	Intraflagellärer Transport
IgG	Immunglobulin G
Kan	Kanamycin
LB	Lysogeniemedium (engl.: <i>Lysogeny broth</i>)
LiAc	Lithiumacetatlösung

ABKÜRZUNGEN

mcKLH	Hämocyanin aus gezüchteten Schlüssellockschnecken (<i>Megathura crenulata</i>) (engl.: <i>mariculture keyhole limpet hemocyanin</i>)
MEM	Minimalmedium (engl.: <i>minimal essential medium</i>)
MeOH	Methanol
NC	Nitrocellulose
NCBI	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA
NP	Natriuretisches Peptid
ORF	offener Leserahmen (engl.: <i>open reading frame</i>)
P / S	Penicillin / Streptomycin
pAK7	mutmaßliche Adenylatkinase 7 (engl.: <i>putative adenylate kinase 7</i>)
PBS	phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung (engl.: <i>phosphate buffered saline</i>)
PCD	Primäre Ciliäre Dyskinesie
PEG	Polyethylenglycol
PFA	Paraformaldehyd
PIS	Präimmunserum
p-NPP	p-Nitrophenylphosphat
POD	Peroxidase
QDO	Selektionsmedium, in dem vier Aminosäuren fehlen (engl.: <i>quadruple dropout</i>)
RT	Raumtemperatur Reverse Transkriptase Reverse Transkription
SCO	Subcomissuralorgan

SD-Medium	definiertes Selektionsmedium für Hefen (engl.: <i>selective dropout</i>)
SD/-Trp	Selektionsmedium ohne Tryptophan
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gel- elektrophorese
sog.	sogenannt/-e/-es
Spag6	Spermienassoziiertes Antigen 6
SSH	Subtraktive Suppressionshybridisierung
Ssp	Spatelspitze
Sulfo-SMCC	Sulfosuccinimidyl-4-[N-maleimido- methyl]cyclohexan-1-carboxylat
SVZ	subventriculäre Zone
TAE	Tris-Acetat-Ethylendiamintetraacetat- Puffer
TAP	“Tandem“-Affinitätsreinigung (engl.: <i>tan- dem affinity purification</i>)
TCA	Trichloressigsäure (engl.: <i>trichloro acetic acid</i>)
TDO	Selektionsmedium, in dem drei Aminosäuren fehlen (engl.: <i>triple dropout</i>)
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TEV	Tabakäzvirus (engl.: <i>tobacco etch virus</i>)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheit der Enzymaktivität (engl.: <i>unit</i>)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	nicht translatierter Bereich (engl.: <i>untransla- ted region</i>)

ABKÜRZUNGEN

w/v	Gewicht pro Volumen (engl.: <i>weight per volume</i>)
YPDA	mit Adenin ergänztes Medium, das Hefeextrakt, Pepton und Dextrose enthält (engl.: Y east E xtract, P eptone, D extrose, A denine)
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Liquorsystem	1
1.2	Ependym	2
1.2.1	Tanycyten	3
1.2.2	“Normale“ Ependymzellen	3
1.3	Cilien	4
1.3.1	Aufbau und Funktion	4
1.3.2	Einbindung von Cilien in physiologische Prozesse und Krankheitsbilder	5
1.4	Subcommissuralorgan	7
1.5	Funktion der Ependymzellen	8
1.5.1	Beteiligung des Ependyms am cerebralen Energiemetabolismus	8
1.5.2	Beteiligung des Ependyms an der Neuronenbildung	9
1.5.3	Beteiligung des Ependyms an der Osmoregulation und am Wasserhaushalt des Gehirns	9
1.6	Subtraktive cDNA-Bibliotheken	10
1.7	Adenylatkinasen	13
1.8	Interaktionspartner	14
1.9	Ziel dieser Arbeit	20
2	Ergebnisse	21
2.1	Identifizierung ependymspezifischer Transkripte	21
2.2	Bioinformatische Charakterisierung von pAK7	22
2.2.1	Analyse der Primär- und Sekundärstruktur von pAK7	22
2.3	Transkriptionsprofil	26
2.3.1	Konventionelle PCR	26
2.3.2	Quantitative (“Real-time“-) PCR	26
2.4	Antiserum gegen pAK7	31

INHALTSVERZEICHNIS

2.4.1	ELISA	31
2.4.2	“Western blot“	33
2.5	Expression von pAK7 in Geweben und Zellkulturen	34
2.5.1	Reinigung des pAK7-Antiserums	34
2.5.2	Analyse von Rattengeweben und Zellkulturen	34
2.5.3	Analyse von Zellkulturen und Rattenhoden zu unterschiedlichen Zeitpunkten	34
2.6	Transkriptionskinetik	37
2.7	Immunhisto- und Immuncytochemie	42
2.7.1	Immunfluoreszenzanfärbung von Zellkulturen	44
2.7.1.1	Immunfluoreszenzanfärbung von Ependymprimärkulturen (EPK)	44
2.7.1.2	Immunfluoreszenzdoppelanfärbungen von EPK und APK mit Antikörpern gegen pAK7 und α -Tubulin	44
2.7.1.3	Immunfluoreszenzdoppelanfärbungen von EPK mit An- tikörpern gegen pAK7 und die Gehirnisoform der Glyco- genphosphorylase	47
2.7.1.4	Immunfluoreszenzdoppelanfärbungen von APK mit An- tikörpern gegen pAK7 und GFAP	48
2.7.2	Immunfluoreszenzanfärbungen von Gewebeschnitten	48
2.7.2.1	Expression der pAK7 in Rattenhoden und -hirnen	48
2.7.2.2	Immunfluoreszenzdoppelanfärbungen der pAK7 und der Gehirnisoform der Glycogenphosphorylase (GP BB) in adul- ten Rattengehirnen	50
2.7.2.3	Immunfluoreszenzdoppelanfärbungen der pAK7 und des α -Tubulins in Gehirnen embryonaler und neugeborener Ratten	52
2.8	Adenylatkinase-Test	55
2.9	Hefe-Zwei-Hybrid-System	60
3	Diskussion	63
3.1	Subtraktive cDNA-Bibliotheken	63
3.2	pAK7 und Kinocilien	64
3.3	Kolokalisation von pAK7 mit GP BB	66
3.4	Interaktionspartner	66
3.5	Vergleich mit anderen Adenylatkinasen	68
3.6	Mögliche Funktion von pAK7	71

3.7	Ausblick	71
4	Materialien und Methoden	73
4.1	Materialien	73
4.1.1	Geräte	73
4.1.2	Verbrauchsmaterialien	76
4.1.3	Chemikalien	77
4.1.4	Zusammenstellung kommerzieller Chemikalien (“Kits“)	79
4.1.5	Reagenzien für die Molekularbiologie	81
4.1.6	Enzyme für die Molekularbiologie	82
4.1.7	Reagenzien für die Kultivierung von Bakterien und Säugerzellen	83
4.1.8	Antigenes Peptid	84
4.1.9	Antikörper	85
4.1.9.1	Primäre Antikörper	85
4.1.9.2	Sekundäre Antikörper	86
4.1.10	Verwendete Mikroorganismen	87
4.1.10.1	Bakterienstämme	87
4.1.10.2	Hefestämme	87
4.1.11	Säugerzellen	87
4.1.12	Tiere	87
4.1.13	Vektoren	88
4.2	Methoden	89
4.2.1	Zellkultur	89
4.2.1.1	Medien und Lösungen für die Zellkultur	89
4.2.1.2	Ependymreiche Primärkulturen (EPK)	89
4.2.1.3	Astrogliareiche Primärkulturen (APK)	90
4.2.1.4	HEK293T-Zellen und daraus hergestellte Zelllinien	91
4.2.2	Sammeln von Rattenorganen und -zellen	91
4.2.2.1	Sammeln von Rattenorganen zur Isolierung von RNA und zur Herstellung von Proteinhomogenaten	91
4.2.2.2	Sammeln von Zellen aus Kulturschalen	92
4.2.3	Fixation von Rattenorganen und Zellen für die spätere Verwendung in Immunofluoreszenzanfärbungen	92
4.2.3.1	Fixation von Rattenorganen	92
4.2.3.2	Fixation von Zellen in Kulturschalen	92
4.2.4	Herstellung von Homogenaten	93
4.2.4.1	Herstellung aus Rattenorganen	93

4.2.4.2	Herstellung aus Zellkulturen	93
4.2.5	Herstellung von Cryostatschnitten	93
4.2.6	Subtraktive cDNA-Bibliotheken aus Ependym	94
4.2.6.1	Herstellung subtraktiver cDNA-Bibliotheken aus ventri- kulärem Ependym und Rinder-Subcommissuralorgan . . .	94
4.2.6.2	Durchforstung der ependymalen subtraktiven cDNA-Biblio- thek	94
4.2.7	Weitere molekularbiologische Methoden	95
4.2.7.1	Herstellung von Flüssignährmedien für Bakterien	95
4.2.7.2	Herstellung von Agarplatten für Bakterien	95
4.2.7.3	Anzucht von Bakterien als Flüssigkultur	96
4.2.7.4	Präparation von Plasmid-DNA hoher Qualität im kleinen Maßstab aus Bakterien	96
4.2.7.5	Präparation von Plasmid-DNA geringer Qualität zu Kon- trollzwecken	97
4.2.7.6	Anlegen bakterieller Dauerkulturen (Glyceroldauerkultu- ren); Rekultivierung	97
4.2.7.7	Herstellung flüssiger Nährmedien für Hefen	98
4.2.7.8	Herstellung von Agarplatten für Hefen	99
4.2.7.9	Austitrieren von SD/-His/-Leu/-Ade-Platten für Hefever- paarungen mit 3-AT	99
4.2.7.10	Anzucht von Hefen als Flüssigkultur	100
4.2.7.11	Präparation der Plasmid-DNA aus Hefen	100
4.2.7.12	Anlegen von Hefe-Dauerkulturen (Glyceroldauerkulturen)	101
4.2.7.13	Photometrische Bestimmung der Nucleinsäurekonzentration	101
4.2.7.14	Klonierung des pAK7-PCR-Produkts in das Köderplasmid pLP-GBKT7	103
4.2.7.15	Klonierung des pAK7-PCR-Produkts mit Hilfe eines “Fluo- reszenzvektors“	105
4.2.7.16	Klonierung der pAK7-Teilstücke in das Köderplasmid pLP- GBKT7	106
4.2.7.17	Klonierung des pAK7-PCR-Produkts in den lentiviralen Vektor pWPXL	107
4.2.7.18	Klonierung des AK1-PCR-Produkts in den lentiviralen Vek- tor pWPXL	108
4.2.7.19	Verdau von DNA mit Restriktionsendonucleasen	110

4.2.7.20	Phenol-/ Chloroform-/ Isoamylalkohol-Extraktion verdau-	
	ter Vektoren mit anschließender Ethanolpräzipitation . . .	111
4.2.7.21	Dephosphorylierung von Vektor-DNA	111
4.2.7.22	Agarosegelelektrophorese	112
4.2.7.23	DNA-Extraktion aus präparativen Agarosegelen	112
4.2.7.24	Ligation von Vektor und PCR-Produkt	113
4.2.7.25	Herstellung kompetenter E.coli DH5 α -Zellen	113
4.2.7.26	Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA	114
4.2.7.27	Transformation von Hefen mit Plasmid-DNA	115
4.2.8	Bioinformatische Programme	117
4.2.9	Reverse Transkriptase-Reaktion	117
4.2.10	RT-PCR zur Analyse des pAK7-Transkriptionsprofils	117
4.2.11	Quantitative (“Real-time“) PCR	118
4.2.12	Herstellung des pAK7-Peptid-Antikörpers	120
4.2.13	Affinitäts-Reinigung des pAK7-Antikörpers	120
4.2.14	ELISA	121
4.2.15	Proteinbestimmung	122
4.2.16	Diskontinuierliche SDS-PAGE	122
4.2.17	Herstellung von Hefenhomogenaten	123
4.2.18	Färbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Blau	124
4.2.19	“Western blot“	124
4.2.19.1	Proteintransfer	124
4.2.19.2	Detektion der pAK7-Proteinbanden mit pAK7-Antiserum	126
4.2.19.3	Detektion der pAK7-Teilstücke als Bindedomänen (BD)- Fusionsproteine mit BD-Antikörper und POD	127
4.2.20	Virale Transfektion von HEK293T-Zellen	127
4.2.21	Immunfluoreszenz-Färbungen mit pAK7-Antiserum	129
4.2.21.1	Anfärbung von Rattengeweben	129
4.2.21.2	Anfärbung von EPK, APK und HEK293T-Zellen	130
4.2.22	Suche nach Interaktionspartnern mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid- Systems	131
4.2.22.1	Test auf Toxizität des pAK7-Proteins	131
4.2.22.2	Test auf Autoaktivierung	131
4.2.22.3	Test auf Proteinexpression	131
4.2.22.4	Verpaarung der Hefen	132
4.2.22.5	Titrieren der cDNA-Bibliothek	132
4.2.22.6	Bestimmung der Gesamtzahl untersuchter diploider Klone	133

INHALTSVERZEICHNIS

4.2.22.7	Bestimmung der Paarungseffizienz	133
4.2.22.8	<i>ADE2</i> - und <i>HIS3</i> -Aktivierung: Bestätigung des Phänotyps	134
4.2.22.9	<i>lacZ</i> -Aktivierung: X- β -Gal-Filtertest	134
4.2.22.10	<i>MEL1</i> -Aktivierung: X-alpha-Gal-Test	134
4.2.22.11	PCR zum Nachweis von pLP-GBKT7 und pACT2 in den diploiden Zellen	135
4.2.22.12	Isolierung und Sequenzierung der Bibliotheks-Plasmide . .	136
4.2.22.13	Rücktransformation zur Bestätigung der Interaktion in Hefe	136
4.2.22.14	Bioinformatische Analyse der sequenzierten Klone	137
4.2.22.15	PCR zur Analyse der Transkription	137
4.2.23	Adenylatkinase-Test	139
5	Literaturverzeichnis	141
6	Zusammenfassung	155

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Das Liquorsystem des Gehirns

Das Gehirn von Säugetieren läßt sich in Stamm-, Mittel-, Klein-, Zwischen- und Großhirn unterteilen und ist von allen Seiten von Cerebrospinalflüssigkeit (CSF), auch *Liquor cerebrospinalis*, umgeben. Die mit CSF ausgefüllten Räume lassen sich in den inneren und äußeren Liquorraum einteilen. Der äußere Liquorraum wird nach außen von der *Arachnoidea* und nach innen von der *Pia mater* begrenzt. Der innere Liquorraum besteht aus dem ventrikulären System, das überall vom Parenchym des Zentralnervensystems umgeben ist und in vier Bereiche gegliedert werden kann.

Im Bereich des Rautenhirns (*Pons* und *Medulla oblongata*) liegt der vierte Ventrikel, von dem ausgehend einerseits der äußere Liquorraum über die *Foramina Luschka* und *Magendie*, andererseits der im Zwischenhirn lokalisierte dritte Ventrikel über den *Aqueductus cerebri* (auch *Aqueductus Sylvii*) erreicht wird. An den beiden Seitenwänden des dritten Ventrikels findet sich je ein Durchgang, das sogenannte *Foramen interventriculare* zum ersten bzw. zum zweiten Ventrikel. Diese Ventrikel, die auch Seitenventrikel oder laterale Ventrikel genannt werden, liegen halbkreisförmig in den beiden Endhirnhemisphären; ihr Volumen macht den größten Teil des ventrikulären Systems aus.

Von den lateralen Ventrikeln aus fließt die CSF über den dritten zum vierten Ventrikel. In der Region des vierten Ventrikels gelangt sie über die mediane (*Foramen Magendie*) und seitliche (*Foramen Luschka*) Apertur in den äußeren Liquorraum, von wo aus sie schließlich z.T. über die Arachnoidalzotten, z.T. auch über die Abgänge der Spinalnerven, in die venösen Blutgefäße des Subarachnoidalraumes abfließt (Kahle *et al.*, 1990).

CSF wird in allen vier Ventrikeln durch *Plexus choroidei* genannte Organe produziert (Nicholson, 1999). Die einzelnen *Plexus*, die choroidales Epithel, Blutgefäße und interstitielles Bindegewebe einschließen, entstehen durch blattartige Einstülpungen der *Pia mater* in die ventrikulären Höhlen (Fishman, 1992). Die Kapillaren der *Plexus choroidei* sind fenestriert (Segal, 1993) und im Gegensatz zur Mehrheit der cerebralen Gefäße von polaren Molekülen passierbar. Die *Plexus choroidei* sind an ihrer Außenseite mit einer Epithelschicht aus spezialisierten Ependymzellen bedeckt, die in die Ependymschicht der Ventrikel übergehen. Die *Plexus*-Ependymzellen bilden mittels *Zonulae occludentes* die Blut–CSF–Schranke der *Plexus choroidei* (Del Bigio, 1995; Segal, 2000). Die dortigen Ependymzellen sezernieren die CSF und haben sich an ihre Transportfunktion angepasst, indem sie Mikrovilli und Cilien an der dem CSF zugewandten Seite tragen. Hingegen sind auf der CSF-abgewandten Seite in den Zellen und in den Verzahnungen mit dem übrigen *Plexus choroideus*-Gewebe Mitochondrien im Überfluss vorhanden.

Der CSF werden mehrere Funktionen zugeschrieben. Beispielsweise soll sie Metaboliten und Neurotransmitter sammeln und dem Entsorgungsweg zuführen (Segal, 1993), aber auch als Nährstoffquelle (Johansson, 1999) oder mechanischer Puffer dienen. Ein Vergleich mit dem Blut macht deutlich, dass die CSF nicht lediglich ein Ultrafiltrat des Plasmas darstellt (Fishman, 1992), sondern ein sezerniertes Produkt ist. In ihr liegen einige Substanzen in geringeren, andere wiederum in höheren Konzentrationen als im Plasma vor. Die CSF schafft ein eigenes, gleichbleibendes Umfeld (Homöostase) für die Zellen des Gehirns, wodurch dieses vor starken, z. B. metabolisch bedingten, Schwankungen der Konzentrationen von Aminosäuren, Ionen oder Peptiden im restlichen Körper geschützt wird.

1.2 Das Ependym

Bei Säugern, Reptilien und Vögeln werden die Ventrikel des Gehirns und der Zentralkanal des Rückenmarks von einem durchgehend einschichtigen, überwiegend Kinocilien tragenden Epithel aus besonderen Gliazellen ausgekleidet (zusammengefasst bei Del Bigio, 1995; García-Verdugo *et al.*, 2002). Dieses sogenannte Ependym besteht aus mehreren unterschiedlichen Zelltypen (Kettenmann und Ransom, 2005). Hier sollen die Tanycyten und “normalen“ Ependymzellen beschrieben werden, die sich sowohl morphologisch als auch enzymatisch voneinander unterscheiden (Schachenmayr, 1967).

1.2.1 Tanycyten

Tanycyten sind im ZNS niederer Vertebraten der vorherrschende Makroglia-Zelltyp (Kettenmann und Ransom, 2005). Sie entstehen zu einem unbekanntem Zeitpunkt aus Radialgliazellen. Das Vorkommen von Tanycyten ist auf Hirnabschnitte beschränkt, in denen eher dünnes Gewebe vorliegt. Dazu gehören z. B. die Bereiche der Ventrikel, der Hypophysenstamm und die Raphe-Region der *Medulla oblongata*. Sie gelten als funktionell und differentiell spezialisierte Form der Ependymzellen (Bruni, 1998; Cameron und Rakic, 1991; Reichenbach, 1989). Die von Horstmann (1954) erstmals als Tanycyten benannten Zellen tragen keine Cilien, haben aber im Gegensatz zum vorherrschenden "normalen" Zelltyp des Ependyms einen einzelnen, langen und unverzweigten Fortsatz, der an der Basis des Zellkörpers entspringt. Einige Tanycyten sind möglicherweise darauf spezialisiert, Signalmoleküle oder das Material für den Reissnerschen Faden zu sezernieren (Reichenbach und Robinson, 1995). Die Differenzierung der Tanycyten im dritten Ventrikel der Ratte beginnt an Tag 19 im Fötus und dauert bis Tag 21 (Bitsch und Schiebler, 1979; Mitro und Schiebler, 1972) oder Tag 34 (Schachenmayr, 1967) nach der Geburt.

1.2.2 "Normale" Ependymzellen

Die kubischen bis palisadenförmigen Ependymzellen besitzen an ihrer apikalen Seite als markantestes Merkmal meist Bündel aus 40-70 Kinocilien (Bleier, 1971; Millhouse, 1971). Die einzelnen Kinocilien sind bis zu 8 μm lang (O'Callaghan *et al.*, 1999), ragen in die Ventrikelhöhle und schlagen koordiniert mit einer Frequenz von ungefähr 40 Hz (Hirst *et al.*, 2000). Dadurch können Fremdkörper abtransportiert (Yamadori und Nara, 1979; Scott *et al.*, 1974) und umgebende CSF verwirbelt werden, was sich auf einen metabolischen Austausch zwischen CSF und Ependym positiv auswirken kann (Roth *et al.*, 1985). Das Ausbleiben des Kinocilienschlags kann zur Bildung eines Hydrocephalus beitragen (z. B. Ibañez-Tallon *et al.*, 2004).

Neben Kinocilien finden sich Mikrovilli auf der apikalen Seite der Ependymzellen. Auf der Oberfläche dieser durch Aktin-Mikrofilamente unterstützten Membranausstülpungen zeigt sich eine Glycocalyx-Struktur. Als deren Baustein fungiert u. a. Sialinsäure; ferner lassen sich Poly-N-lactosamin und D-Galaktose nachweisen. Ependymzellen tragen verschiedenste Rezeptoren, z.B. für Oxytocin, Adenosin oder Serotonin (5-HT). Außerdem lässt sich eine Reihe von Enzymen zum Abbau, zur Aktivierung oder zur Synthese neuroaktiver Substanzen nachweisen, wie z.B. Aminopeptidase N, Enkephalinase bzw. γ -Glutamyltransferase und Gewebekallikrein (siehe Del Bigio, 1995). Entgegen früherer Annahmen, Ependymzellen fungierten als neuronale Stammzellen (Johansson *et al.*,

1999), weiß man heute, dass sich Ependymzellen aus radialen Gliazellen entwickeln und sich nach ihrer Differenzierung nicht mehr teilen (Spassky *et al.*, 2005). Daher ist die Ependymschicht des Säugerhirns z. B. unfähig zur Regeneration nach Verletzungen (Sarnat, 1995). Ependymzellen bilden sich bei Ratten bereits im Embryonalstadium, hauptsächlich zwischen Tag 14 und 16 nach der Befruchtung. Sie beginnen während der ersten Woche nach der Geburt zu reifen und ependymale Cilien auszubilden, beginnend im Bereich des Aquädukts (Banizs *et al.*, 2005; Hirschner *et al.*, 2007).

1.3 Cilien

1.3.1 Aufbau und Funktion

Cilien sind ubiquitäre, zum Teil bewegliche Organellen von Eukaryonten. Es handelt sich bei ihnen um Ausstülpungen der apikalen Plasmamembran, die von einem komplexen, als Axonem bezeichneten Cytoskelettelement unterstützt werden. *Cilium* ist das lateinische Wort für Lid oder Wimper, wodurch das Aussehen dieser Zellfortsätze am treffendsten beschrieben wird. Die Grundstruktur der Cilien blieb im Lauf der Evolution recht unverändert. Zu ihrer Entstehung gibt es mehrere Theorien. Es wird jedoch immer angenommen, dass Cilien sehr früh in der Evolution aufgetreten sind. Die Endosymbionten-Theorie versucht, das Vorhandensein von Cilien in Zellen durch den Einschluss von Spirochäten-Bakterien und Bildung einer symbiotischen Lebensgemeinschaft zu erklären (Margulis und Bermudes, 1985). Anders hingegen lautet die Hypothese von Cavalier-Smith (2002), die eine Entwicklung der Cilien aus dem Cytoskelett im Rahmen der zellulären Spezialisierung postuliert.

Bei allen Cilien ist der Grundaufbau gleich. Sie entspringen einem Basalkörper, der dem Centriol homolog ist. An den Basalkörper schließt sich das Axonem an (Wehner und Gehring, 1995). Bei Betrachtung der Ultrastruktur des Querschnitts eines Ciliums läßt sich morphologisch zwischen "9+2"- und "9+0"-Axonemstrukturen unterscheiden. Beide Formen weisen 9 äußere Mikrotubulidubletten (je ein A- und B-Tubulus aus 13 bzw. 10-11 Protofilamenten) auf. Die 9+2-Variante besitzt jedoch noch ein zusätzliches inneres Paar Mikrotubuli (C1- und C2-Tubulus aus je 13 Protofilamenten), das von der Zentralscheide eingehüllt ist. Die äußeren Mikrotubuli sind untereinander mit Nexinbrücken verbunden, die jeweils von einem A- an den nachbarlichen B-Tubulus reichen. Zusätzlich tragen die A-Tubuli der 9 Außendubletts sowohl bei den 9+2- als auch den 9+0-Kinocilien je zwei Reihen Dyneinarme, die in Richtung des B-Tubulus des jeweils benachbarten Dubletts weisen und als molekulare Motoren fungieren. Insgesamt bestehen die Cilien von Säuge-

tieren aus mehr als 200 Proteinen (Ibañez-Tallon *et al.*, 2003).

Cilien werden grundsätzlich in bewegliche Kinocilien und unbewegliche primäre Cilien, die auch sensorische Cilien genannt werden, eingeteilt. Hierbei werden traditionell die 9+2-Cilien der ersten, die 9+0-Cilien der zweiten Gruppe zugeordnet. Tatsächlich erscheint eine Einteilung in 4 Subgruppen jedoch sinnvoller, wobei dann gruppiert werden sollte in bewegliche 9+2- (z. B. im Ependym oder den Atemwegen) oder 9+0-Cilien (z. B. nodale Cilien) oder in unbewegliche, sensorische 9+2- (z. B. im Gleichgewichtsorgan) bzw. 9+0-Cilien (z. B. die Monocilien der Niere) (Ibañez-Tallon *et al.*, 2003). Man geht davon aus, dass die Ciliogenese unabhängig vom Subtyp in vier Phasen erfolgt. In Phase 1 wird das Centriol gebildet, welches in Phase 2 zur apikalen Oberfläche der Zelle wandert und sich danach in Phase 3 als sogenannter Basalkörper über den basalen Fuß in der apikalen Membran und im Cytoplasma verankert. Das Axonem wird in Phase 4 gebildet (Brody *et al.*, 2000). Mitosehemmer wie Colchicin und Nocodazol hemmen in frühen Entwicklungsphasen der Zelle die Zusammenlagerung der Mikrotubuli des Centriols, woraufhin sich die Vorläuferstrukturen in der Zelle anhäufen (Dirksen, 1991). Bei ausdifferenzierten Zellen kann Metavanadat den Schlag der Cilien blockieren (Nakamura und Sato, 1993), welcher durch ein Verschieben der axonemalen Mikrotubuli gegeneinander entsteht. Die hierzu erforderliche Energie wird durch die ATPase-Aktivität der "heavy chain" (HC)-Moleküle in den Dyneinarmen geliefert.

1.3.2 Einbindung von Cilien in physiologische Prozesse und Krankheitsbilder

Ein bekannter, mit Cilien assoziierter Krankheitskomplex ist das Bardet-Biedl-Syndrom (BBS), hervorgerufen durch Mutationen in bis dato 12 identifizierten Genen (Badano *et al.*, 2003; Blacque und Leroux, 2006). Das BBS geht mit einer Fehlfunktion des Basalkörpers und gestörtem Cilienaufbau einher (Ansley *et al.*, 2003; Beales, 2005). Die Symptome der genetisch heterogenen Erkrankung können je nach betroffenem BBS-Gen unterschiedlich ausgeprägt sein. Sie umfassen Degenerationen der Retina, Fettleibigkeit, kognitive Störungen, Nierenfehlfunktionen, Polydactylie und Fehlentwicklungen des Urogenitaltraktes. Mäuse mit mutierten BBS-Genen weisen denselben Phänotyp wie Tiere auf, bei denen die planare Zellpolarität ("planar cell polarity", PCP) gestört ist. Dies wird erkennbar an offenen Augenlidern, zerstörten Stereocilienbündeln in der Innenohrschnecke und Neuralrohrdefekten (Ross *et al.*, 2005). Es ist bekannt, dass die Brechung der Körpersymmetrie während der Embryogenese durch die Funktionalität der 9+0-Kinocilien auf den Nodalzellen bedingt wird (Afzelius, 1999). Auch für die Bildung morphologisch

korrekter Stereocilienbündel während der Entwicklung der Innenohrschnecke sind funktionale Kinocilien erforderlich (Frolenkov *et al.*, 2004). Die zu den humanen BBS-Genen homologen *C. elegans*-Gene, *bbs1*, *bbs2*, *bbs7* und *bbs8* werden nur in Zellen exprimiert, die Cilien besitzen. Das Fehlen von BBS-7- und BBS-8-Protein führt zu ciliären Defekten und einem eingeschränkten intraflagellären Transport (IFT) (Blacque *et al.*, 2004), der zum Aufbau eukaryontischer Cilien unabdingbar ist (Rosenbaum und Witman, 2002). BBS4 spielt eine Rolle bei der Organisation von Mikrotubuli (Kim *et al.*, 2004). Daher weisen *Bbs4*-“Knockout“-Mäuse schwanzlose Spermien auf. Die primäre Funktion der BBS-Proteine scheint bei der Vermittlung oder Regulation des intrazellulären Transports von Mikrotubuli oder anderen Axonembestandteilen zu liegen.

Nicht nur die Proteine, die von den oben beschriebenen Genen des BBS-Komplexes codiert werden, sondern auch viele andere im Basalkörper, Cilium oder Flagellum lokalisierte Proteine sind mit genetischen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht worden. Mit Hilfe von Modellorganismen wie *Chlamydomonas reinhardtii* und *C. elegans*, sowie Mausmodellen und Zellkultursystemen konnten einige in dieser Hinsicht wichtige ciliäre Proteine identifiziert werden. Cilien werden von nahezu allen Zellen im Säugerorganismus gebildet. Die mit ihrer Fehlfunktion verbundenen Krankheitssymptome sind daher sehr vielseitig und reichen von cystischen Erkrankungen der Niere über Erkrankungen des Pankreas bis hin zur fehlerhaften Ausbildung der Körpersymmetrieachse z. B. bei *situs inversus* (Davenport und Yoder, 2005; Afzelius, 1999 und 2004).

Da Cilien durch den IFT aufgebaut werden (Rosenbaum und Whitman, 2002), führen Defekte der daran beteiligten Proteine ebenfalls zu Krankheitsymptomen. Durch den kontinuierlichen Schlag beweglicher Cilien kann die CSF im Ventrikelsystem, Schleim im Respirationstrakt und die Zygote oder Oocyte im Eileiter transportiert werden. Dementsprechend kann eine Fehlfunktion der Kinocilien zu chronischer Sinusitis und Lungenerkrankungen, Hydrocephalus oder Sterilität führen. Zu den Proteinen, deren Fehlen zumindest einen Teil dieser Symptome auslöst, gehören DNA-Polymerase λ (Kobayashi, 2002), Spermien-assoziiertes Antigen 6 (Spag6) (Sapiro *et al.*, 2002), Regulatorischer Faktor X 3 (RFX3) (Baas *et al.*, 2006) oder das vom murinen “dynein heavy chain“(mdnah5)-Gen codierte Axonemprotein (Ibañez-Tallon *et al.*, 2004). Mäuse ohne DNA-Polymerase λ entwickeln eine chronische Sinusitis und auf die lateralen Ventrikel beschränkten Hydrocephalus. Die männlichen Tiere haben unbewegliche Spermien, was zur Sterilität führt. Spag6-“knockout“-Mäuse weisen auch einen ausgeprägten Hydrocephalus auf und sind aufgrund schlecht beweglicher Spermien ebenfalls steril. Bei Mäusen, die kein *rfx3* exprimieren können, findet sich neben Hydrocephalus zusätzlich ein abnormal differenziertes

Ependym. Bei *Mdnah5*-defizienten Mäusen ist der Fluss der CSF durch das Aquädukt insuffizient, wodurch die Bildung von Hydrocephalus initiiert wird.

Ein weiteres Krankheitsbild, das durch die Fehl- oder Nicht-Funktion von Cilien bedingt ist, stellt das Kartagenersyndrom dar. Diese komplexe Erkrankung wurde 1981 von M. A. Sleight in Primäre Ciliäre Dyskinesie (PCD) umbenannt. Auch als Unbewegliche-Cilien-Syndrom ("Immotile Cilia Syndrome", ICS) bekannt, tritt die Krankheit bei Störung der Cilienstruktur auf, wie sie beispielweise durch den Mangel eines am Cilienaufbau beteiligten Proteins (Ibañez-Tallon *et. al.*, 2003) verursacht werden kann. Die Cilien der oberen und unteren Atemwege sind für die Reinigung der Atemwege verantwortlich. Sind die Cilien jedoch unbeweglich, schlagen zu wenig, zu unkoordiniert oder fehlen, manifestiert sich dies in sehr unterschiedlichen Symptomen wie z. B. chronischem Schnupfen, chronischer Bronchitis oder Mittelohrentzündung, die durch eine verringerte Schleimbe-seitigung zu erklären sind. Die ständige Belastung der Bronchien durch Schleim und die dadurch begünstigte Sekundärinfektionen führen häufig zu einer krankhaften Erweiterung der bronchialen Luftwege, sogenannten Bronchiektasen. Da durch eine PCD auch Cilien in den Reproduktionsorganen betroffen sind, besteht häufig männliche Sterilität aufgrund unbeweglicher Spermien und eingeschränkte Fruchtbarkeit bei Frauen, da die in den Eileitern befindlichen Kinocilien die Oocyten nicht optimal transportieren können. Wie auch bei den oben beschriebenen Ciliendefekten tritt bei der PCD als weiteres Merkmal ebenfalls gehäuft ein *Situs inversus* auf (Wood, 1997; Ramsdell und Yost, 1998).

1.4 Das Subcommissuralorgan

Das Subcommissuralorgan (SCO) ist eine phylogenetisch alte und konservierte kleine Drüse (Oksche, 1961), die unter der *Commissura epithalamica* am Eingang des *Aquaeductus Sylvii* lokalisiert ist und aus einem Komplex zylindrischer Ependymzellen besteht. Sie ist aus zwei Schichten aufgebaut, dem Ependym und dem Hypendym (Leonhardt, 1980). Aus dem SCO werden Glykoproteine in die CSF abgegeben (Nualart *et al.*, 1991), die darin zum sogenannten Reissnerschen Faden aggregieren (Sterba und Wolf, 1969). Beim Menschen ist das SCO bereits im Fötus voll entwickelt, nach der Geburt bildet es sich zurück (Oksche, 1969). Es stellt ontogenetisch eine der ersten sekretorisch aktiven Strukturen des Gehirns dar (Schoebitz *et al.*, 1986). Die physiologischen Funktionen der sezernierten Glykoproteine und des SCO sind unbekannt (Rodriguez *et al.*, 1998). In Ratten und Mäusen besteht jedoch eine hohe Korrelation zwischen der Abwesenheit des SCO und Hydrocephalus (Meiniel, 2007).

1.5 Funktion der Ependymzellen

Die Funktionen der Ependymzellen wurde bis heute noch nicht vollständig geklärt. Allerdings bestehen einige Hypothesen über ihre mögliche physiologische Aufgabe, z.B. beim Ionen- und Flüssigkeitstransport. Auch der Transport kleiner Moleküle zwischen CSF und Neuropil (Sarnat, 1995), eine Barrierefunktion zum Schutz des neuronalen Gewebes vor möglicherweise schädlichen Substanzen (Kuchler *et al.*, 1994) und sekretorische oder neuroendokrine Aktivitäten wurden in diesem Zusammenhang diskutiert. Von Knigge and Scott (1970) wurde die Hypothese aufgestellt, dass auch Tanycyten selektiv Substanzen, vor allem Neurohormone, aus der ventrikulären CSF absorbieren und die Hormone danach transzellulär in die Kapillaren des portalen *Plexus* des Hypothalamus transportieren könnten. Die Autoren stellten dies als Alternative zum tuberoinfundibulären Weg der Neurohormone durch dopaminerge Neuronen dar. Pilgrim (1978) stuft diese Hypothese als unwahrscheinlich ein, weil sie sich nur auf immuncytochemischen Nachweis von Neurohormonen in Tanycyten stützt. Nach Ansicht dieses Autors werden Neurohormone nur übergangsweise bei einem Überschuss an sezernierten Molekülen von den Tanycytenendfüßen aufgenommen. Mit sensitiveren Methoden zum Nachweis endokriner Substanzen und deren Rezeptoren konnte schließlich gezeigt werden, dass die *Plexus choroidei* eine hohe Dichte an Rezeptoren für viele neuroendokrine Substanzen wie Serotonin, Atriales Natriuretisches Peptid (ANP), IGF und Vasopressin aufweisen (Nilsson *et al.*, 1992).

1.5.1 Beteiligung des Ependyms am cerebralen Energiemetabolismus

Von allen Zellen im Zentralen Nervensystem (ZNS) enthalten Ependymzellen die höchste Menge an Glycogen (Cataldo und Broadwell, 1986; Prothmann *et al.*, 2001), und sie zeigen ein hohes Maß an Synthese und Aktivität der Gehirnisoform der Glycogenphosphorylase (Cataldo und Broadwell, 1986; Pfeiffer *et al.*, 1990). Im Ependymzellkulturmodell wird das Glycogen nach Zugabe von Serotonin oder Adrenalin abgebaut (Prothmann *et al.*, 2001). Demnach stellt Glycogen einen internen Energiespeicher dar, der bei erhöhtem Bedarf mobilisiert wird. Der Energiebedarf der Ependymzellen steigt beispielsweise durch Erhöhung der ciliären Schlagfrequenz nach Stimulation mit Serotonin (Nguyen *et al.*, 2001). Da Ependymzellen das Enzym Glukokinase und die Glucosetransporter GLUT2 und GLUT4 synthetisieren, wurde angenommen, diese Zellen spielten eine Rolle bei der Regulation des Glucosespiegels im Gehirn (Maekawa *et al.*, 2000). Experimente an Zellkulturen bestätigten in der Tat eine insulinabhängige Glucoseaufnahme in ependymalen Primärkulturen. Diese wird *in vitro* allerdings nicht durch GLUT4, sondern durch GLUT1

vermittelt. Möglicherweise ist nicht Insulin, sondern “Insulin-like Growth Factor“ 1 (IGF-1) das physiologisch relevante Regulatormolekül (Verleysdonk *et al.*, 2004).

1.5.2 Beteiligung des Ependyms an der Neuronenbildung

Die These, Ependymzellen seien neuronale Stammzellen (Johansson *et al.*, 1999), wurde mittlerweile widerlegt. Als solche Stammzellen fungieren stattdessen die in der Subventricularzone (SVZ) lokalisierten Astrocyten (Doetsch, 2003). Im adulten Gehirn können sich subventrikuläre Astrocyten im Bereich der lateralen Ventrikelwände zu Neuroblasten entwickeln (Doetsch und Alvarez-Buylla, 1996). Die Neuroblasten wandern in den weiter vorne gelegenen Teil des Gehirns, zum Riechkolben, wo sie sich schließlich zu Interneuronen differenzieren (Luskin, 1993; Lois und Alvarez-Buylla, 1994; Doetsch und Alvarez-Buylla, 1996). Die Zellen folgen hierbei der Richtung des CSF-Stroms (Sawamoto *et al.*, 2006) und einem Gradienten von Leitmolekülen, der durch das geordnete Schlagen der ependymalen Cilien erzeugt wird. Die Funktion der Ependymzellen bei der Entstehung von Neuronen könnte die Versorgung der neuronalen Vorläuferzellen mit energieliefernden Substanzen sein, wie von Verleysdonk *et al.* (2004) vorgeschlagen wurde.

1.5.3 Beteiligung des Ependyms an der Osmoregulation und am Wasserhaushalt des Gehirns

Mehrfach wurde beobachtet, dass eine Fehlfunktion des Ependyms zu Störungen des CSF-Flusses und damit unter Umständen auch zu Hydrocephalus führt (Brody *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 2002; Baas *et al.*, 2006). In Konkurrenz zur rein hydrodynamischen Erklärung dieses Phänomens postulierte Del Bigio (1995), dass das Ependym an der Regulation der Wasserhomöostase des ZNS beteiligt sein könnte. Die Expression der Wassertransportmoleküle Aquaporin (AQP) 4 (Jung *et al.*, 1994) und AQP9 (Lehmann *et al.*, 2004) auf Ependymzellen bestärkt diese Annahme. Da AQP4-“knockout“-Mäuse eine reduzierte Anfälligkeit für Hirnödeme nach ischämischen Verletzungen (z. B. Schlaganfällen) aufweisen (Papadopoulos *et al.*, 2002), konnte diesem Transporter eine Beteiligung an der Bildung cerebraler Ödeme nachgewiesen werden (Manley *et al.*, 2000). Auch die auf Ependymzellen nachgewiesenen Vasopressin- (Chen *et al.*, 1992; Rosenberg *et al.*, 1986) und Angiotensin II-Rezeptoren (Oldfield *et al.*, 1994) deuten auf die Beteiligung des Ependyms an der Wasserhomöostase und Osmoregulation hin. Andere Indizien hierfür liefern Versuche mit Natriuretischen Peptiden (NPs). *In vivo* ist Atriales Natriuretisches Peptid (ANP) in der CSF vorhanden und stammt vorwiegend aus dem anteroventralen dritten Ventrikel (Geiger *et al.*, 1989; Gundlach und Knobe, 1992). Bei obstruktivem Hydroce-

phalus sind die ANP-Werte in der CSF erhöht (Diringer *et al.*, 1990). Nach Behandlung kultivierter Ependymzellen oder Ependym *ex vivo* mit NPs steigt der Spiegel an intracellulärem 3',5'-cyclischem Guanosinmonophosphat an (Wellard *et al.*, 2003; 2006), was die Reaktionsfähigkeit des Ependyms gegenüber diesen Regulatoren bestätigt.

1.6 Subtraktive cDNA-Bibliotheken

Subtraktive cDNA-Bibliotheken enthalten cDNA-Fragmente, die mit Genen korrespondieren, welche nur in einer von zwei RNA-Quellen transkribiert werden. Eine subtraktive cDNA-Bibliothek dient also der Identifikation von Genen, die beispielsweise in einem von zwei Geweben, nicht aber im anderen vorkommen. Eine Möglichkeit zur Bibliothekserzeugung ist die Subtraktive Suppressionshybridisierung (SSH; siehe Abb. 1 nach Diatchenko *et al.*, 1996). Die dazu erforderliche cDNA wird durch reverse Transkription erhalten. Geringe Ausgangsmengen an Poly A-mRNA sind für effizientes Arbeiten ausreichend. Einzel- (ss) und doppelsträngige (ds) cDNAs müssen zur Weiterverarbeitung nicht voneinander getrennt werden (Duguid und Dinauer, 1990; Sargent und Dawid, 1983).

Zunächst wird also mRNA sowohl aus dem interessierenden Gewebe (z. B. Ependym) als auch aus einem Referenzgewebe (z. B. ependymfreies Hirngewebe) isoliert und jeweils in cDNA umgeschrieben. Der Ansatz mit cDNA aus dem interessierenden Gewebe wird halbiert. Die cDNA-Moleküle in den beiden Portionen erhalten anschließend durch Ligation an jeweils beiden Enden unterschiedliche Adaptoren für eine später folgende PCR mit dagegen gerichteten "Primern". An den cDNA-Molekülen aus dem Referenzgewebe werden keine Adaptoren angebracht. Dadurch ist deren Amplifikation während der anschließenden PCR nicht möglich.

Die beiden mit verschiedenen Adaptern versehenen cDNA-Populationen aus dem interessierenden Gewebe werden zunächst getrennt voneinander mit einem Überschuss an cDNA aus dem Referenzgewebe versetzt. Die Ansätze werden zuerst hitzedenaturiert und dann zur Hybridisierung wieder abgekühlt. Hierbei bilden sich die Spezies a-d in Abb. 1. Alle unspezifischen cDNAs, die auch unter den aus dem Referenzgewebe stammenden cDNAs vorkommen, bilden dabei adapterlose oder -arme Hybride (Spezies c und d in Abb. 1), die in den folgenden PCR-Reaktionen nicht amplifiziert werden können. Im zweiten Hybridisierungsschritt werden die beiden Ansätze der cDNA aus dem interessierenden Gewebe unter erneuter Zugabe von frisch denaturierter cDNA aus Referenzgeweben gemischt. Dadurch hybridisieren nicht nur verbliebene cDNA-Moleküle, die in beiden Geweben vorkommen. Es bildet sich außerdem eine neue Spezies cDNA-Hybride, die ausschließlich auf

cDNAs zurückgehen, die nur vom interessierenden Gewebe abstammen und an beiden Enden verschiedene Adaptoren tragen (Spezies e in Abb. 1).

Durch die anschließende zweistufige Suppressions-PCR wird eine exponentielle Amplifizierung dieser aus differenziell exprimierten Transkripten entstandenen cDNAs möglich, da nur diese die notwendigen PCR-Adapter tragen. Durch die PCR werden diese Spezies auf das über 1000fache angereichert (e in Abb. 1), die Vervielfältigung unerwünschter Sequenzen wird hingegen unterdrückt (Spezies a-d in Abb. 1).

Nach der SSH liegen alle selektiv amplifizierten Spezies in etwa der gleichen Häufigkeit im finalen Produkt vor. cDNAs spezifisch transkribierter Gene können somit im Anschluss mit gleicher Wahrscheinlichkeit kloniert werden, auch wenn sie sich in der Transkriptionseffizienz stark unterscheiden.

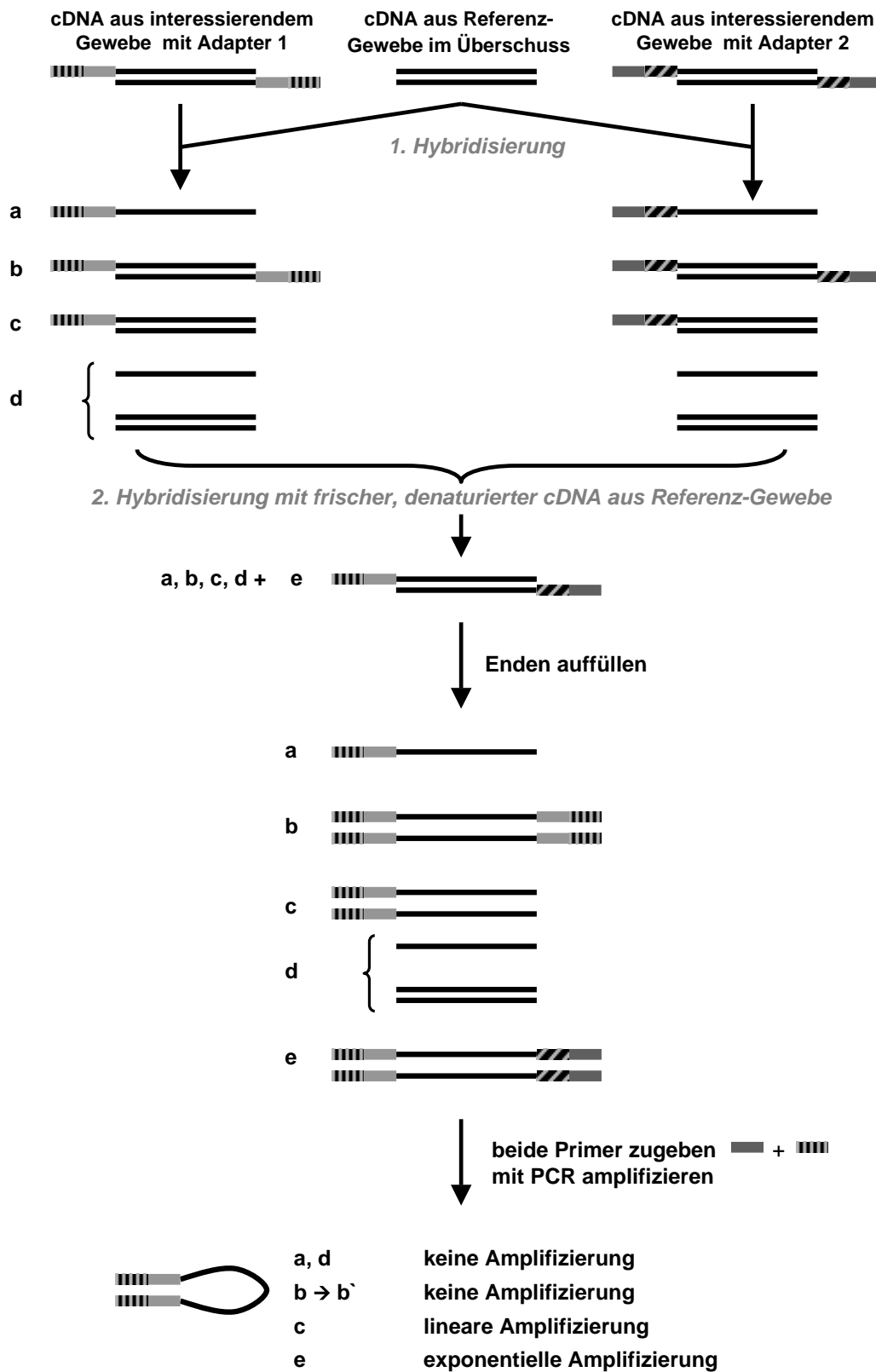


Abb. 1: Schema der Subtraktiven Suppressionshybridisierung (SSH), modifiziert nach Diatchenko *et al.*, 1999. Einzelheiten siehe Text.

1.7 Adenylatkinasen

Ein Vertreter der nach systematischer Nomenklatur als ATP:AMP Phosphotransferasen (EC 2.7.4.3) bezeichneten Enzyme wurde erstmals von Colowick und Kalckar (1943) aus Kaninchenmuskeln isoliert. Der dafür schon lange verwendete Trivialname Myokinase rührt vom Vorkommen der damals entdeckten Isoform des Enzyms in Muskelgewebe her. Der Begriff "Adenylatkinase" (AK) wurde erstmals von Colowick (1951) verwendet.

Die ubiquitären AK setzen Adeninnucleotide als Substrat um. Diese Reaktion kann generell durch das Schema $ATP + AMP \rightleftharpoons 2 ADP$ beschrieben werden. Berücksichtigt man, dass AK bei ihrer Katalysatorfunktion Mg^{2+} -Ionen benötigen, so lautet das Reaktionsschema $Mg^{2+} \cdot ATP + AMP + Mg^{2+} \rightleftharpoons 2 Mg^{2+} \cdot ADP$.

Bei Vertebraten existieren mehrere AK-Isoformen, wobei AK1 im Cytosol, AK2 im Intermembranraum von Mitochondrien und AK3 in der mitochondrialen Matrix lokalisiert ist (Noda, 1973; Khoo und Russell, 1972; Tomasselli *et al.*, 1979). Die Isoformen 1-3 sind alle globulär und haben molekulare Massen im Bereich von 21 bis 46 kDa. Ein Vergleich der drei Isoformen zeigt, dass ungefähr 30% ihrer Aminosäuren, über die gesamte Länge des jeweiligen Proteins verteilt, identisch sind (Schlauderer und Schulz, 1996). Die Expression der AK-Isoformen wird organ- (Russell *et al.*, 1974) und gewebespezifisch (Tanabe *et al.*, 1993) sowie in Abhängigkeit von der Entwicklung reguliert (Tanabe *et al.*, 1993).

AK gehören zur Familie der Nucleosidmonophosphatkinasen, zu der auch Uridin-, Cytosin-, Guanosin- und Thymidinmonophosphat-Kinasen gehören (Schlauderer und Schulz, 1996). Die Substratbindungsstellen wurden am dreidimensionalen Modell der AK aus Schweinemuskel identifiziert (Pai *et al.*, 1977). Als Reaktionsmechanismus bei AK, die aus Kaninchenmuskel isoliert wurden, wird ein "Iso-random-Bi-Bi"-Mechanismus angenommen (Sheng *et al.*, 1999). Inhibition der AK-Reaktion ist sowohl von Edukt-Seite durch AMP (bei AK aus *E. coli*: Gilles *et al.*, 1988; Sinev *et al.*, 1996) als auch auf Produkt-Seite durch ADP (AK aus humane Erythrocyten; Brownson und Spencer, 1972) möglich. AK lassen sich in Geweben mit hohem Energieumsatz finden, wie z.B. Muskeln, Gehirn und Leber (Noda, 1973). Dort ermöglichen sie die intrazelluläre Bereitstellung von Energie in Form von ATP aus 2 ADP. Als erste AK wurde die Myokinase aus Kaninchenmuskel kristallisiert und später auf ihre physikalischen Eigenschaften (Noda und Kuby, 1957) untersucht. Die humane AK6 ist die zuletzt kristallisierte AK. Sie ist im Kern lokalisiert (Ren *et al.*, 2005).

In *Chlamydomonas reinhardtii* wurde eine neuartige AK entdeckt, die an ein Protein des äußeren Dyneinarms (“outer dynein arm protein“), Oda5p, assoziiert ist (Wirschell *et al.*, 2004). Arbeiten von Donaldson *et al.* (2002) beschreiben die humane Ecto-Adenylatkinase (ecto-AK), die auf dem humanen Atemwegsepithel und gleichzeitig im Atemwegssekret nachgewiesen werden kann. Eine AK, die sowohl sezerniert wird als auch cytosolisch vorliegt, ist im Vergleich zu den meisten bisher untersuchten AK untypisch, da diese nur intrazellulär auftreten. Nach Untersuchungen von Picher und Boucher (2003) ist die ecto-AK ein Faktor zur Aufrechterhaltung der mukociliären Reinigung des Atemwegsepithels.

1.8 Nachweis von Protein–Protein Interaktionen und Ermittlung der Interaktionspartner

Um Aufschluss über die mögliche Funktion eines Proteins zu bekommen, kann es hilfreich sein, nach dessen Interaktionspartnern zu suchen. Konnten ein oder mehrere Partner mit bereits bekannter Funktion ermittelt und die Interaktion bestätigt werden, so lassen sich daraus meistens Rückschlüsse auf die Funktion des zu untersuchenden Proteins ziehen. Zur Ermittlung von Protein–Protein-Interaktionen steht eine Vielzahl verschiedener Methoden zur Auswahl. Darunter fallen das Hefe-Zwei-Hybrid-System, die Quervernetzung mit bivalenten Chemikalien (engl.: “crosslinking“), Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (engl.: “Fluorescence Resonance Energy Transfer“; FRET) und Biolumineszenz-Resonanz-Energietransfer (engl.: “Bioluminescence Resonance Energy Transfer“; BRET). Aber auch Protein-“Microarrays“, Co-Isolierung oder Co-Immunpräzipitation von Proteinkomplexen in Kombination mit massenspektrometrischen Methoden (Überblick bei Bauer und Kuster, 2003) kommen in Frage.

Nach der ersten Anwendung des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems (Fields und Song, 1989) wurden in den frühen 1990er Jahren mit dieser Methode viele Protein–Protein-Wechselwirkungen entdeckt. Darunter fallen die Interaktionen des gag-Proteins aus dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) mit Cyclophilin A und B (Luban *et al.*, 1993), des Proteins Ras mit der Serin/Threonin-Kinase Raf (Vojtek *et al.*, 1993) und des Retinoblastomproteins mit der katalytischen Untereinheit der Proteinphosphatase Typ 1 (Durfee *et al.*, 1993). Das klassische Hefe-Zwei-Hybrid-System benutzt zwei Vektoren, das Bibliotheks- und das Köderplasmid, in die jeweils cDNA-Bibliotheken oder die kodierende Sequenz (“coding sequence“; CDS) des zu untersuchenden Proteins inkloniert werden (Abb. 2). Die Vektoren

ren werden anschließend zur Transfektion von Hefen verwendet. In den Hefen werden die Plasmide abgelesen und translatiert. Dabei werden in den Zellen jeweils Fusionsproteine von Bibliotheks- und Köderprotein mit einem je nach Hefe-Zwei-Hybrid-System variierenden “Funktionsprotein“ gebildet. Die entstandenen Fusionsproteine können im Weiteren auf ihre Interaktion untersucht werden. Als “Funktionsproteine“ können beispielsweise Teile des Gal4-Proteins verwendet werden. Gal4 ist der Transkriptionsfaktor in Hefen, der durch die Aktivierung der GAL-Gene in Anwesenheit von Galaktose zur Bildung von Galaktoseabbauenzymen führt.

Bei dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten System wurden die CDS einer aus menschlichem Hoden erzeugten cDNA-Bibliothek mit der CDS der Gal4-Transkriptionsaktivator-domäne (AD) fusioniert; die CDS der pAK7 wurde in Fusion mit der Gal4-DNA-Bindedomäne (BD) exprimiert. Um die Fusionsproteine von Bibliotheks- und Köderplasmid in derselben Zelle exprimieren zu lassen und dadurch deren Interaktion zu ermöglichen, wurden zwei unterschiedliche Ansätze gewählt. Dazu wurden Hefen in einen Fall mit einer Mischung aus beiden Plasmiden co-transfiziert. Im anderen Fall wurden Hefen zweier verschiedener Paarungstypen (“mating types“) einzeln mit je einem der Plasmide transfiziert. Danach erfolgte die Vereinigung der Plasmide durch Verpaarung der Hefen dieser Stämme. Im Rahmen des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems ist eine Aktivierung der Transkription der in den Hefen vorhandenen Reportergene nur möglich, wenn AD- und BD-Fusionsprotein sich durch Wechselwirkung soweit annähern, dass gleichzeitig sowohl die BD an die jeweilige Promotorregion binden als auch die AD die Anlagerung des Transkriptionskomplexes ermöglichen kann.

Durch Anzucht der Hefen auf unterschiedlichen Selektionsmedien und optische Auswertung der gewachsenen Hefekolonien gelingt es, Zellen zu identifizieren, die Plasmide mit möglichen Interaktionspartnern enthalten. Zur optischen Auswertung werden Kolonienzahl und -größe bestimmt und die Fähigkeit zur α - und β -Galaktosidasebildung mit Hilfe X- α - und X- β -Gal-haltiger Medien und Lösungen überprüft. Anschließend werden diese Hefepasmide isoliert, um die Wechselwirkung der Proteine mittels anderer Systeme zu verifizieren. Als hybrider Transkriptionsaktivator eignet sich neben dem Gal4-Protein der LexA-Repressor aus *E.coli*. Inzwischen existieren diverse Varianten des Zwei-Hybridsystems, z.B. Zwei-Hybridssysteme in Säugerzellen (engl.: “mammalian two-hybrid“), Hefe-Ein- und Drei-Hybridssystem (engl.: “yeast one- and three-hybrid“; Luo *et al.*, 1996 bzw. SenGupta *et al.*, 1996) oder Systeme, die Proteine wie Ubiquitin (Bartel und Fields, 1997) oder TEV-Protease (TEV: engl. “tobacco etch virus“) als Reportersystem für die Proteininteraktionen nutzen. Ferner werden mit solchen Systemen nicht mehr nur Protein-

Protein-Interaktionen untersucht, sondern auch DNA-Protein- oder Protein-RNA-Interaktionen.

Eine neuere Methode zur Identifizierung von Proteininteraktionspartnern ist die Tandemaffinitätsreinigung (engl.: “tandem affinity purification“, TAP), die ebenfalls in Hefen ihren Anfang nahm (Rigaut *et al.*, 1999; Übersicht bei Puig *et al.*, 2001). Durch diese zweistufige Affinitätschromatographie können Proteinkomplexe unter nativen Bedingungen isoliert werden. Für die Durchführung einer Interaktionsstudie mittels TAP müssen die zu untersuchenden Köderproteine in N- oder C-terminaler Fusion mit einem Polypeptid, das sich aus Protein A und Calmodulinbindungsprotein (CBP) zusammensetzt, in der gewünschten Zellart synthetisiert werden (siehe Abb. 3). Zwischen Protein A- und CBP-Domäne liegt eine TEV-Schnittstelle, mit deren Hilfe das Köderprotein mit eventuell assoziierten Interaktionspartnern nach dem ersten Reinigungsschritt von der Säule abgetrennt wird.

Normalerweise werden Fusionsprotein (ProtA, TEV, CBP und Köderprotein [Kö in Abb. 4]) und zugehörige Interaktionspartner (IP in Abb. 4) zuerst mit Hilfe des Protein A-Teils über Affinitätschromatographie an immobilisiertem IgG aufgereinigt (Abb. 4, 1. und 2.). Im zweiten Schritt werden noch zurückgebliebene, unspezifische Bindungspartner (uB) und die TEV-Protease durch Affinitätschromatographie an immobilisiertem Calmodulin entfernt. Der verbliebene Komplex wird dann mit EGTA nativ von der Calmodulinmatrix eluiert (Abb. 4, 3. und 4.). Diese Reihenfolge bietet den Vorteil, dass die TEV-Protease nicht im finalen Eluat vorliegt. Allerdings ist auch eine Umkehrung der Vorgehensweise möglich, wenn im entsprechenden Fusionsprotein die Reihenfolge von Protein A und CBP vertauscht wird. Auch die Verwendung eines sog. “split TAP tag“ ist möglich. Dieser kommt zur Anwendung, wenn Interaktionen zwischen mehr als zwei Proteinen untersucht werden sollen. Hierbei werden die zwei funktionellen Hälften des TAP-Polypeptids, Protein A mit TEV-Schnittstelle und CBP, an je ein Protein eines Komplexes interagierender Proteine fusioniert. Für diese Isolierungsweise müssen dann aber mindestens zwei Proteine dieses Komplexes bekannt sein. Die affinitätschromatographische Isolierung erfolgt dann zuerst über die eine und dann über die andere Komponente des Komplexes (Casparry *et al.*, 1999). Die erhaltenen Kandidaten werden mit Hilfe von denaturierender SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) oder 2D-Gelelektrophorese und anschließender massenspektrometrischer Analyse identifiziert.

Eine Weiterentwicklung der oben beschriebenen, herkömmlichen TAP-Methode nach Rigaut *et al.* (1999) ist unter der Bezeichnung GS-TAP bekannt. Dabei wird ein Fusions-

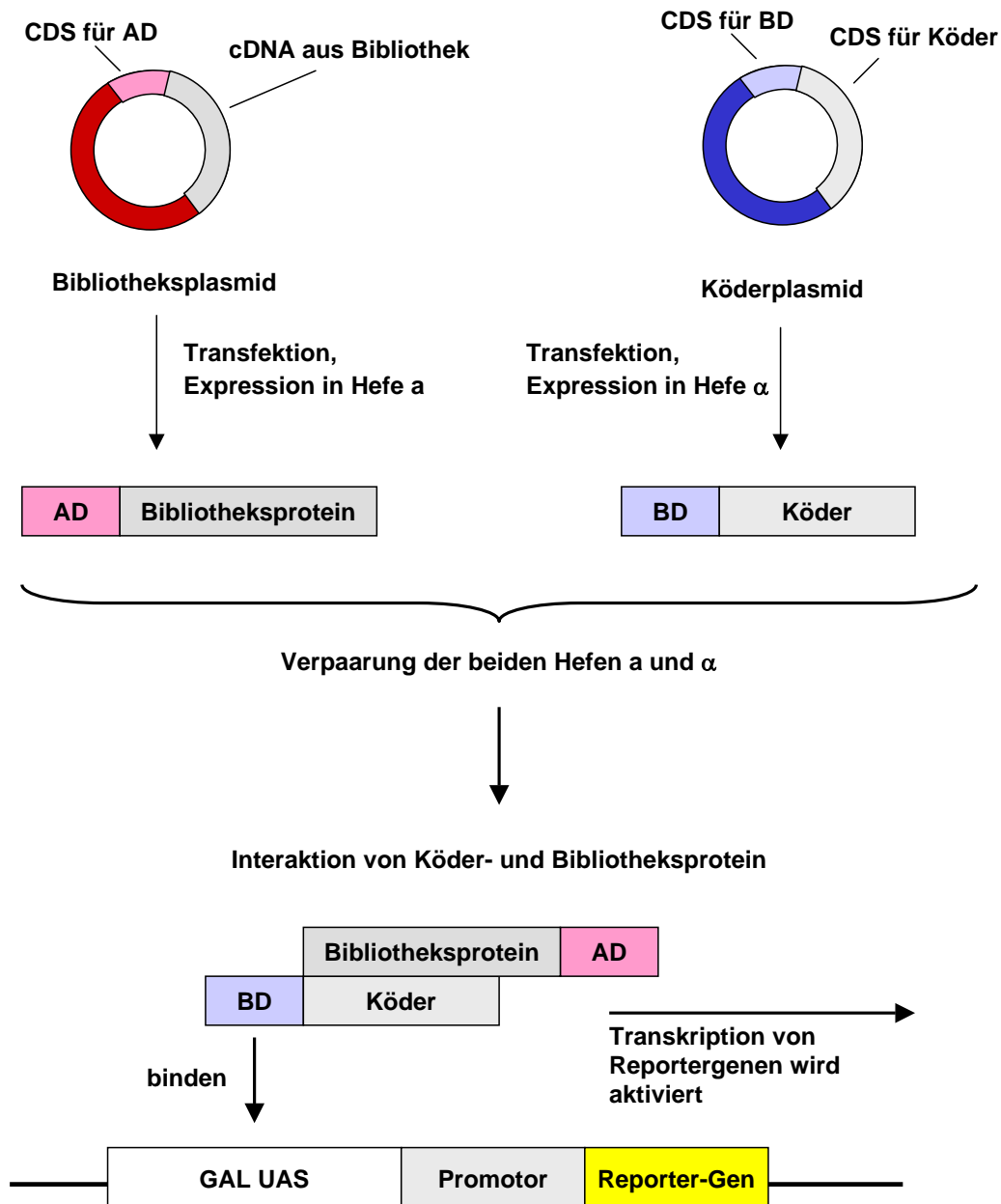


Abb. 2: Schema des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems. CDS, kodierende Sequenz (engl.: “coding sequence“); AD, Gal4-Transkriptionsaktivatordomäne; BD, Gal4-DNA-Bindedomäne; GAL UAS, am 5′-Ende des Promotors gelegene Gal4-aktivierende Sequenz (engl.: “upstream activating sequence“) zur spezifischen Bindung des Gal4-Proteins über seine Bindedomäne; Hefe a, Hefe mit dem Paarungsfaktor a; Hefe α , Hefe mit dem Paarungsfaktor α , die mit Hefe a Zygoten bilden kann. Einzelheiten siehe Text.

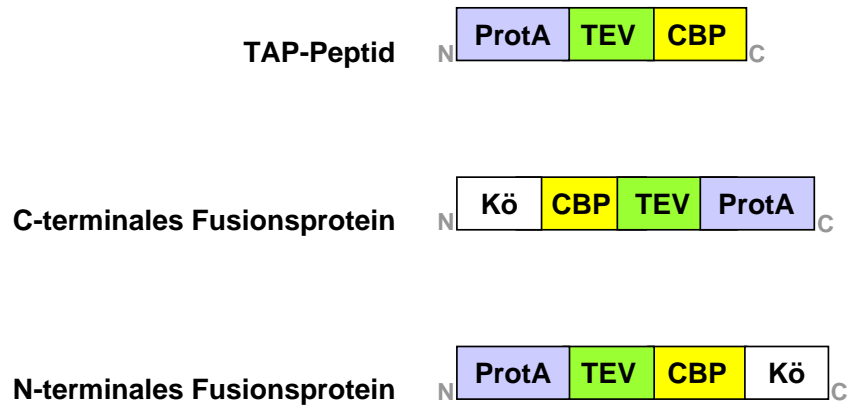


Abb. 3: Fusionsprotein für die Tandemaffinitätsreinigung (TAP), modifiziert nach Puig *et al.*, 2001. ProtA, Protein A; CBP, Calmodulinbindungsprotein; TEV, TEV-Schnittstelle; Kö, Köderprotein. Einzelheiten siehe Text.

polypeptid aus Protein G und Streptavidinbindungsprotein anstelle eines herkömmlichen TAP-Polypeptids verwendet. Dadurch wird nach Angaben von Bürckstümmer *et al.* (2006) 10fach höhere Ausbeute und größere Spezifität bei der Isolierung im Vergleich zu der herkömmlichen Protein A/CBP-Methode erreicht.

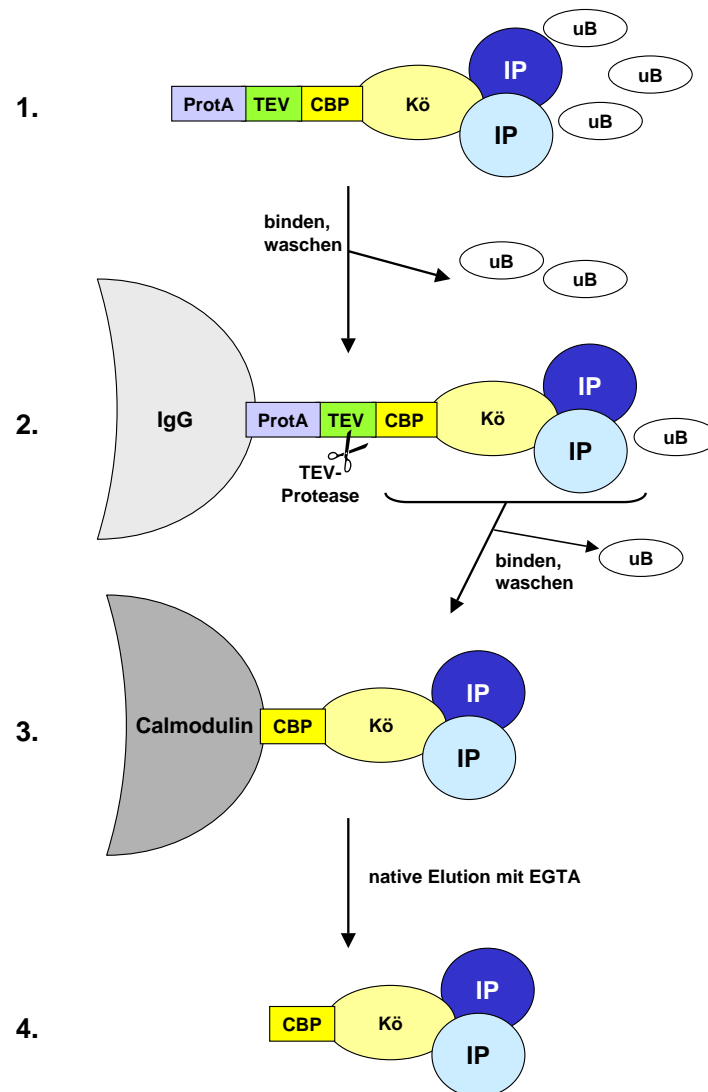


Abb. 4: Schema der Tandemaffinitätsreinigung (TAP), modifiziert nach Puig *et al.*, 2001. Kö, Köderprotein; uB, unspezifische Bindungspartner; IP, Interaktionspartner; ProtA, Protein A; CBP, Calmodulinbindungsprotein; TEV, TEV-Schnittstelle. Einzelheiten siehe Text.

1.9 Ziel dieser Arbeit

Das detaillierte Wissen über molekulare Vorgänge in Zellen bietet enorme Möglichkeiten bei der Prophylaxe oder Therapie von Krankheiten. Durch den Nachweis von Mutationen in Genen, deren Beteiligung beispielweise an der oben beschriebenen Primären Ciliären Dyskinesie (PCD) bekannt ist, ist diese Krankheit schnell diagnostizierbar und kann dadurch auch früh therapiert werden. Dadurch kann die Entstehung von Spätfolgen wie Hörminderung bis zum Hörverlust, nicht-allergisches Asthma bronchiale oder eine Sekundärinfektion der Bronchien mit *Pseudomonas aeruginosa* und anderen pathogenen Keimen verhindert werden. Es ist anzunehmen, dass auch der Mangel an ependymspezifisch exprimierten Kinocilienproteinen zu entsprechenden assoziierten Krankheiten führt.

Obwohl Ependymzellen bereits 1836 von Purkinje das erste Mal beschrieben wurden, sind bis zum heutigen Tag ihre physiologischen Aufgaben und ihre Rolle bei der Entstehung von Krankheiten weitgehend ungeklärt. Auch fehlen ependymspezifische “Marker“-Proteine. Als einziges Merkmal zur Identifizierung von Ependymzellen können bisher die apikalen Kinocilien der Zellen und ihre bekannte anatomische Lokalisation herangezogen werden. Allerdings können diese Merkmale bei der Fixierung oder Präparation der Zellen (z. B. Gefrierschnitt) leicht an praktischer Brauchbarkeit verlieren. Zudem besteht das Ependym auch aus un- und monocilierten Zellen, die sich im Einzelfall möglicherweise nur schwer vom umliegenden nicht-ependymalen Gewebe unterscheiden lassen. Ziel dieser Arbeit war daher die Auffindung ependymspezifischer exprimierter Gene. Durch deren nähere Charakterisierung wäre es gegebenenfalls auch möglich, die Funktionen der Ependymzellen näher kennenzulernen. Zu diesem Zweck sollten subtraktive cDNA-Bibliotheken aus Rinderependym nach differentiell transkribierten mRNA-Spezies durchsucht werden. Anschließend sollte das Produkt des am interessantesten erscheinenden ependymspezifisch exprimierten Gens auf seine Eignung als “Marker“-Protein getestet werden. Dazu sollten das zeitliche und örtliche Transkriptions- und Expressionsprofil des entsprechenden Gens untersucht werden. Auch mögliche Interaktionspartner seines Produktes sollten ermittelt werden, weil erwartet wurde, dass diese am ehesten Rückschlüsse auf die Funktion des Proteins erlauben würden.

Kapitel 2

Ergebnisse

2.1 Identifizierung ependymspezifischer Transkripte

Zur Identifizierung ependymspezifisch transkribierter Gene wurde eine, wie in 1.6 und Material und Methoden beschrieben, erstellte subtraktive cDNA-Bibliothek auf differentiell transkribierte mRNA-Spezies untersucht. Mithilfe der Computerdatenbanken des National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA (NCBI) wurden die erhaltenen Kandidaten bioinformatisch analysiert. In Tabelle 1 finden sich einige der interessantesten Klone, die beispielsweise durch ihre Lokalisation (“spermienassoziiert“) mit Cilien in Verbindung gebracht werden können oder deren Assoziation mit Cilien sehr wahrscheinlich ist. Beim Durchsuchen einer subtraktiven cDNA-Bibliothek aus Ependym wurden 1000 Klone auf differentiell transkribierte mRNA-Spezies untersucht. Der 501. Klon, EPE501 (E5), konnte beispielsweise als Spag6 identifiziert werden, das ausschließlich im Axonem von Kinocilien vorkommt (Sapiro et al., 2000).

Der in dieser Arbeit näher charakterisierte Klon G9Epe stammte nicht aus dem beschriebenen Suchlauf, in dem aus zeitlichen Gründen nur eine begrenzte Anzahl an Klonen untersucht werden konnte. Er war im Rahmen einer kurz zuvor im Labor durchgeführten Diplomarbeit (Frommer, 2003) entdeckt und von W. Hirschner als mutationsfreies Konstrukt in den Vektor pDNR-1r kloniert worden. Laut Datenbankrecherche handelt es sich um ein Protein mit einer in der Sequenzmitte gelegenen Adenylatkinase-Domäne. Aufgrund fehlender experimenteller Beweise einer Adenylatkinase-Funktion trägt das Protein die Bezeichnung “putative“ (englisch für “vermutlich“) Adenylatkinase 7. Durch Adenylatkinasen kann ATP für molekulare Motoren wie z.B. die “heavy chain“(HC)-Moleküle in den Dyneinarmen (siehe Einleitung 1.3.1) bereitgestellt werden. Somit könnten Adenylatkinasen auch an der Energetisierung des Cilienschlags beteiligt sein. Daher wurde

dieses Protein auf seine Lokalisation, sein Expressionmuster und seine Funktion hin untersucht.

Tabelle 1: Auswahl einiger Klone, die bei Durchsichtung subtraktiver cDNA-Bibliotheken aus Ependym (Epe/EPE) bzw. Subcommisuralorgan (SCO) identifiziert werden konnten und Angabe der zu den Klonen korrespondierenden Proteine. Als Auswahlkriterium wurde ihre potentielle Verbindung mit Cilien definiert, z. B. aufgrund ihrer Lokalisation (“spermienassoziiert”).

Klon	Name	Spezies	Zugriffscod (Pubmed)	korrespondierendes Protein
1	SCO250 (F8)	Homo sapiens Rattus norvegicus	NM145054- NM001037306 DQ445463	WD repeat domain 16 (WDR16), transcript variant 2 WDR16-like protein
2	EPE501 (E5)	Homo sapiens	BC030585	Sperm associated antigen 6 (Spag6)
3	G9Epe	Homo sapiens	NM152327	Adenylate kinase 7 (AK7)
4	SCO312 (G3)	Homo sapiens	BC113553	WD repeat domain 52
5	SCO336 (G8)	Homo sapiens	NM005906	Male germ cell-associated kinase (MAK)

2.2 Bioinformatische Charakterisierung von pAK7

2.2.1 Analyse der Primär- und Sekundärstruktur von pAK7

Zu Beginn dieser Arbeit wurde die cDNA-Sequenz des Klons G9Epe noch einer Nucleotidsequenz mit Zugriffscod XM_234507 zugeordnet, unter dem nur eine vorhergesagte mRNA-Sequenz erhalten werden konnte. Dieser Zugriffscod ist seit dem 15.05.2008 durch einen mit AK7 betitelten Eintrag (Zugriffscod NM_001108055) ersetzt worden. Allerdings stimmen weder Länge der Nucleotid-, noch Länge der Aminosäuresequenz dieses Eintrags mit denen des Eintrags der in vorliegender Arbeit untersuchten pAK7 überein. Die Nucleotidsequenz der AK7 stammt aus einer “Shotgun“-Sequenzierung von 8295918 bp von Chromosom 6 des Gesamtgenoms von *Rattus norvegicus* vom 20. Juni 2007, die unter dem Zugriffscod CH474034 beim NCBI archiviert ist (Florea *et al.*, 2005). Die Primärstruktur des zugehörigen AK7-Proteins (Zugriffscod NP_001101525,

XP_001069409 und XP_234507) wurde aus dieser "Shotgun"-Nucleotidsequenz abgeleitet. Im Rahmen vorliegender Arbeit wurde die pAK7-DNA aus Ratten-cDNA kloniert und das entsprechende Protein mit einem Antiserum gegen den C-Terminus nachgewiesen (siehe 2.4). Nach Sequenzierung des pAK7-cDNA-Klons umfasst der offene Leserahmen (ORF, engl. "open reading frame") 2172 Basenpaare (bp). Der pAK7-cDNA-Klon kodiert für ein 724 Aminosäureacylreste langes Protein mit einer Molekülmasse von 82.4 kDa. Im Gegensatz dazu umfasst die unter dem Zugriffscode NM_001108055 abgelegte und als AK7 bezeichnete Sequenz einen ORF von 2430 bp bei einer Gesamtlänge von 584 Aminosäuren. Vergleich der Proteinsequenz der in vorliegender Arbeit untersuchten Proteins pAK7 mit der beim NCBI publizierten Aminosäuresequenz von AK7 zeigt, dass große Bereiche der beiden Proteine identisch sind. Allerdings fehlen die in der pAK7 vorhandenen Aminosäuren 34-58, 206-232, 413-440, 497-520, 588-604 und 676-728 in der AK7, die in der Datenbank publiziert wurde. Die Aminosäure 587 (Valin) der pAK7 ist in der AK7 durch Methionin substituiert. Die letzten 12 Aminosäuren des C-Terminus (AEYLF-KNNPEMQ) sind identisch, daher könnte das in dieser Arbeit beschriebene Antiserum gegen das immunogene Peptid CDFLAEYLFKNNPEMQ auch AK7 erkennen, vorausgesetzt AK7 wird in den untersuchten Zellen exprimiert.

Die zugehörige orthologe Maus-Sequenz stammt aus einer cDNA-Bibliothek aus Hoden und hat eine Länge von 2946 bp (Zugriffscode AK019664). Desweiteren enthüllt die Analyse der Proteinsequenz von pAK7 mit Hilfe des BLASTP-Programms (NCBI) drei konservierte Sequenzmotive. Im N-terminalen Bereich (Aa 23-373) befindet sich nach dieser Analyse eine WcaG-Domäne, eine für Nucleosid-Diphosphat-Zucker-Epimerasen typische Struktur. Die Aa 371-649 des Proteins zeigen strukturelle Übereinstimmungen mit der katalytischen Domäne von Adenylatkinasen. Nach BLASTP-Vorhersage liegt im C-Terminus (Aa 680-721) des Proteins eine dpy-30-Domäne, die möglicherweise Dimerisierungen von Proteinen vermittelt (pfam, "protein family"-Datenbankeintrag unter pfam05186; Hsu und Meyer, 1994; Hsu *et al.*, 1995). Zur Klärung der Position der pAK7 im evolutionären Stammbaum der Adenylatkinasen wurden die AK-Domänen 23 verschiedener AK und anderer Nucleotid-Kinasen aus unterschiedlichen Spezies durch die "neighbor-joining"-Methode (Saitou und Nei, 1987) zu einem phylogenetischen Stammbaum komponiert (Abb. 5). Aus diesem geht hervor, dass pAK7 nicht direkt mit den durch Experimente funktionell verifizierten AK (AK1-4, 5A-B, AKY, Coli K12, Coli W3110, ; Erklärung siehe Legende Abb. 5) oder CMPK (CMP-Kinase) verwandt ist.

Auch die AK-Konsensus-Sequenz zeigt weniger Ähnlichkeit mit der pAK7-Sequenz als die Guanylatkinase-Konsensus-Sequenz (GuKc), den GMPK (GMP-Kinase)- und GMK

(Guanylatkinase)-Konsensus-Sequenzen, oder mit den Uridinkinasen GUK (Guanylatkinase aus Hefe) und MAGUK4 (“membrane-associated guanylate kinase homologue 4“). Cpc1 (“central pair complex 1“) und Kpl2, sein Homologes aus Säugetieren (Isoform 1 von “Sperm flagellar protein 2“), bilden eine separate Gruppe.

Die der AK-Domäne von AK7 am nächsten verwandte AK-Domäne ist diejenige von Hydin. Hydin steht in Zusammenhang mit der Bildung von Hydrocephalus (Davy und Robinson, 2003) und konnte mittlerweile im “central pair“ lokalisiert nachgewiesen werden (Lehtreck und Witman, 2007).

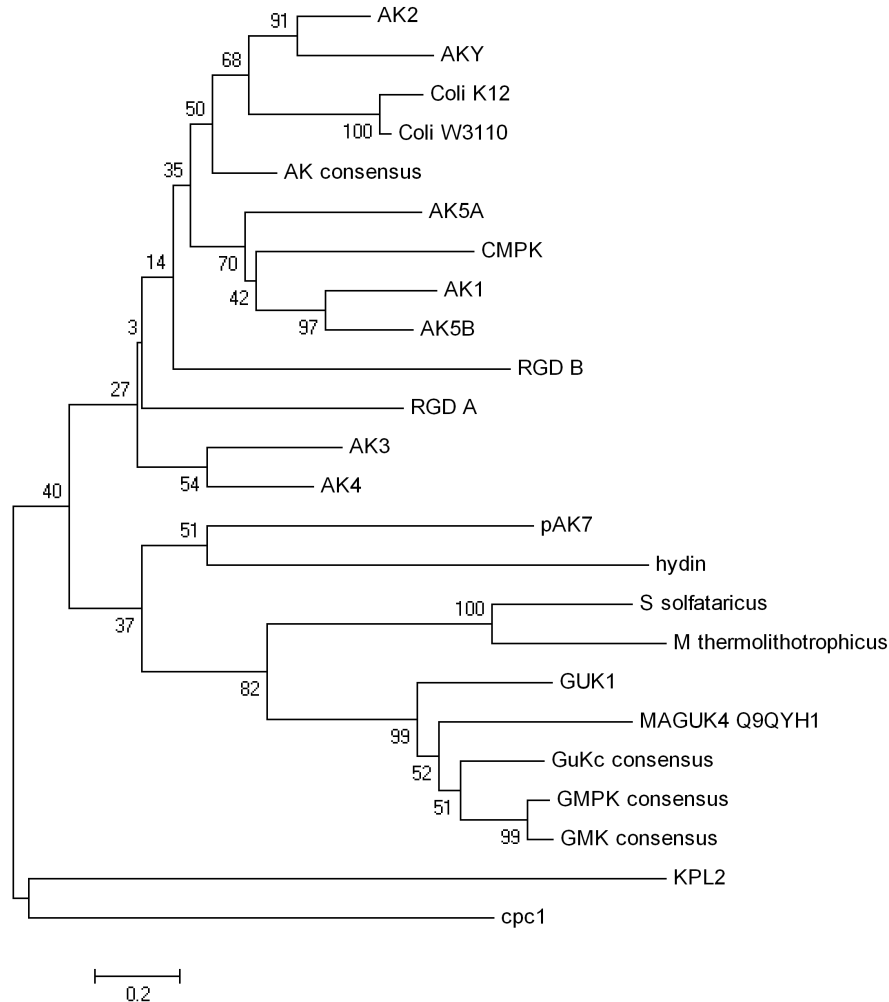


Abb. 5: Vergleichende Darstellung unterschiedlicher Adenylatkinase (AK)-Domänen in einem phylogenetischen Stammbaum nach Saitou und Nei, 1987. AKY, Adenylatkinase aus Hefen; Coli K12, AK aus *E. coli* K2; Coli W3110, AK aus *E. coli* W3110; AK consensus, Adenylatkinase-Konsensus-Sequenz; CMPK, CMP-Kinase; RGD A und B, Diacylglycerolkinase mit den Domänen A und B aus *Drosophila melanogaster*; GuKc, Guanylatkinase-Konsensus-Sequenz; GMPK, GMP-Kinase; GMK, Guanylatkinase; GUK, Guanylatkinase aus Hefe; MAGUK4, “membrane-associated guanylate kinase homologue 4“; Kpl2, Isoform 1 von “Sperm flagellar protein 2“ (Homologes zu cpc1); cpc1, “central pair complex 1“, Protein aus dem Zentralapparat von *Chlamydomonas reinhardtii*-Flagellen; *S. solfataricus*, AK aus *S. solfataricus*; *M. thermolithotrophicus*, AK aus *M. thermolithotrophicus*. Der Maßstab bezeichnet die genetische Distanz.

2.3 Analyse des pAK7-Transkriptionsprofils

2.3.1 Konventionelle PCR

Das gewebespezifische Transkriptionsprofil des pAK7-Gens wurde durch RT-PCR in verschiedenen Geweben und Zellkultursystemen untersucht (Abb. 6). In 13 d alten Ependymprimärkulturen (EPK) und im Hoden adulter Ratten fanden sich deutlich höhere Mengen an pAK7-Transkripten als in den anderen zum Vergleich verwendeten Geweben. Geringe Transkriptmengen wurden in Lunge, Gehirn und 13 d alten APK nachgewiesen. Keine pAK7-Transkripte konnten hingegen in Leber, Milz, Niere, Dünndarm oder Herz detektiert werden. Auch in Zellen der Linie 108CC15, einer Hybridzelllinie aus Mäuse-Neuroblastom- und Rattengliomzellen (Hamprecht, 1977; Hamprecht *et al.*, 1985) mit neuronalen Eigenschaften, konnten keine AK7-Transkripte nachgewiesen werden. Als Negativkontrolle wurde parallel zu jedem RNA-Umschrieb mit Reverser Transkriptase auch ein Ansatz ohne dieses Enzym unter den gleichen Reaktionsbedingungen inkubiert. Für die Positivkontrolle wurden bei der PCR "Primer" gegen die ubiquitäre mRNA des β -Actins verwendet.

2.3.2 Quantitative ("Real-time"-) PCR

Die relativen Mengen an AK7-Transkripten in den verschiedenen Geweben und Zellkultursystemen wurden durch quantitative ("Real-time"-) PCR analysiert. Die jeweilige Spezifität der Reaktion wurde durch Agarosegelelektrophorese und Schmelzpunktanalyse der Produkte überprüft (nicht dargestellt). Ein pAK7-spezifisches PCR-Produkt wurde mit RNA aus Hirn, EPK, Hoden, Lunge und APK erhalten, jedoch nicht mit RNA aus Leber, Milz, Niere, Dünndarm, Herz oder der Zelllinie 108CC15 (nicht dargestellt).

Um einen späteren Vergleich der relativen Konzentrationen an pAK7-mRNA in den verschiedenen Proben möglich zu machen, wurden die Amplifikationseffizienzen (E) der spezifischen PCR-Produkte für jede RNA-Quelle bestimmt. Dazu wurden die Fluoreszenzintensitäten der Schwellenwertschnittpunkte ("crossing points"; CP) verschiedener Verdünnungen der jeweiligen RNA-Präparate gegen die Logarithmen der jeweiligen Verdünnungsfaktoren aufgetragen (siehe Abb. 7). Aus diesen Diagrammen wurden die Steigungen der jeweiligen Regressionsgeraden ermittelt und daraus die entsprechenden Effizienzen mit der Formel $E = 10^{-1/Steigung}$ berechnet. Wenn aus der Mehrzahl der Verdünnungen kein pAK7-spezifisches PCR-Produkt erhalten werden konnte, ergab sich für den quadrierten linearen Korrelationskoeffizienten (R^2) der Ausgleichsgeraden ein Wert <0.98 . In diesen Fällen wurde angenommen, dass für die betroffene RNA-Quelle keine Effizienz

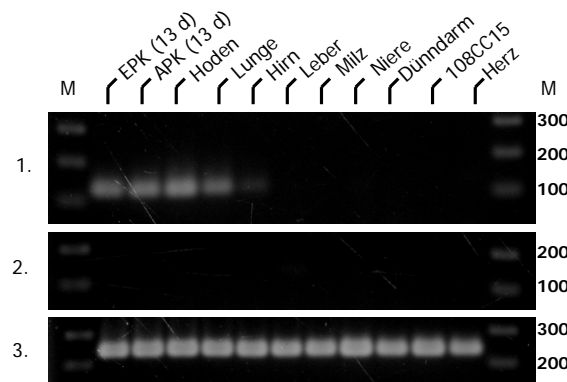
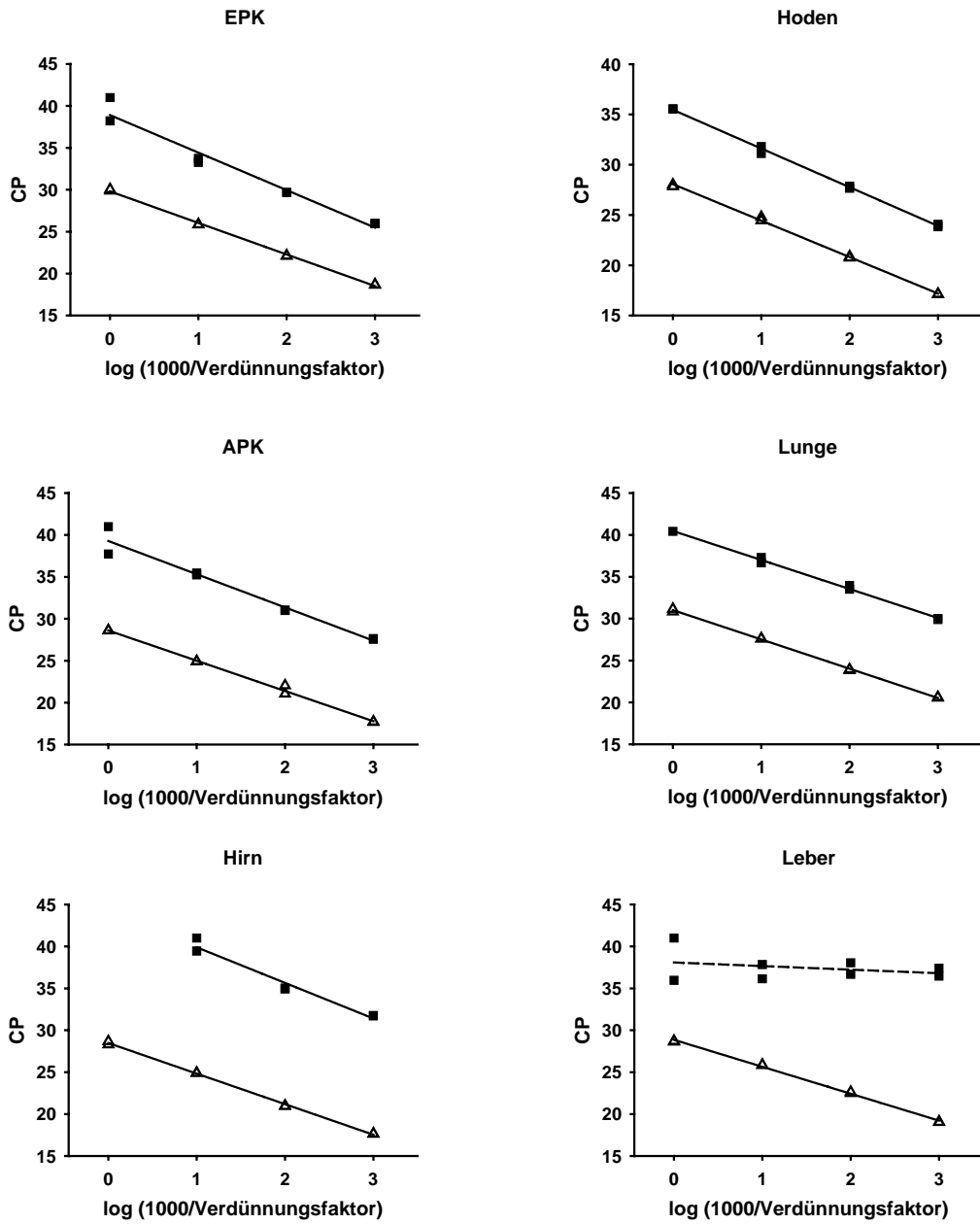


Abb. 6: Transkriptprofil für pAK7 in verschiedenen Geweben und Zellkultursystemen. 1 μ g Gesamt-RNA wurde revers in cDNA transkribiert. Durch konventionelle PCR wurden anschließend pAK7-spezifische cDNA-Abschnitte der jeweiligen Proben über 30 Zyklen amplifiziert. Auf dem 2.2%igen Agarosegel erkennt man nach Färbung mit Ethidiumbromid eindeutig das Vorkommen von PCR-Produkten in den Proben aus EPK, APK, Hoden, Lunge und Hirn. In den Proben aus Leber, Milz, Niere, Dünndarm, 108CC15 und Herz sind keine PCR-Produkte vorhanden (1.). In der Negativkontrolle (RNA-Umschrieb ohne Reverse Transkriptase durchgeführt) sind keine PCR-Produkte erkennbar (2.). Die gleichzeitige Positivkontrolle mit β -Actin-spezifischen Primern zeigt homogene Auftragungsmengen der einzelnen Proben (3.). Die Hybridisierungstemperatur für jedes “Primer“-Paar betrug 58°C. APK, Astrocytenprimärkultur (Alter angegeben); EPK, Ependymprimärkultur (Alter angegeben); 108CC15, Hybridzelllinie aus Mäuse-Neuroblastom und Rattenglomzellen mit neuronalen Eigenschaften (Hamprecht, 1977; Hamprecht *et al.*, 1985), M, Marker [bp].

ermittelt werden konnte und daher darin keine pAK7-Transkripte vorlagen. Die PCR-Effizienzen aus Regressionsgeraden mit $R^2 > 0.98$ wurden dazu verwendet, die pAK7-mRNA-Mengen relativ zum internen Standard (Cyclophilin-mRNA) zu bestimmen (siehe Methodenteil). Cyclophilin wird als "Haushaltsgen" von den meisten Zellen konstitutiv und unabhängig von der Art des Gewebes transkribiert (Radonic *et al.*, 2004), sodass sich seine mRNA als Standard eignet. Das vom Cyclophilin-Gen kodierte Produkt ist eine Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase. Für die Cyclophilin-Sequenz spezifische "Primer" wurden als Positivkontrolle eingesetzt, um die Integrität der jeweiligen RNA zu demonstrieren. Wurden bei der quantitativen PCR auffällig hohe CP für Cyclophilin-Transkripte (>20) festgestellt, so war dies ein Indikator für unbrauchbare mRNA-Präparate. Die höchsten relativen Mengen an pAK7-Transkripten wurden in EPK und Hoden ermittelt; nur geringe Mengen wurden in Hirn, Lunge und APK gefunden. In Leber, Niere, Milz, Dünndarm und der Zelllinie 108CC15 waren keine AK7-Transkripte nachweisbar.



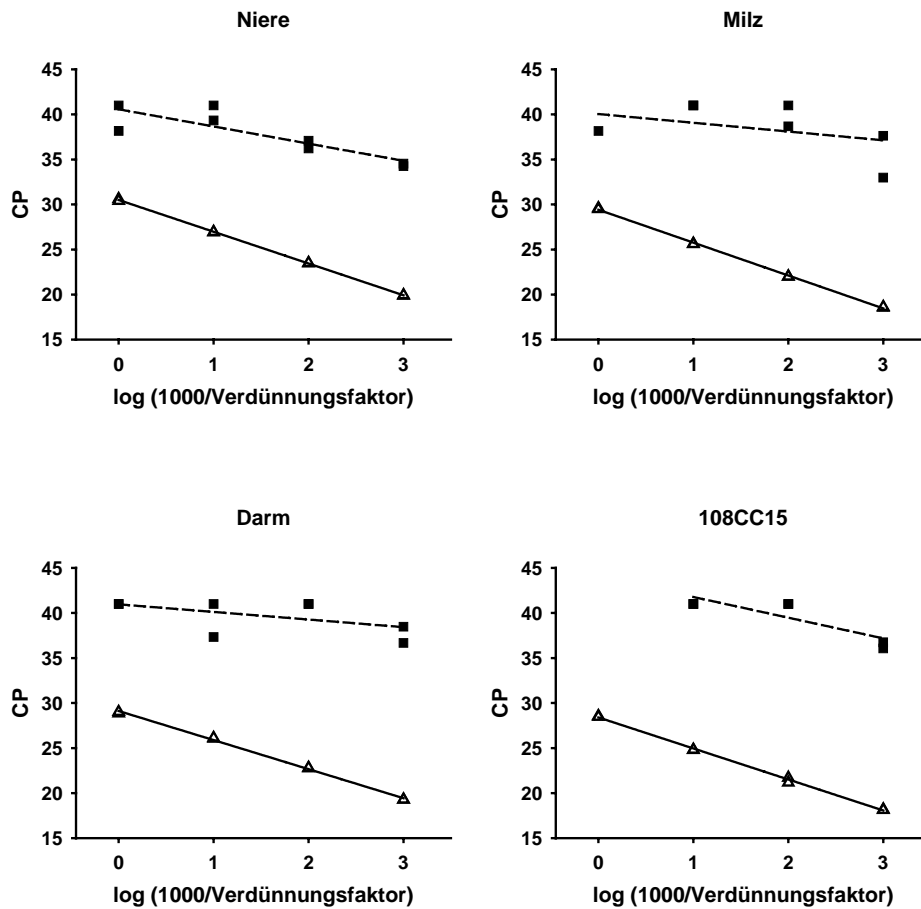


Abb. 7: Bestimmung der Effizienz der quantitativen RT-PCR in verschiedenen Organen und Zellsystems. Um Auskunft über das Vorkommen oder die Abwesenheit von pAK7-mRNA zu erhalten, wurden Verdünnungsreihen mit cDNA verschiedener Gewebe jeweils im Duplikat hergestellt. Anschließend wurden die verdünnten Lösungen per “Real-time“-PCR unter Verwendung von pAK7- (■) bzw. Cyclophilin-cDNA-spezifischen (△) “Primern“ analysiert. Die ermittelten Schwellenwertschnittpunkte (“crossing points“; CP) wurden gegen $\log(1000/\text{Verdünnungsfaktor})$ aufgetragen. Danach wurden Regressionsgeraden durch die Mittelwerte der jeweils zusammengehörenden Wertepaare gelegt. Aus deren Steigungen errechnet sich die jeweilige PCR-Effizienz nach $E = 10^{-1/\text{Steigung}}$. Die quadrierten linearen Korrelationskoeffizienten (R^2) geben Auskunft über den Grad der Linearität. Die Regressionsgeraden sind für $R^2 > 0.98$ durchgezogen, für $R^2 < 0.98$ gestrichelt dargestellt. Bei einem R^2 -Wert unter 0.98 wurde E als nicht bestimmbar angesehen. Effizienzen für pAK7 und Cyclophilin in dieser Reihenfolge (n.b.: Effizienz nicht bestimmbar, da $R^2 < 0.98$): EPK 1.67, 1.84; Hoden 1.82, 1.89; APK 1.79, 1.89; Lunge 1.94, 1.93; Hirn 1.72, 1.88; Leber n.b., 2.05; Niere n.b., 1.92; Milz n.b., 1.88; Dünndarm n.b., 2.04; 108CC15 n.b., 1.95. EPK, Ependymprimärkultur; APK, Astrocytenprimärkultur; 108CC15, Hybridzelllinie aus Mäuse-Neuroblastom- und Rattengliomzellen mit neuronalen Eigenschaften (Hamprecht, 1977; Hamprecht *et al.*, 1985).

2.4 Bestimmung der Immunreaktivität und Spezifität eines Kaninchen-Antiserums gegen pAK7

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Expression des pAK7-Gens untersucht werden. Um polyklonale Antikörper gegen das Produkt zu erhalten, sollte das Gen in *E.coli* oder *Saccharomyces cerevisiae* überexprimiert werden. Anschließend sollte das gereinigte Protein zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt werden. Versuche mit verschiedenen Expressionsplasmiden und -organismen (pLP-PROTet in *E.coli*, pESC-His in *Saccharomyces cerevisiae*) scheiterten jedoch. Die Alternative bestand in der Erzeugung eines Peptidantikörpers. Dazu wurden Peptidsequenzen gesucht, die sowohl sequentiell einzigartig als auch in wässrigen Injektionslösungen ausreichend löslich sein würden. Aufgrund früherer negativer Erfahrungen bei der Antiserenerzeugung (geringe Immunogenität und geringe Affinität des Antikörpers zum Antigen) sollten mehrere Peptide synthetisiert werden und dadurch die Wahrscheinlichkeit, ein hochspezifisches Serum zu erhalten, erhöht werden. Drei verschiedene Peptide wurden aufgrund ihrer hydrophilen Eigenschaften und günstigen Strukturvorhersagen (z. B. viele β -Faltblätter) ausgewählt, darunter auch das Endpeptid des C-Terminus ("Peptid 64"). Von "Peptid 64" wurde erwartet, dass es sich am wahrscheinlichsten gleich wie der native C-Terminus falten würde. Nach der Synthese wurden die Peptide zwecks Erhöhung der Immunogenität an mCKLH ("mariculture keyhole limpet hemocyanin", Hämocyanin aus gezüchteten Schlüssellochschnellen) gekoppelt. Die Konjugate wurden zur Immunisierung von fünf Kaninchen an die Firma Charles River Laboratories geschickt (jeweils zwei Tiere für die Konjugate von zweien der Peptide, ein Kaninchen für das Konjugat des dritten Peptids).

2.4.1 ELISA

Eins von fünf immunisierten Kaninchen entwickelte ein pAK7-spezifisches Antiserum gegen das dem C-Terminus entsprechende Peptid mit der Sequenz CDFLAEYLFKNNPEMQ. Im Folgenden soll dieses Antiserum beschrieben werden. Sein Titer wurde während des Immunisierungsprozesses mehrfach mittels ELISA bestimmt, wobei eine leichte Zunahme des Titers von der ersten zur zweiten Immunisierung zu erkennen war. Nach dem Ausbluten des Tiers lag der Titer unverändert auf dem Niveau der zweiten Serumprobe (Abb. 8). Das vor der ersten Immunisierung entnommene Kontrollserum (Präimmuneserum) zeigte keine Affinität zur pAK7.

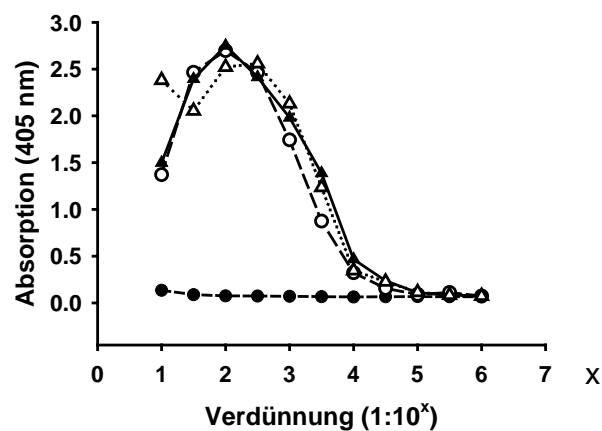


Abb. 8: ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assay“) zur Veranschaulichung der Immunreaktivität des Kaninchen-Antiserums gegen das pAK7-Peptid der Sequenz CD-FLAEYLFKNNPEMQ. Eine 96-Napfplatte wurde pro Napf mit 250 ng an Rinderserumalbumin konjugiertem Peptid beschichtet. Verschiedene Serumproben der mit demselben Peptid als Konjugat an Hämocyanin der Schlüssellochschnecke immunisierten Kaninchen wurden jeweils in Verdünnungsreihen von 1:10 bis 1:10⁶ auf die beschichteten Platten pipettiert und 2 h lang bei 37°C belassen. Danach wurde mit dem 2. Antikörper (Ziegenanti-Kaninchen-IgG, konjugiert mit Alkalischer Phosphatase) 1 h lang bei RT inkubiert. Die nach Umsatz des Substrats p-Nitrophenolphosphat durch die Phosphatase zum gelbem p-Nitrophenolatanion bedingte Zunahme der Absorption bei 405 nm wurde in einem ELISA-Lesegerät gemessen. Die Wendepunkte der Kurven zeigen die Titer der jeweiligen Proben an. ●, Präimmuneserum, das dem Tier vor der Immunisierung entnommen wurde; ○, Serumprobe nach dem ersten Nachimmunisieren (“Boost“); ▲, Serumprobe nach dem zweiten “Boost“; △ finales Serum nach dem Ausbluten.

2.4.2 “Western blot“

Um das pAK7-Antiserum im “Western blot“ auf seine Reaktivität zu testen, wurden Proteinhomogenate aus Hoden, Lunge, Leber und 13 d alten EPK verwendet. Nach Optimierung des “Blot“-Protokolls konnte mit Homogenat aus 13 d alten EPK auf der Membran eine einzelne Bande entsprechend einer ungefähren molekularen Masse von 85 kDa (theoretische Proteinmasse der AK7 nach bioinformatischer Berechnung: 82.4 kDa) detektiert werden. Diese Bande verschwand, wenn statt des Antiserums das Präimmenserum (PIS) verwendet wurde. Ein Signal blieb ebenfalls aus, wenn das Antiserum zuvor mit dem zur Immunisierung verwendeten Peptid abgesättigt worden war (Abb. 9). Allerdings war die Signalstärke stark abhängig von der verwendeten Verdünnung, was auf eine eher geringe Affinität des Antikörpers zum Antigen hindeutet.

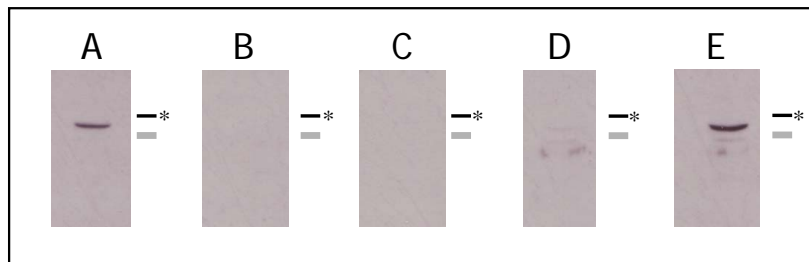


Abb. 9: “Western blot“ mit Homogenaten 13 d alter EPK zur Veranschaulichung der Monospezifität des pAK7-Peptid-Antikörpers. In jeder Spur sind 20 μg Proteine aufgetragen, welche durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend durch Elektro-“Blotting“ auf Nitrocellulosemembranen übertragen wurden. Die Membranen wurden jeweils über Nacht bei 4°C in 2% Milchpulver inkubiert mit (A) Antiserum, (B) PIS, oder (D) Antiserum, das zuvor mit dem immunogenen Peptid präabsorbiert worden war. (E) ist die (D) durchgeführte Positivkontrolle ohne präabsorbierendes Peptid. Bei Probe (C) wurde ohne ersten Antikörper inkubiert, um eventuelle unspezifische Signale des Zweitantikörpers darzustellen. Als Zweitantikörper wurde anti-Kaninchen-IgG aus Ziege mit gekoppelter Meerrettichperoxidase verwendet, mit dem 1 h lang bei RT inkubiert wurde. Die Detektion wurde mit ECL (“enhanced chemoluminescence“)-Reagenz durchgeführt. Die seitlichen Markierungen neben den gezeigten Membranausschnitten entsprechen jeweils einem Molekularmasse von 100 (schwarz mit *) und 72 (grau) kDa.

2.5 Analyse der gewebespezifischen Expression von pAK7 durch “Western blots“

2.5.1 Reinigung des pAK7-Antiserums

Zur Verringerung der Hintergrundbanden, die in “Western blots“ mit Gewebe- und Zellkulturhomogenaten aufgetreten waren (nicht dargestellt), wurde das pAK7-Antiserum gereinigt. Hierzu wurde mit einem Iodacetyl-Rest aktivierte Sepharose (“SulfoLink[®] Coupling gel“) als Affinitätsmatrix eingesetzt, an die das zur Immunisierung verwendete Peptid über die SH-Gruppe seines N-terminalen Cysteins gekoppelt worden war (Vorgehen siehe Methoden-Teil 4.2.13). Die gereinigten Antikörper wurden anschließend für “Blots“ mit Proteinhomogenaten aus unterschiedlichen adulten Rattengeweben und Zellkulturen verwendet.

2.5.2 Analyse von Rattengeweben und Zellkulturen

Zum Nachweis ependymspezifischer Expression von pAK7 wurden EPK, Hirn, Hoden, Lunge, Milz, Dünndarm, Leber, Niere, Herz und APK im “Western blot“ untersucht (Abb. 10). Expression von pAK7 konnte nur in Hoden und EPK (13 d) detektiert werden. Die dargestellte Bande entsprach einer Molekularmasse von ca. 85 kDa (errechnete Molekularmasse pAK7: 82.4 kDa). In Hirn, Lunge, Milz und Dünndarm traten keine Signale auf. Hingegen erkannte das Antiserum in Leber, Niere und Herz zusätzliche Proteine geringerer Molekularmasse. Dies konnte auch nicht durch Einsatz gereinigtem Antiserums vermieden werden. Mit immunogenem Peptid präabsorbiertes Antiserum detektierte in den anschließend durchgeführten “Western blots“ keine Proteine mehr (nicht dargestellt).

2.5.3 Analyse von Zellkulturen und Rattenhoden zu unterschiedlichen Zeitpunkten

Anschließend wurde das gereinigte pAK7-Antiserum eingesetzt, um die Entwicklung des Expressionsprofils der pAK7 in EPK mit der Kulturzeit zu verfolgen. Zu Kontrollzwecken wurden auch Proben aus APK unterschiedlicher Entwicklungsstadien untersucht. Der Analysezeitraum reichte für EPK von Tag 2 bis Tag 13, für APK von Tag 4 bis Tag 21. Im “Western blot“ (Abb. 11) zeigte sich bei EPK eine zunehmende Expression der pAK7 ab Tag 7. In APK hingegen ließ sich dieses Protein auch in höherem Alter (>Tag 10) kaum nachweisen (in der Reproduktion des “Blots“ nicht sichtbar). Diese Bande in der Spur für 13 d alte APK kann auf kontaminierende Ependymzellen zurückgeführt

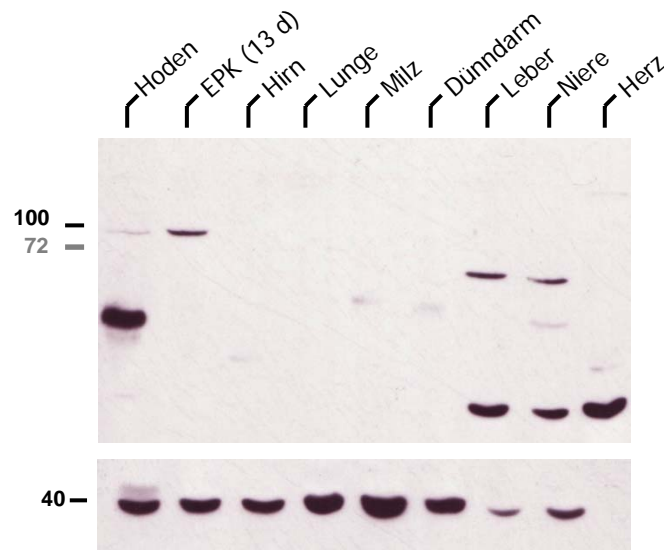


Abb. 10: “Western blot“ zum Nachweis der Expression des pAK7-Gens in unterschiedlichen Geweben und Zellkultursystemen. In jeder Spur sind 20 μg Homogenatprotein aufgetragen. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf Nitrocellulosemembranen durch ElektrobloTTen übertragen. Die Membranen wurden jeweils über Nacht bei 4°C in 2% Milchpulver mit gereinigtem Antiserum inkubiert. Mit dem Zweitantikörper (anti-Kaninchen-IgG aus Ziege, gekoppelt an Meerrettichperoxidase) wurde 1 h lang bei RT inkubiert. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung der einzelnen Spuren wurde monoklonaler β -Actin-Antikörper aus Maus eingesetzt. Es wurde 1 h lang bei RT inkubiert. Mit dem zweiten Antikörper (anti-Maus-IgG aus Ziege, gekoppelt an Meerrettichperoxidase) wurde ebenso lange inkubiert. Die Detektion wurde mit ECL-Reagenz durchgeführt. Die molekularen Massen sind in kDa angegeben.

werden, die dort regelmäßig auftreten (S. Verleysdonk, persönl. Mitteilung). In Rattenhoden unterschiedlichen Alters war die Qualität der “Western blots“ durch den hohen Hintergrund und das schwache pAK7-Signal gering. Jedoch konnte gezeigt werden, dass pAK7 ungefähr ab Tag 26 synthetisiert wird (Daten hier nicht wiedergegeben).

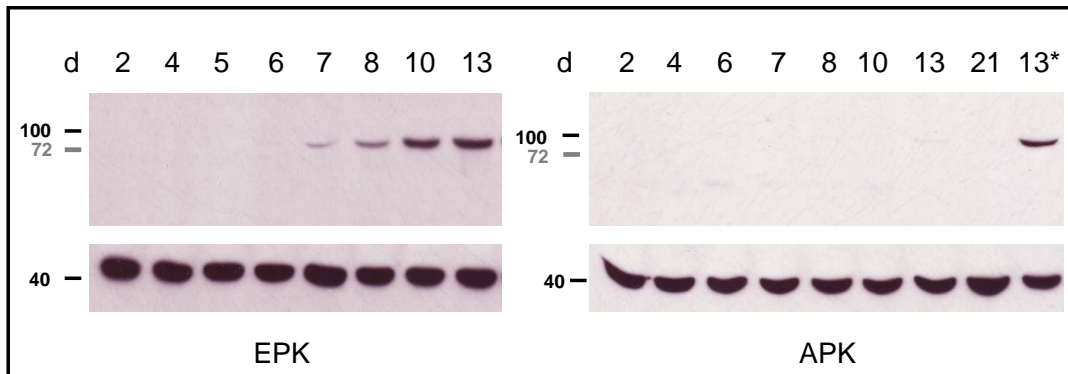


Abb. 11: “Western blot“ zum Nachweis der Expressionsstärke des pAK7-Gens in Ependymprimärkulturen (EPK) (links) und Astrocytenprimärkulturen (APK) (rechts) zu unterschiedlichen Zeitpunkten. In jeder Spur sind 20 μ g Homogenatprotein aufgetragen. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend durch Elektroblothen auf Nitrocellulosemembranen übertragen. Die Membranen wurden jeweils über Nacht bei 4°C in 2% Milchpulver mit gereinigtem Antiserum inkubiert. Mit dem Zweitantikörper (anti-Kaninchen-IgG aus Ziege, gekoppelt an Meerrettichperoxidase) wurde 1 h lang bei RT inkubiert. Als Positivkontrolle wurde Homogenat einer 13 d alten EPK verwendet (13*). Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung der einzelnen Spuren wurde monoklonaler β -Actin-Antikörper aus Maus eingesetzt. Als zweiter Antikörper diente anti-Maus-IgG aus Ziege, gekoppelt an Meerrettichperoxidase. Mit beiden Antikörpern wurde 1 h lang bei RT inkubiert. Die Detektion wurde mit ECL-Reagenz durchgeführt. Die molekularen Massen sind in kDa angegeben.

2.6 Vergleich der Transkriptionskinetik von pAK7, Spermien-assoziiertem Antigen 6, Hydin und Polaris

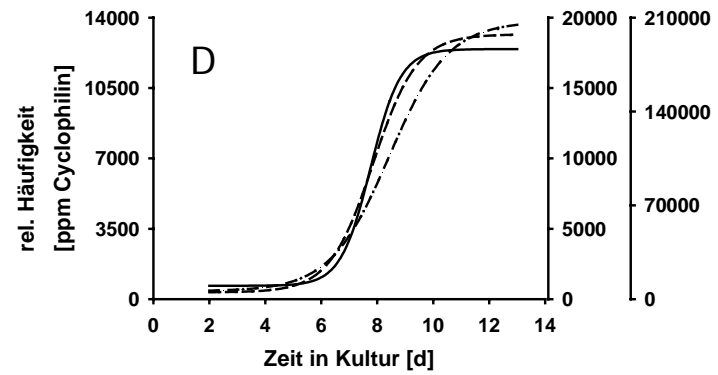
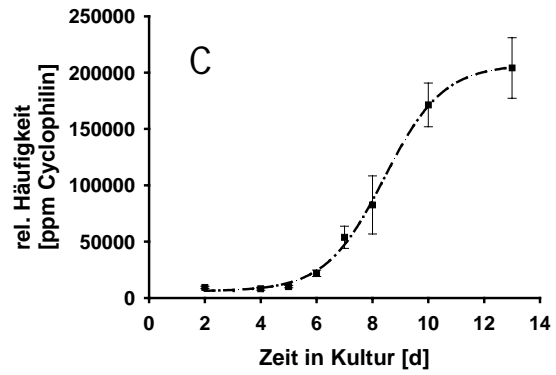
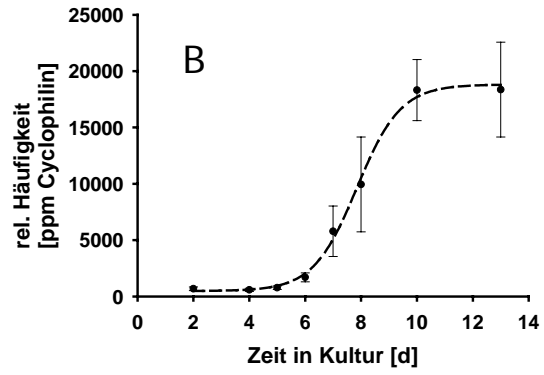
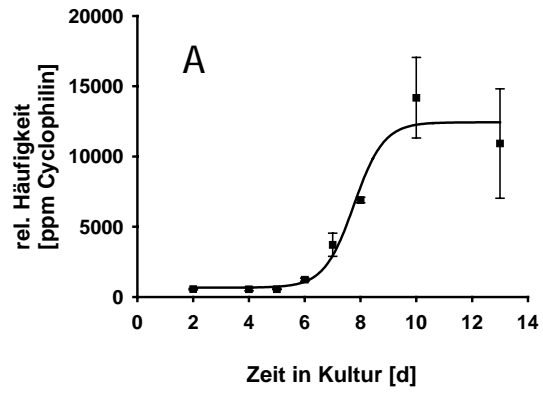
Die Verläufe der pAK7-mRNA-Spiegel in Hoden und EPK wurden durch quantitative PCR-Reaktionen untersucht (Abb. 12). Im Hoden erreicht die pAK7-mRNA ihr halbmaximales Niveau bei einem Alter der Tiere von 25.0 ± 0.0 Tagen, wie aus der Lage des Wendepunkts der Kurve durch die einzelnen Datenpunkte bestimmt werden kann (Abb. 12 E). In EPK wird dieser Wert nach 7.8 ± 0.4 Kulturtagen erreicht (Abb. 12 A). Um Rückschlüsse auf die Verbindung zwischen pAK7 und Kinocilien ziehen zu können, wurden die Transkriptionskinetiken des pAK7-Gens und verschiedener cilienassoziiierter Gene verglichen. Dazu wurden gewählt: Spag6, dessen Produkt ausschließlich im Axonem von Kinocilien vorkommt (Sapiro *et al.*, 2000), Hydin, dessen Produkt nur in kinocili-entragenden Geweben exprimiert wird und im Zentralapparat des Axonems lokalisiert ist (Davy und Robinson, 2003; Lehtreck und Witman, 2007) und *tg737^{orpk}* als Gen des für den intraflagellären Transport (IFT) notwendigen Proteins Polaris/IFT88 (Haycraft *et al.*, 2001). Die Effizienzen für die einzelnen RT-PCR-Amplifikationen der Transkripte und die quadrierten Korrelationskoeffizienten R^2 der zu ihrer Berechnung verwendeten Regressionsgeraden sind in Tabelle 2 dargestellt.

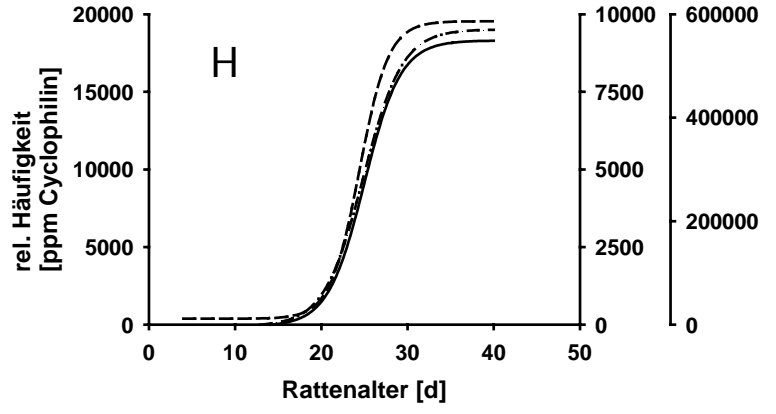
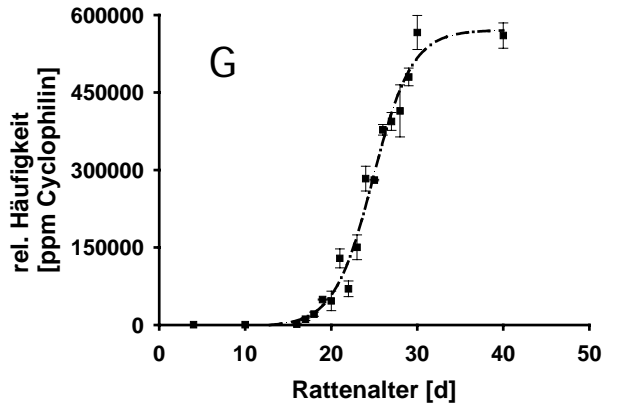
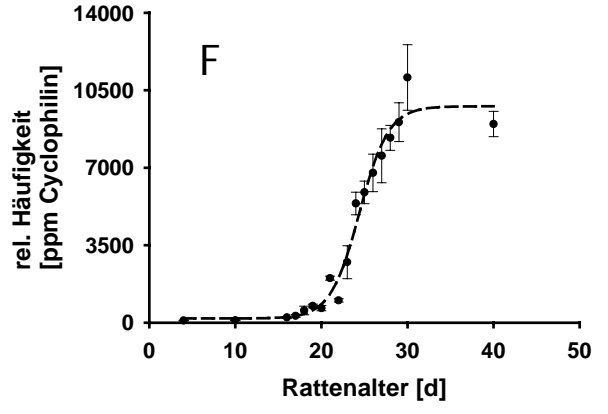
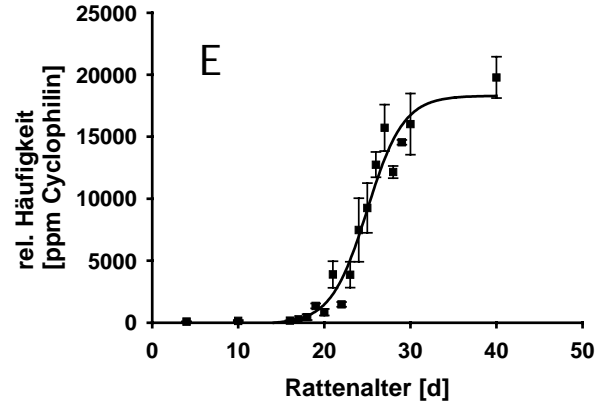
Tabelle 2: Quadrierte lineare Korrelationskoeffizienten (R^2) und Effizienzen (E) nach quantitativer RT-PCR mit Spag6-, Hydin- und Polaris-spezifischen “Primern“. Die Effizienzen wurden mit der Formel $E = 10^{-1/Steigung}$ berechnet.

Biol. Material	Spag6		Hydin		Polaris	
	R^2	Effizienz	R^2	Effizienz	R^2	Effizienz
EPK	0.99	1.68	0.99	1.89	0.99	1.96
Hoden	0.98	1.66	0.99	1.95	0.99	1.98

Sowohl im Hoden als auch in EPK steigen die Mengen der pAK7-Transkripte ungefähr zur gleichen Zeit (im Hoden um Tag 25, in EPK um Tag 8) und in gleichem Maß wie diejenigen der Vergleichsproteine mit Ausnahme von Polaris an (Abb. 12 A-H). Im Hoden beginnt die Transkription von Polaris am Tag 19.4 ± 0.0 , also ca. fünf Tage vor dem Anstieg der mRNA-Spiegel von pAK7, Spag6 und Hydin (Abb. 12 K). In EPK finden sich

nur so geringe Mengen von Polaris-Transkript, dass nicht sinnvoll ausgewertet werden kann (nicht dargestellt).





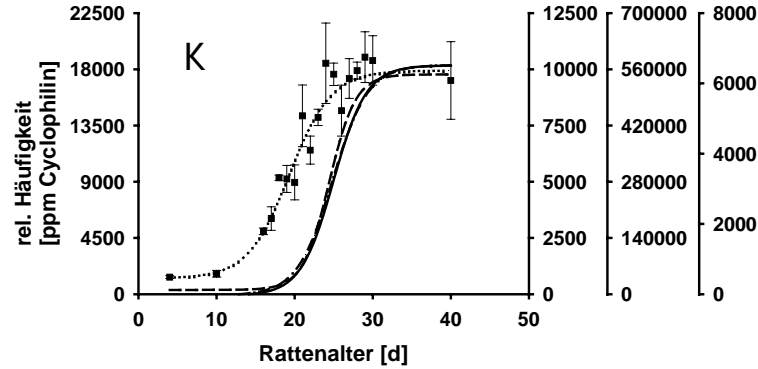


Abb. 12: Quantitative PCR-Analyse der zeitabhängigen Änderungen der Mengen an pAK7- (A, E), Hydin- (B, F) und Spag6-mRNA (C, G) aus Ependymprimärkulturen (EPK) (A-D) und Hoden (E-H) relativ zur jeweiligen Menge an Cyclophilin-mRNA aus diesen Quellen. 1 μg Gesamtzell-RNA wurde revers transkribiert und über 45 PCR-Zyklen unter Zuhilfenahme des “FastStart DNA Master SYBR Green I Systems“ in einem LightCycler[®]-Gerät untersucht (Beschreibung siehe Material und Methoden). Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert \pm Standardabweichung der relativen mRNA-Mengen des entsprechenden untersuchten Proteins in drei verschiedenen Rattenhoden bzw. vier unterschiedlichen Ependymprimärkulturen zum angegebenen Zeitpunkt. Die Regressionskurve wurde mit Hilfe der Funktion $y_0 = y_0 + \frac{ax^b}{c^b+x^b}$ durch diese Datenpunkte gelegt (y_0 , Basalwert; a , Steigung; b , Hill-Koeffizient; c , t_{50} , Zeitpunkt, an dem die halbmaximale relative mRNA-Menge erreicht ist). Die Überlagerung der Einzelkurven aus A-C und E-G ist in D bzw. H dargestellt. Die einzelnen Datenpunkte wurden hier zum Erhalt der Übersichtlichkeit weggelassen. Die Ordinaten sind dabei jeweils von links nach rechts pAK7, Hydin und Spag6 zugeordnet. Die aus den Wendepunkten der Regressionskurven bestimmten t_{50} -Werte sind (Hoden, EPK): pAK7 25.0 ± 0.0 , 7.8 ± 0.4 ; Hydin 24.4 ± 0.0 , 7.9 ± 0.0 ; Spag6 24.9 ± 0.0 , 8.5 ± 0.0 Tage. Die zugehörigen R^2 -Werte sind (Hoden, EPK): pAK7 0.99, 0.77; Hydin 0.99, 0.99; Spag6 0.99, 0.99. Diagramm K entspricht Diagramm H, in das jedoch die Datenpunkte von *Tg737^{orpk}* (Polaris/IFT88) eingetragen wurden. Die zugehörige Ordinate wurde rechts außen neben den Hydin- und Spag6-Ordinaten hinzugefügt, t_{50} für Polaris ist 19.4 ± 0.0 , R^2 beträgt 0.99.

2.7 Immunfluoreszenzanfärbungen mit dem pAK7-Antiserum

Um die Lokalisation der pAK7 festzustellen, wurden Immunfluoreszenzanfärbungen von Zellen aus verschiedenen Kultursystemen und Cryostat-Gewebeschnitten von Rattengehirnen in unterschiedlichen Entwicklungsphasen durchgeführt. Zuvor musste jedoch die Spezifität des Antikörpers nachgewiesen werden. Hierfür wurden HEK293T-Zellen lentiviral mit Vektoren transfiziert, die in den Zellen anschließend zur Synthese von grünfluoreszierendem Protein (GFP) führten. Für die Synthese von pAK7 als Fusionsprotein mit GFP wurde pAK7-cDNA im lentiviralen Vektor pWPXL eingesetzt, das GFP wurde an den N-Terminus von pAK7 fusioniert. Für die Expression von unfusioniertem GFP kam der Vektor pWPXL ohne inserierte pAK7-cDNA zum Einsatz. Nach Herstellung von pAK7-GFP- und GFP-Lentiviren wurden die HEK-Zellen transfiziert, nach 3-5 d fixiert und anschließend mittels Immunfluoreszenz angefärbt (siehe auch 4.2.20). Erfolgreich transfizierte Zellen waren an der Anwesenheit von GFP erkennbar (Abb. 13 B, E, H, K). Nur pAK7-GFP-synthetisierende Zellen konnten durch pAK7-Antiserum markiert werden (Abb. 13 A), nicht jedoch durch PIS (Abb. 13 D). Auch durch Antiserum, das zuvor mit immunogenem Peptid inkubiert worden war, konnten die Zellen nicht angefärbt werden (Abb. 13 J). HEK-Zellen, die nur GFP exprimierten, wurden vom pAK7-Antiserum nicht markiert (Abb. 13 G). Das pAK7-Antiserum reagierte also nicht mit dem GFP-Peptid, sondern erkannte selektiv pAK7.

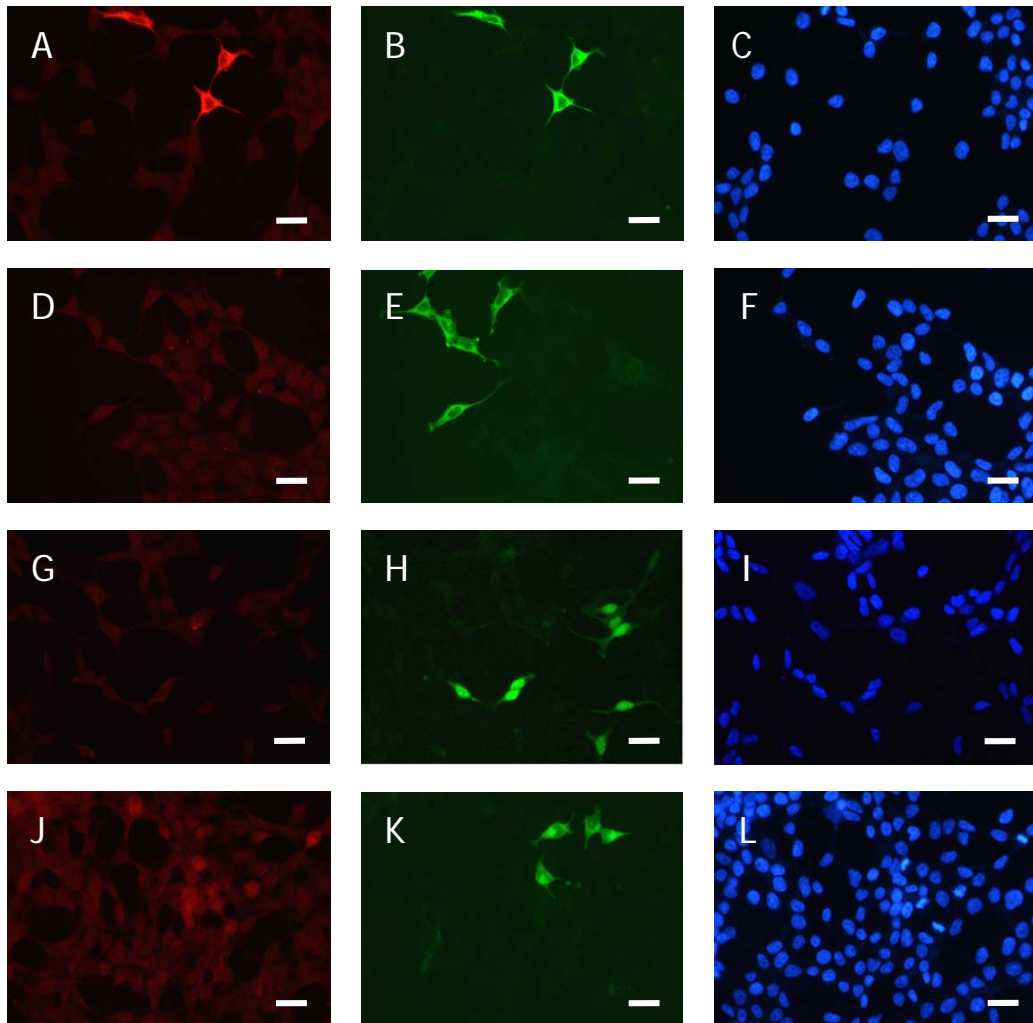


Abb. 13: Nachweis der Affinität und Spezifität des Kaninchenantiserums gegen pAK7 durch Immunfluoreszenzdoppelanfärbungen von HEK293T-Zellen, die nach viraler Transfektion pAK7-GFP (A-F; J-L) oder nur GFP synthetisierten (G-I). Die erste Spalte zeigt Zellen, die mit Antikörper gegen das immunogene Peptid, mit pAK7-Antiserum (A und G), mit pAK7-Präimmunserum (D) oder mit dem präabsorbierten pAK7-Antiserum (J) gefärbt wurden. Als Zweitantikörper (rot) wurde anti-Kaninchen-IgG, konjugiert mit dem Fluorophor Alexa 568, verwendet (Inkubationszeit 1 h/RT). Die zweite Spalte zeigt die entsprechende GFP-Expression (grüne Fluoreszenz). In der dritten Spalte sind die zugehörigen Kernfärbungen mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) abgebildet (blau). Der Maßstab entspricht jeweils 20 μm .

2.7.1 Immunfluoreszenzanfärbung von Zellkulturen

2.7.1.1 Immunfluoreszenzanfärbung von Ependymprimärkulturen (EPK)

Das pAK7-Antiserum wurde verwendet, um in 13 d alten EPK die Expression von pAK7 nachzuweisen. In allen Ependymzellen konnte ein cytosolisches Fluoreszenzsignal detektiert werden, wenn diese mit pAK7-Antiserum und einem entsprechend markierten Zweitantikörper behandelt worden waren. Kein Signal war erkennbar, wenn PIS oder mit immunogenem Peptid präabsorbiertes pAK7-Antiserum verwendet wurde (Abb. 14). Daraus kann geschlossen werden, dass die pAK7 ein cytosolisches Protein differenzierter Ependymzellen ist.

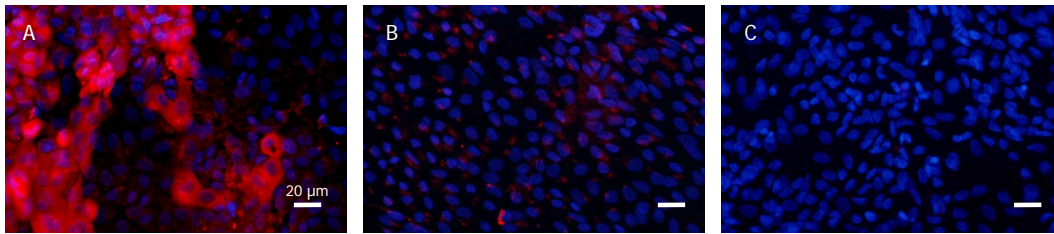


Abb. 14: Immunfluoreszenzanfärbungen 13 d alter EPK mit pAK7-Antiserum. Die mit Paraformaldehyd fixierten Zellen wurden behandelt mit pAK7-Antiserum (A), PIS (B) und pAK7-Antiserum, das zuvor mit immunogenem Peptid inkubiert worden war (C). Mit dem ersten Antikörper wurde 2 h lang bei 37°C, mit dem zweiten Antikörper (anti-Kaninchen-IgG, konjugiert mit dem Fluorophor Alexa 568) 1 h lang bei RT inkubiert. Die pAK7-Immunoreaktivität wird durch rote Fluoreszenz angezeigt. Die Kerne wurden mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) blau markiert. Der Maßstab in allen Bildern entspricht 20 µm.

2.7.1.2 Immunfluoreszenzdoppelanfärbungen von EPK und APK mit Antikörpern gegen pAK7 und α -Tubulin

Nach der erfolgreichen Anfärbung von EPK auf pAK7 sollte getestet werden, welche Zelltypen des Kultursystems pAK7 enthalten. Dazu wurden die Kinocilien der Ependymzellen mit einem Antikörper gegen α -Tubulin markiert. Da α -Tubulin im ciliären Axonem sehr stark konzentriert ist, bietet es sich als ciliärer Marker an (Prothmann *et al.*, 2001). Durch die Doppelanfärbung mit pAK7-Antiserum und α -Tubulinantikörper wird deutlich, dass pAK7 in cilierten Zellen vorkommt. In Abb. 15 ist erkennbar, dass das pAK7-Antiserum kinocilientragende Zellen in einer 13 d alten EPK anfärbt. Die Doppelanfärbung zeigt, dass das pAK7-Signal mit Sicherheit von Ependymzellen stammt, da andere Zellarten, die als mögliche Kontamination in den EPK vorkommen können, keine Cilien tragen. Außerdem wird erkennbar, dass nur polycilierte, kinocilientragende Ependymzellen durch

das pAK7-Antiserum markiert werden (Pfeilspitzen in Abb. 15), nicht aber Zellen mit nur einem, vermutlich primären Cilium (Pfeile in Abb. 15).

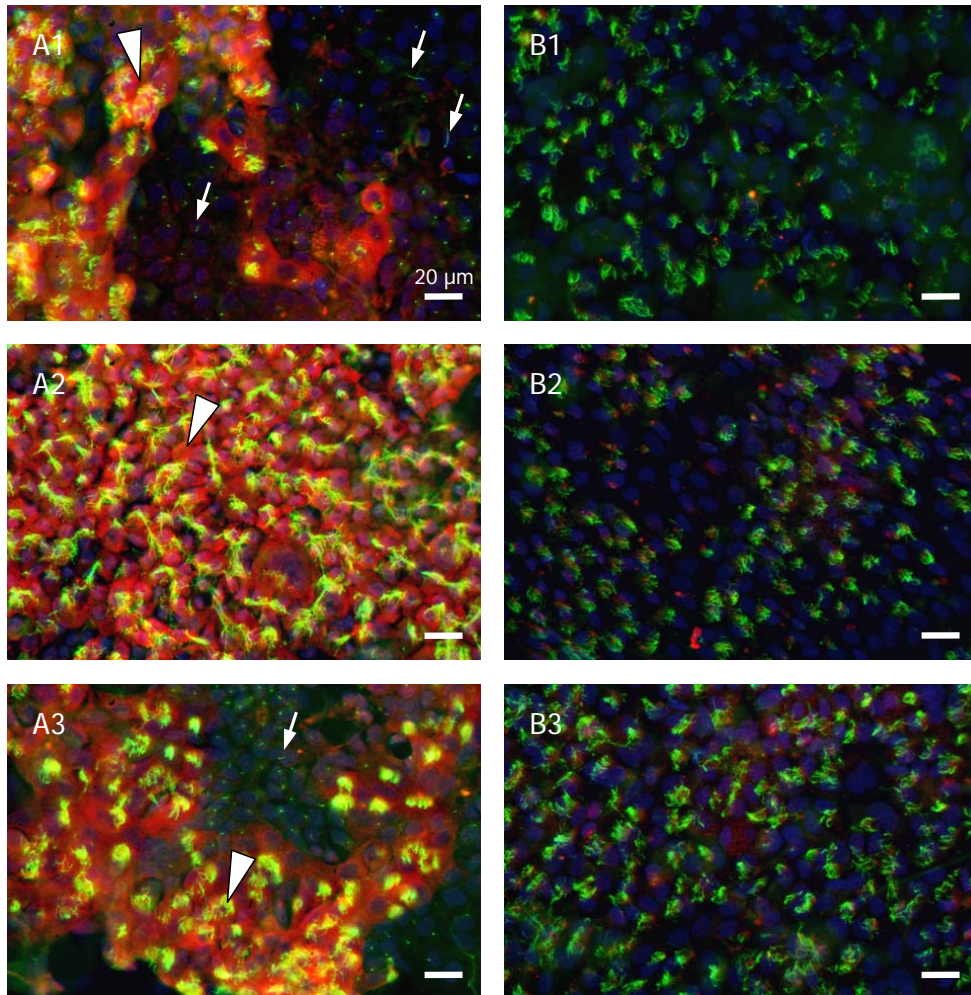


Abb. 15: Immunfluoreszenzdoppelanfärbung 13 d alter Ependymprimärkulturen (EPK) mit α -Tubulinantikörper und pAK7-Antiserum (A1-A3) bzw. pAK7-PIS (B1-B3). Die auf Deckgläschen kultivierten, mit Paraformaldehyd fixierten Zellen wurden mit pAK7-Antiserum und α -Tubulinantikörper 2 h lang bei 37°C inkubiert. Als Zweitantikörper wurde anti-Kaninchen-IgG konjugiert mit Alexa 568 als Fluorophor zur Markierung der pAK7 (rot) verwendet. α -Tubulin (grün) wurde angefärbt mit anti-Maus-IgG, das mit Alexa 488 konjugiert war. Die Inkubationsbedingungen waren für beide Sekundärantikörper gleich (1 h bei RT). Die Zellkerne wurden mit 4'-6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) (blau, in A1-A3 und B1-B3) gefärbt. Es ist deutlich erkennbar, dass Zellen, die nur ein Cilium tragen, von pAK7-Antiserum nicht markiert werden (Pfeile in A1 und A3). Im Gegensatz dazu werden polycilierte Zellen von pAK7-Antiserum eindeutig angefärbt (Pfeilspitzen in A1-A3). Der Maßstab in allen Bildern entspricht 20 μ m.

APK enthalten regelmäßig einen geringen Anteil kontaminierender Ependymzellen, die

mittels Antikörpern gegen α -Tubulin visualisiert werden können. Erwartungsgemäß waren die durch das pAK7-Antiserum markierten Zellen die kinocilientragenden Ependymzellen (Abb.16 B und C, markiert mit Pfeilspitzen). Alle (umgebenden) Zellen ohne Cilien (* in Abb. 16 A-D) oder mit nur einem Cilium (Pfeile in Abb. 16 A und C) waren pAK7-negativ.

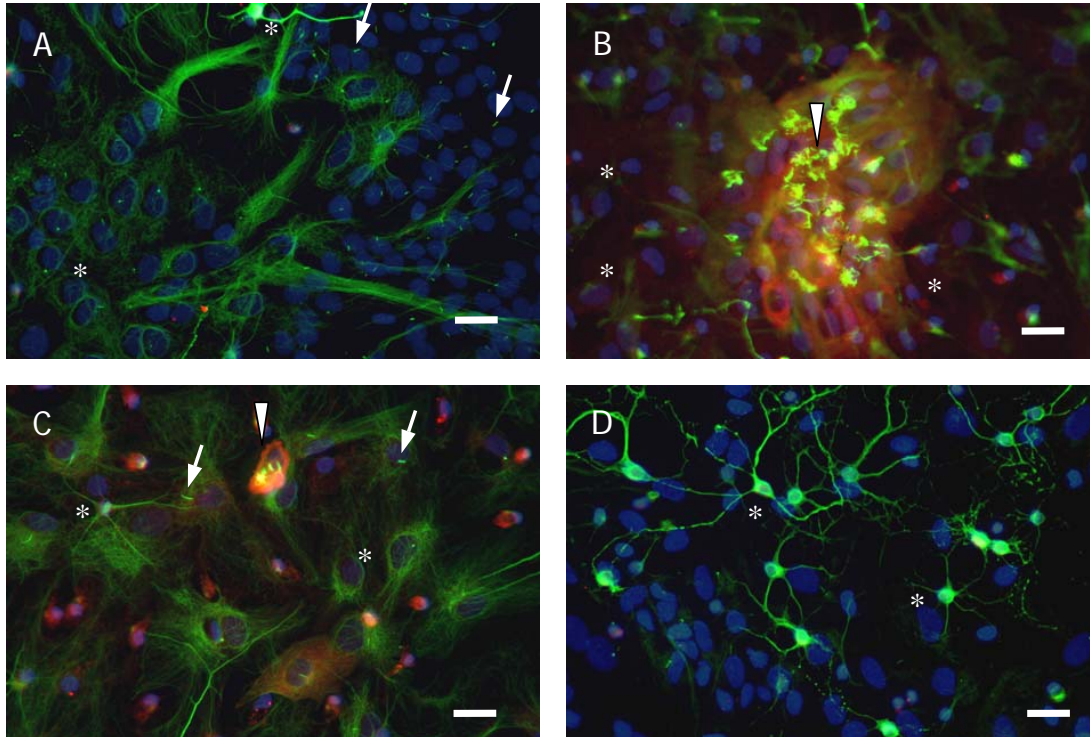


Abb. 16: Immunfluoreszenzdoppelanfärbung von 13 d alten Astrocytenprimärkulturen (APK) mit monoklonalem α -Tubulinantikörper und pAK7-Antiserum. Die auf Deckgläschen kultivierten, mit Paraformaldehyd fixierten Zellen wurden mit anti-pAK7-Serum und α -Tubulinantikörper 2 h lang bei 37°C inkubiert. Als Zweitantikörper wurden anti-Kaninchen-IgG (Alexa 568-Konjugat) zur Markierung der pAK7 (rot) und anti-Maus-IgG (Alexa 488-Konjugat) zur Markierung von α -Tubulin (grün) verwendet. Die Inkubationsbedingungen waren für beide Sekundärantikörper gleich (1 h bei RT). Die Zellkerne wurden mit 4'-6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI, blau, alle Bilder) gefärbt. Kinocilientragende Ependymzellen wurden deutlich mit dem pAK7-Antiserum markiert (Pfeilspitzen in B und C). Zellen mit nur einem Cilium sind hingegen nicht mit dem pAK7-Antiserum angefärbt (Pfeile in A und C), ebenso wie unciliierte Zellen (beispielsweise * in allen Bildern). Der Maßstab in allen Bildern entspricht 20 μ m.

2.7.1.3 Immunfluoreszenzdoppelanfärbungen von EPK mit Antikörpern gegen pAK7 und die Gehirniform der Glycogenphosphorylase

Ependymzellen (EPK) besitzen sowohl Kinocilien als auch die Gehirniform der Glycogenphosphorylase (GP BB) (Verleysdonk *et al.*, 2005). Da kinocilientragende Zellen aber auch durch pAK7-Antiserum markiert werden können, wurde von einer Kollokalisierung von pAK7 und GP BB ausgegangen. Diese konnte in der Tat durch gleichzeitige Immunfluoreszenzanfärbungen mit Antikörpern gegen GP BB und pAK7 gezeigt werden (Abb. 17 A-C, beispielhaft mit Pfeilspitzen markiert). Zellen ohne GP BB werden auch nicht durch pAK7-Antiserum markiert (Abb. 17 alle Bilder, beispielhaft mit * markiert).

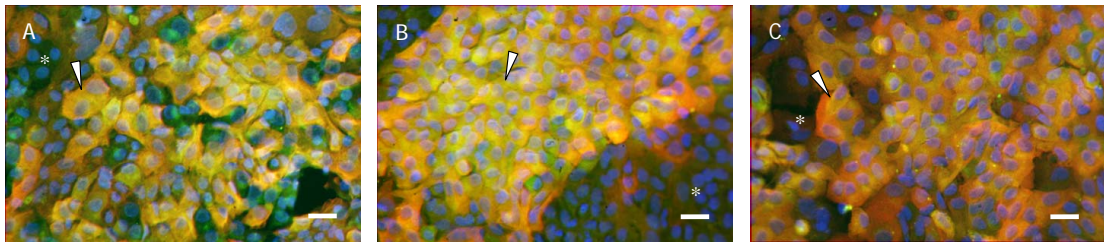


Abb. 17: Immunfluoreszenzdoppelanfärbung 13 d alter Ependymprimärkulturen (EPK). Die auf Deckgläschen kultivierten, mit Paraformaldehyd fixierten Zellen wurden mit pAK7-Antiserum und Antiserum gegen die Gehirniform der Glycogenphosphorylase (GP BB) aus Meerschweinchen 2 h lang bei 37°C inkubiert, um die Anwesenheit beider Proteine in EPK zu zeigen. Als Zweitantikörper wurden anti-Kaninchen-IgG (Alexa 488-Konjugat) zur Markierung der pAK7 (grün) und anti-Meerschweinchen-IgG (Cy3-Konjugat) zur Markierung der GP-BB (rot) verwendet. Die Inkubationsbedingungen waren für beide Sekundärantikörper gleich (1 h bei RT). Die Zellkerne wurden mit 4'-6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI, blau, alle Bilder) gefärbt. Durch optische Überlagerung der grünen und roten Fluoreszenzen entsteht eine gelbe Färbung in Zellen, in denen beide Proteine, pAK7 und GP BB, zusammen vorkommen (einige dieser Zellen wurden beispielhaft mit Pfeilspitzen markiert). Zellen ohne GP BB wurden auch nicht durch pAK7-Antiserum markiert (alle Bilder, beispielhaft mit * markiert). Der Maßstab in allen Bildern entspricht 20 μm .

2.7.1.4 Immunfluoreszenzdoppelanfärbungen von APK mit Antikörpern gegen pAK7 und GFAP

Astrocyten können durch Antikörper gegen gliales fibrilläres saures Protein (GFAP) spezifisch angefärbt werden. Um zu zeigen, dass diese Zellen nicht durch das pAK7-Antiserum markiert werden, wurden 13 d alte Astrocytenprimärkulturen (APK) mit pAK7-Antiserum (Abb. 18 A und C) bzw. pAK7-Präimmunserum (Abb. 18 B und D) in Doppelanfärbung mit GFAP-Antiserum immunmarkiert. Die GFAP-positiven Zellen werden nicht durch pAK7-Antiserum markiert (beispielhaft in Abb. 18 mit Pfeilspitzen gekennzeichnet). Anfärbungen mit pAK7-Antiserum (Abb. 18 A und C) zeigen keinen Unterschied zu Anfärbungen mit PIS (Abb. 18 B und D).

2.7.2 Immunfluoreszenzanfärbungen von Gewebeschnitten

2.7.2.1 Expression der pAK7 in Rattenhoden und -hirnen

Nach der Klärung der pAK7-Lokalisation in EPK und APK wurde seine Expression in Rattenhoden und -hirnen durch indirekte Immunfluoreszenz untersucht. Da in Paraffin eingebettete Gewebeschnitte bereits zuvor nicht die erwünschte Signalstärke und -klarheit erbracht hatten (W. Hirschner, persönliche Mitteilung), wurden 10 μm dicke Gefrierschnitte für die Untersuchungen verwendet.

Immunfluoreszenz-Darstellung von pAK7 in Rattenhoden Für diese Methodik wurden Rattenhoden in unterschiedlichen Entwicklungsphasen aus jungen Ratten (25 bis 30 d alt) und von adulten Tieren isoliert, fixiert und gefriereschnitten. Nach Inkubation der Hodenquerschnitte mit pAK7-Antiserum, PIS oder präabsorbiertem Antiserum wurden die Schnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. In keinem Fall ergaben die Färbungen jedoch Hinweise auf eine eindeutige Lokalisation des Proteins, da alle Hodenquerschnitte nur unspezifisch und schwach angefärbt wurden. Die Bilder werden daher hier nicht wiedergegeben.

Immunfluoreszenzeinzelanfärbungen von adulten Rattengehirnen mit pAK7-Antiserum Im Gegensatz zur Situation im Hoden konnte die pAK7 nach Anfärbungen der Gewebeschnitte adulter Rattengehirne eindeutig in der Ependymschicht lokalisiert werden (Abb. 19 A). Das umgebende Parenchym zeigte keine Anfärbung. Wurden die Gewebeschnitte mit PIS (Abb. 19 B) oder Antiserum inkubiert, in dem die Antikörper zuvor mit immunogenem Peptid präabsorbiert worden waren (Abb. 19 C), so war kein Fluoreszenz-Signal zu beobachten.

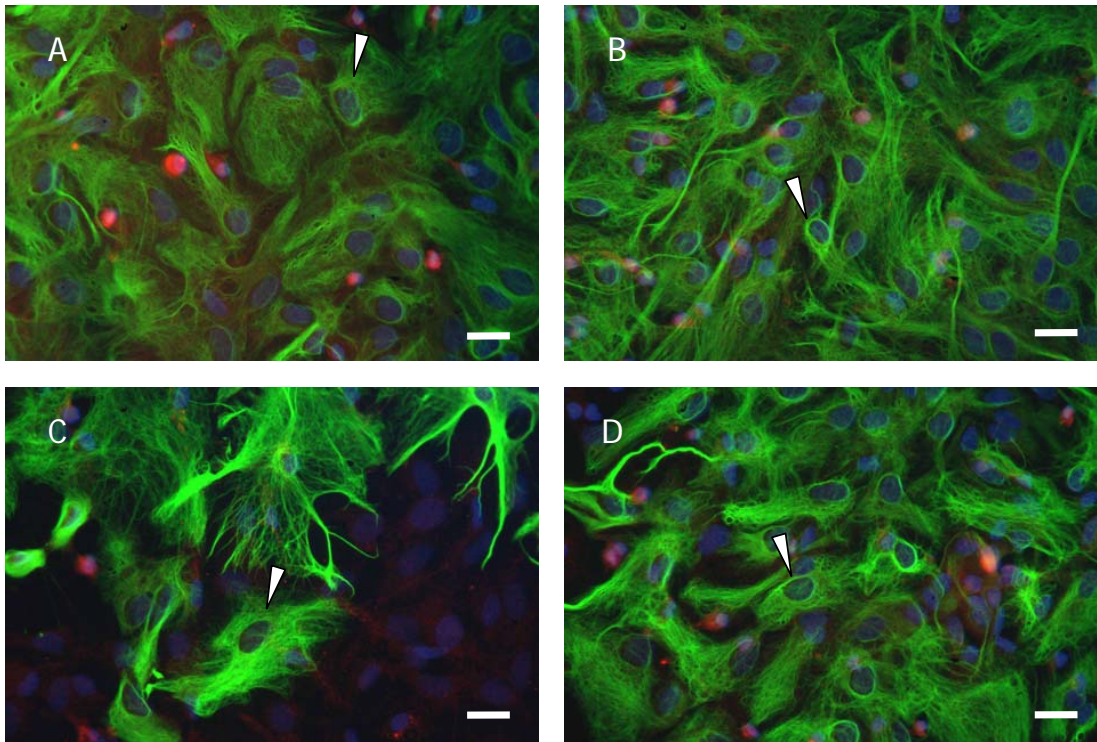


Abb. 18: Immunocytochemische Doppelfärbung einer 13 d alten Astrocytenprimärkultur (APK) mit GFAP-Antikörper und pAK7-Antiserum (A und C) bzw. pAK7-Präimmunserum (PIS) (B und D). Die auf Deckgläschen kultivierten, mit Paraformaldehyd fixierten Zellen wurden mit pAK7-Antiserum und verdünntem monoklonalem Antikörper gegen gliales fibrilläres saures Protein (engl.: “*glial fibrillary acidic protein*“, GFAP) aus Maus 2 h lang bei 37°C inkubiert. Als Zweitantikörper wurden anti-Kaninchen-IgG (Alexa 568-Konjugat) zur Markierung der pAK7 (rot) und anti-Maus-IgG (Alexa 488-Konjugat) zur Markierung von GFAP (grün) verwendet. Die Inkubationsbedingungen waren für beide Sekundärantikörper gleich (1 h bei RT). Die Zellkerne wurden mit 4'-6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI, blau, alle Bilder) gefärbt. Keine der GFAP-positiven Zellen exprimiert pAK7 (beispielhaft mit Pfeilspitzen gekennzeichnet), Anfärbungen mit pAK7-Antiserum (A und C) zeigen keinen Unterschied zu Anfärbungen mit PIS (B und D). Der Maßstab in allen Bildern entspricht 20 μm .

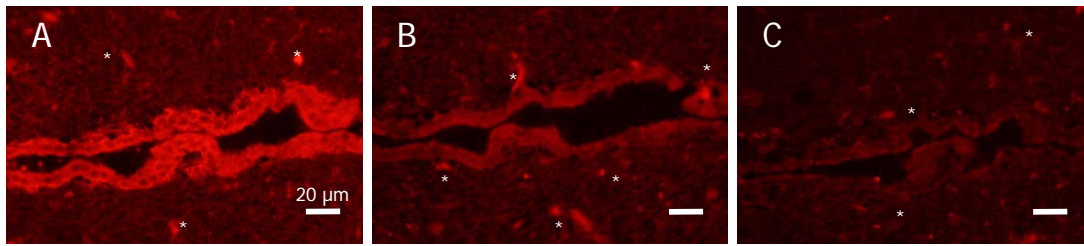


Abb. 19: Immunfluoreszenzdarstellung des Ependyms in adultem Rattengehirn durch Markierung mit pAK7-Antiserum. Die Region um den dritten Ventrikel des Gehirns wurde 2 h lang bei 37°C inkubiert mit (i) pAK7-Antiserum (A); (ii) dem entsprechenden Präimmenserum (B) und (iii) Antiserum, welches zuvor dem immunogenen Peptid ausgesetzt worden war (C). Als zweiter Antikörper wurde ein Alexa 568-Konjugat gegen Kaninchen-IgG 1 h lang bei RT appliziert. Autofluoreszenzsignale (*; Fluoreszenzsignal sowohl im grünen als auch im roten Kanal) rühren von blutgefüllten Kapillaren des Parenchyms her, wohingegen das Fluoreszenzsignal der Ependymschicht spezifisch ist. Der Maßstab in allen Bildern entspricht 20 μm .

Immunfluoreszenzdoppelanfärbungen von adulten Rattengehirnen mit Antikörpern gegen pAK7 und α -Tubulin Nach Doppelmarkierung der adulten Ventrikel mit monoklonalem Antikörper gegen α -Tubulin und pAK7-Antiserum konnte die Lokalisation des pAK7-Signals in ependymalen Zellen bestätigt werden. Wie bereits in Zellkultursystemen gezeigt, wurden nur kinocilientragende Zellen durch das pAK7-Antiserum markiert (Abb. 20).

2.7.2.2 Immunfluoreszenzdoppelanfärbungen der pAK7 und der Gehirniform der Glycogenphosphorylase (GP BB) in adulten Rattengehirnen

Analog der Situation in EPK konnte auch in adulten Ventrikeln Kolokalisation von pAK7 und GP BB nachgewiesen werden. Nach Inkubation der Gewebeschnitte mit den entsprechenden Antikörpern und anschließende Überlagerung der grünen und roten Fluoreszenzen wurde die Kolokalisation der beiden Proteine in der Ependymschicht erkennbar (Abb. 21).

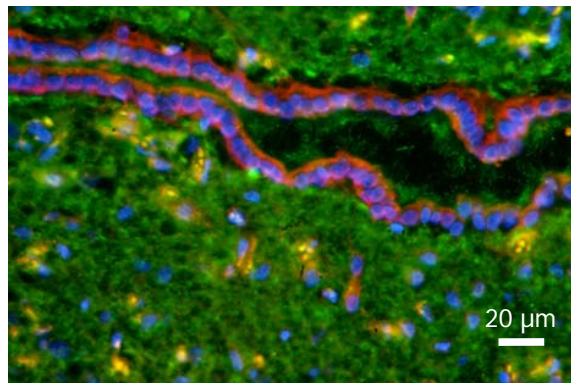


Abb. 20: Immunfluoreszenzmarkierung von pAK7 und α -Tubulin im Bereich des dritten Ventrikels eines adulten Rattengehirns. Das Gewebe wurde mit pAK7-Kaninchenantiserum und monoklonalem α -Tubulinantikörper aus Maus 2 h lang bei 37°C inkubiert. Als zweite Antikörper wurden anti-Kaninchen-IgG (Alexa 568-Konjugat; zur Markierung der pAK7) oder anti-Maus-IgG (Alexa 488-Konjugat; zur Markierung von α -Tubulin) eingesetzt. Inkubiert wurde 1 h lang bei RT. Zur Kernfärbung wurde 4'-6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI; blau) eingesetzt. Der Maßstab entspricht 20 μ m.

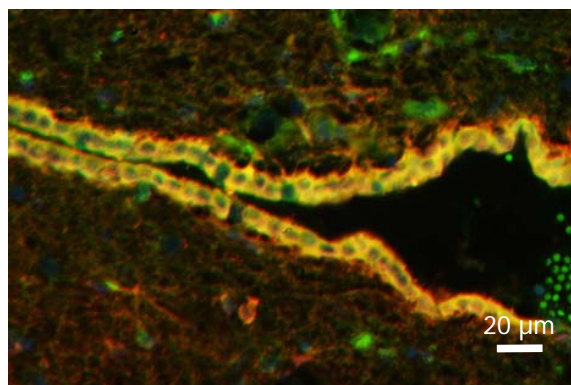


Abb. 21: Immunfluoreszenzdoppelanfärbung von pAK7 und der Gehirnisoform der Glykogenphosphorylase (GP BB) in Gehirnen adulter Ratten. Die 10 μ m dicken, mit Paraformaldehyd fixierten Gefrierschnitte wurden mit pAK7-Kaninchenantiserum und Antiserum aus Meerschweinchen gegen die Gehirnisoform der Glykogenphosphorylase (GP BB) 2 h lang bei 37°C inkubiert. Als zweiter Antikörper wurden anti-Kaninchen-IgG (Alexa 488-Konjugat) zur Markierung der pAK7 (grün) und mit Carbocyanin 3 (Cy3) konjugiertes anti-Meerschweinchen-IgG zur Markierung der GP BB (rot) angewandt. Inkubiert wurde 1 h lang bei RT. Die Zellkerne wurden mit 4'-6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI, blau) gefärbt. Durch optische Überlagerung der grünen und roten Fluoreszenzen entsteht eine gelbe Färbung der Zellen, in denen die beiden Proteine pAK7 und GP BB kolokalisiert sind. Der Maßstab entspricht 20 μ m.

2.7.2.3 Immunfluoreszenzdoppelanfärbungen der pAK7 und des α -Tubulins in Gehirnen embryonaler und neugeborener Ratten

Durch Analyse von Rattengehirnen in verschiedenen Entwicklungsphasen konnte die exklusive Lokalisation von pAK7 in kinocilientragenden Zellen bestätigt werden.

Darstellung von pAK7 und α -Tubulin in embryonalen Rattengehirnen 19 Tage nach der Befruchtung (E19) Am Tag 19 nach der Befruchtung findet man beim Rattenembryo noch keine Kinocilien, wie durch die fehlende Immunfluoreszenzanfärbung auf α -Tubulin erkennbar wird (Abb. 22 mit drei Beispielen A-C, Ventrikel gekennzeichnet mit Pfeilspitzen). Nach Inkubation der Schnitte mit pAK7-Antiserum ist ebenfalls keine Anfärbung zu sehen (Abb. 22 A-C).

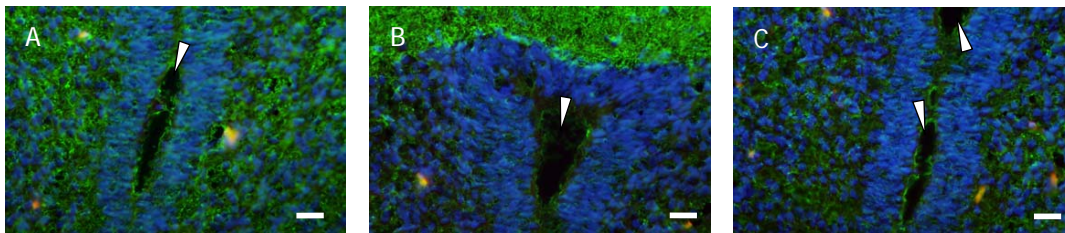


Abb. 22: Immunfluoreszenzdoppelanfärbung von pAK7 und α -Tubulin in Gehirnen 19 d alter Rattenembryos. Die 10 μm dicken, mit Paraformaldehyd fixierten Gefrierschnitte wurden mit pAK7-Kaninchenantiserum und monoklonalem α -Tubulinantikörper aus Maus 2 h lang bei 37°C gefärbt. Als zweiter Antikörper wurden anti-Kaninchen-IgG [Alexa 568-Konjugat; zur Markierung der pAK7 (rot)], bzw. anti-Maus-IgG [Alexa 488-Konjugat; zur Markierung von α -Tubulin (grün)] verwendet. Die Inkubation erfolgte 1 h lang bei RT. Die Zellkerne wurden mit 4'-6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI, blau, in A-C) gefärbt. Die Ventrikel wurden mit Pfeilspitzen gekennzeichnet. Weder durch Anfärbung mit α -Tubulinantikörper, noch durch Anfärbung mit pAK7-Antiserum konnten Zellen markiert werden. Der Maßstab in allen Bildern entspricht 20 μm .

Darstellung von pAK7 und α -Tubulin in Gehirnen neugeborener Ratten In Ratten beginnt die ependymale Differenzierung während der ersten Woche nach der Geburt in der Region des cerebralen *Aqueductes* (Banizs *et al.*, 2005). Daher ist eine Anwesenheit von pAK7 nur in Bereichen des Ependyms zu erwarten, in denen die Differenzierung soweit fortgeschritten ist, dass sich bereits Kinocilien entwickelt haben. Kinocilien sind im Gewebeschnitt deutlich erkennbar, da sie in das Lumen der Ventrikel ragen. Die große Masse der Zellen der Ependymschicht ist bei neugeborenen Ratten jedoch unciliert oder trägt nur ein primäres Cilium. Sie wird daher nicht durch das pAK7-Antiserum

markiert (Abb. 23).

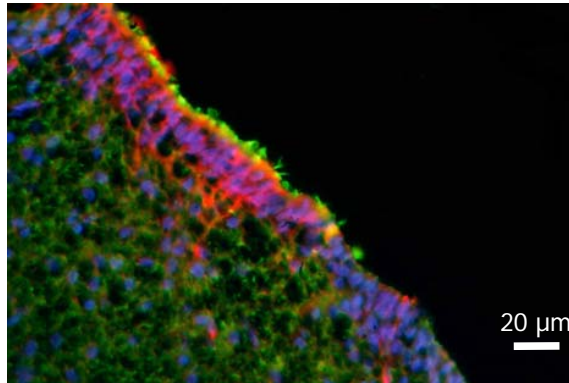


Abb. 23: Immunfluoreszenzdoppelfärbung von pAK7 und α -Tubulin in Gehirnen neugeborener Ratten. Die 10 μm dicken, mit Paraformaldehyd fixierten Gefrierschnitte wurden mit pAK7-Kaninchenantiserum und monoklonalem α -Tubulinantikörper aus Maus 2 h lang bei 37°C inkubiert. Als zweiter Antikörper zur Markierung der pAK7 wurde anti-Kaninchen-IgG-Alexa 568-Konjugat eingesetzt (rot). Zur Markierung von α -Tubulin wurde anti-Maus-IgG-Alexa 488-Konjugat (grün) verwendet. Mit beiden Sekundäranantikörpern wurde 1 h lang bei RT inkubiert. Die Zellkerne wurden mit 4'-6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI, blau) gefärbt. Die Abbildung zeigt die Expression von Kinocilien und pAK7 im vierten Ventrikel.

Anfärbung von Gehirnen 2 Tage alter Ratten auf pAK7 und α -Tubulin Im Gehirn 2 d alter Ratten sind Kinocilien und pAK7 in allen Ventrikeln kolokalisiert, wie am Beispiel des dritten Ventrikels dargestellt (Abb. 24). Das letzte darin noch verbliebene kinocilienfreie Areal ist erst schwach mit pAK7 markiert (Kennzeichnung durch *). In den übrigen Bereichen mit Cilien ist eine starke Anfärbung mit pAK7 erkennbar (Kennzeichnung mit Pfeilspitzen).

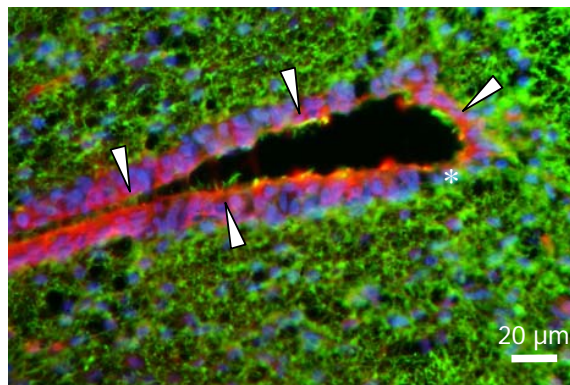


Abb. 24: Immunfluoreszenzdoppelanfärbung des Gehirns einer 2 d alten Ratte auf pAK7 und α -Tubulin. Die 10 μ m dicken, mit Paraformaldehyd fixierten Gefrierschnitte wurden mit pAK7-Kaninchenantiserum und monoklonalem α -Tubulinantikörper aus Maus 2 h lang bei 37°C inkubiert. Als zweite Antikörper wurden anti-Kaninchen-IgG-Alexa 568-Konjugat zur Markierung der pAK7 (rot), bzw. anti-Maus-IgG-Alexa 488-Konjugat zur Markierung von α -Tubulin (grün) verwendet. Mit beiden Antikörpern wurde 1 h lang bei RT inkubiert. Die Pfeilspitzen markieren Bereiche mit kinocilientragende Zellen. An der mit * gekennzeichneten Stelle haben sich noch keine Kinocilien gebildet, eine Expression von pAK7 kann in diesem Bereich ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Die Zellkerne wurden mit 4'-6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI, blau) gefärbt.

2.8 Test der pAK7 auf Adenylatkinase-Aktivität

Zur Überprüfung der Funktion von pAK7 wurde ein Enzymtest durchgeführt (Wirschell *et al.*, 2004). Die Messungen der enzymatischen Aktivität wurden in Reaktionspuffer (55 mM Tris, pH 7.9 mit 40 mM Glucose, 2 mM MgCl₂, 2.0 mM NADP) unter Zusatz von je 1 U/ml Hexokinase und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 1 mM Natrium(meta)vanadat als Dynein-ATPasen-Inhibitor sowie 1 mM ADP durchgeführt. Dieser Reaktionsansatz wurde 10 min lang bei RT vorinkubiert, um eventuell vorhandene, die Messung verfälschende Spuren von ATP zu beseitigen. Danach wurde die Reaktion mit Zellhomogenat oder Myokinase gestartet. Die Zunahme der NADPH-Konzentration in allen Ansätzen wurde in einem temperierbaren Photometer bei 340 nm über insgesamt 10 min vermessen, wobei alle 30 s ein Messwert erhoben wurde. Alle Messungen wurden stets als Dreifachbestimmungen durchgeführt. Der Test wurde mit kommerziell erworbener Kaninchen-Myokinase etabliert (Abb. 25 A-D).

In Vorversuchen wurde zunächst der Einfluss verschiedener Mengen HEK-Zellhomogenat auf die Messungen untersucht. Dazu wurden 1, 6, 8, 10 und 12 μ g Protein enthaltendes Zellhomogenat in Kombination mit 0.1 U Myokinase vermessen. Es waren jedoch kaum Unterschiede zwischen den einzelnen Messwerten auszumachen (Abb. 25 D). Aus der Überlegung heraus, dass in den späteren Messungen überexprimierte Enzyme auf ihre Myokinase-Aktivität hin untersucht werden sollten, war es entscheidend, soviel Zellhomogenat zu verwenden, dass die Enzym-Aktivität deutlich bestimmbar sein würde. Diese Voraussetzungen schienen für 8 μ g Zellprotein gegeben zu sein und konnten später durch den Einsatz von rekombinante Adenylatkinase 1 (AK 1) aus der Ratte heterolog exprimierende HEK293T-Zellen als Positivkontrolle im etablierten Test bestätigt werden (s.u.).

Zur Bestimmung der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der eingesetzten Menge Myokinase wurden in den Reaktionsansätzen 0.3, 0.5, 0.75 und 1 U Myokinase in Kombination mit je 8 μ g Protein enthaltendem HEK-Zellhomogenat eingesetzt und die Zunahme der Extinktion bei 340 nm gemessen. Aus diesen Messungen ergab sich als optimale Enzymmenge für positive Kontrollen 0.5 U Myokinase, für die ein linearer Reaktionsverlauf über 10 min detektiert werden konnte (Abb. 25 A und B).

Zur Bestimmung der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration wurden ca. 8 μ g Protein enthaltende HEK-Zellsuspension homogenisiert und mit je 0.5 U Myokinase und unterschiedlichen Konzentrationen von Substrat (0.3, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2 und 2.5 mM ADP) gemischt, bevor die Zunahme der NADPH-Konzentration

in den jeweiligen Reaktionsansätzen verfolgt wurde. Für alle weiteren Messungen und zur Bestimmung der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der eingesetzten Myokinasekonzentration wurde ADP stets in einer Konzentration von 1.5 mM verwendet, da diese Substratkonzentration maximale Myokinase-Aktivität ergab (Abb. 25 C).

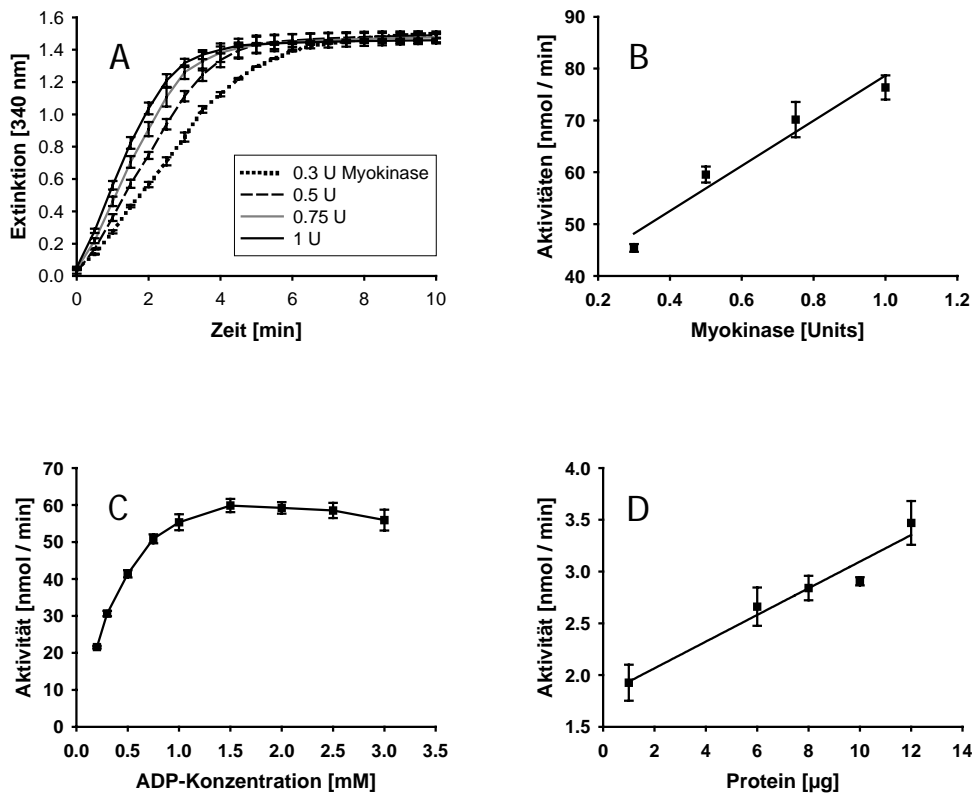


Abb. 25: Etablierung des Tests zur Überprüfung der Adenylatkinase-Aktivität. Gemessen wurde nach einer 10minütigen Vorinkubation bei RT. Anschließend wurde der Absorptionsanstieg bei 340 nm und 37°C 10 min lang alle 30 s abgelesen. (A) Darstellung der gemessenen Extinktionen gegen die Zeit für für 0.3-1 U Myokinase. (B) Bestimmung der Abhängigkeit der Umsatzgeschwindigkeit von der Enzymmenge (Steigungen im linearen Bereich der Kurven aus A gegen Enzymmenge; Mittelwerte \pm Standardabweichungen). Für alle folgenden Messungen wurden 0.5 U Myokinase eingesetzt. (C) Bestimmung der Abhängigkeit der Umsatzgeschwindigkeit von der Substratkonzentration (0.3-3 mM ADP; Mittelwerte \pm Standardabweichungen). Für alle folgenden Messungen wurden 1.5 mM ADP eingesetzt. (D) Bestimmung der Grundaktivität von Zellhomogenaten aus untransfizierten HEK293T-Zellen (1-12 μ g Protein; Mittelwerte \pm Standardabweichungen). Für alle weiteren Messungen wurden 8 μ g Protein eingesetzt. Genaue Durchführung des Tests: siehe Material und Methoden 4.2.23.

Als Kontrollen sollten jeweils rekombinante Adenylatkinase 1 (AK 1) aus der Ratte, heterolog exprimierende HEK293T-Zellen (Positivkontrolle) und untransfizierte HEK-Zellen (Negativkontrolle) eingesetzt werden. Zur permanenten Überexpression wurde die AK1-Expressionssequenz in den lentiviralen Vektor pWPXL kloniert (vergleiche 4.2.7.18). Mit dem entstandenen Virus wurden anschließend stabile HEK293T-Zelllinien erzeugt. Zum Zweck der Nachweisbarkeit der rekombinanten AK1 mittels “Western blot“ (nicht dargestellt) und indirekter Immunfluoreszenz wurde ihr C-Terminus um die Sequenz des Peptids CDFLAEYLFKNNPEMQ ergänzt, welches vorher zur Erzeugung der gegen pAK7 gerichteten Antikörper eingesetzt worden war (Abb. 26 A1 und A2). Nachweislich AK1 exprimierende Zelllinien konnten dann dank ihrer Adenylatkinaseaktivität als Positivkontrolle im Enzymtest eingesetzt werden.

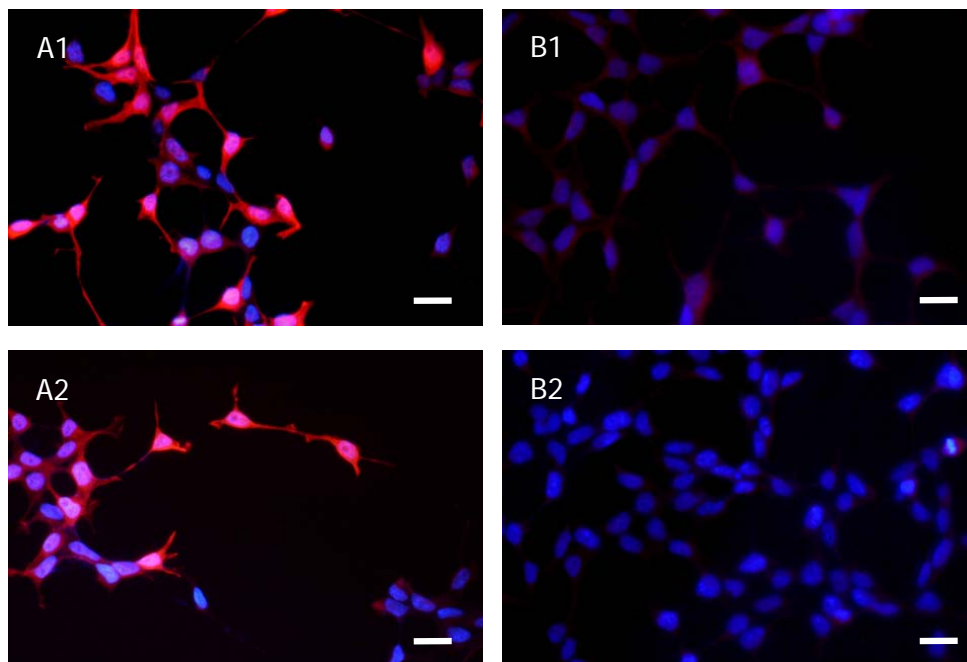


Abb. 26: Immunfluoreszenzanfärbung lentiviral transfizierter HEK293T-Zellen zum Nachweis der Expression eines Fusionsproteins von AK1 aus Ratte mit dem immunogenen Peptid mit der Sequenz CDFLAEYLFKNNPEMQ aus dem C-Terminus der pAK7. Die auf Deckgläschen kultivierten und mit Paraformaldehyd fixierten Zellen wurden 2 h lang bei 37°C mit pAK7-Antiserum (A1, A2) bzw. Präimmunsereum (B1, B2) inkubiert und das Antigen indirekt über anti-Kaninchen-IgG (Alexa 568-Konjugat, rot) detektiert. Mit dem zweiten Antikörper wurde 1 h lang bei RT inkubiert. Die Zellkerne wurden mit 4'-6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI, blau) gefärbt. Der Maßstab entspricht jeweils 20 μm . Zellen, die das Fusionsprotein exprimieren, sind an ihrer roten Anfärbung deutlich zu erkennen (A1 und A2). Zellen, die mit PIS angefärbt wurden, zeigen kein pAK7-Signal (B1 und B2).

Zur permanenten Überexpression von pAK7 in HEK293T-Zellen wurde die pAK7-Vollängensequenz in den Vektor pWPXL eingesetzt, klonal vermehrt und zur Produktion von Lentiviren genutzt. Die Expression von pAK7 wurde ebenfalls immunocytochemisch (Abb. 27 A) und im “Western blot“ (nicht gezeigt) mit dem pAK7-Antiserum nachgewiesen. Die nachweislich pAK7 exprimierenden Zelllinien wurden mittels Enzymtest auf ihre Adenylatkinaseaktivität untersucht.

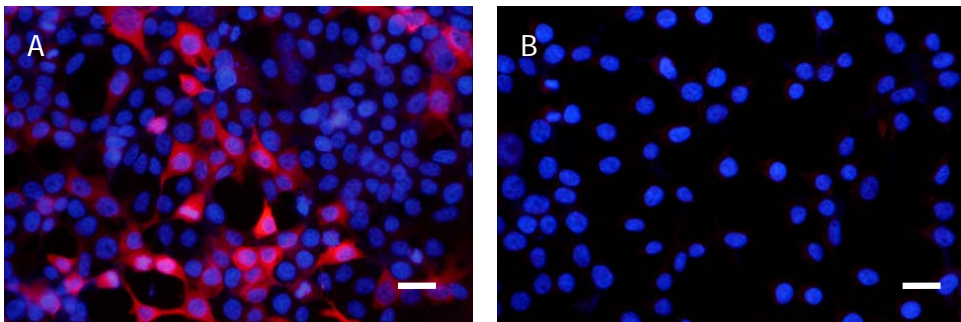


Abb. 27: Immunfluoreszenz-Markierung lentiviral transfizierter HEK293T-Zellen mit pAK7-Antiserum zum Nachweis der Expression von pAK7. Die auf Deckgläschen kultivierten und mit Paraformaldehyd fixierten Zellen wurden 2 h lang bei 37°C mit pAK7-Antiserum (A) bzw. Präimmunsereum (B) inkubiert und das Antigen indirekt über anti-Kaninchen-IgG (Alexa 568-Konjugat, rot) detektiert. Mit dem zweiten Antikörper wurde 1 h lang bei RT inkubiert. Die Kerne wurden mit 4'-6-Diaminidino-2-phenylindol (DAPI, blau) gefärbt. Der Maßstab entspricht jeweils 20 μm . pAK7-exprimierende Zellen sind an ihrer roten Anfärbung deutlich zu erkennen (A). Zellen, die mit PIS angefärbt wurden, zeigen kein pAK7-Signal (B).

Zur Herstellung der für die Messungen benötigten Zellhomogenate aus transfizierten (AK1-Positivkontrolle oder pAK7) oder untransfizierten HEK-Zellen (Negativkontrolle) wurden die in 200-2000 μl Suspension enthaltenen Zellen im doppelten Volumen Trispuffer mittels Ultraschall aufgeschlossen. Sodann wurde 3×10 min lang bei 4°C und 14000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues passendes Zentrifugengefäß überführt und für die Messungen eingesetzt. Unter den gegebenen Testbedingungen (vgl. Material und Methoden 4.2.23) wiesen nur Myokinase und rekombinante Rattenadenylatkinase 1 Adenylatkinaseaktivität auf, nicht jedoch pAK7. pAK7-exprimierende Zellen zeigten dieselbe schwache Hintergrundaktivität wie die zur Negativkontrolle eingesetzten HEK-Zellen (Abb. 28).

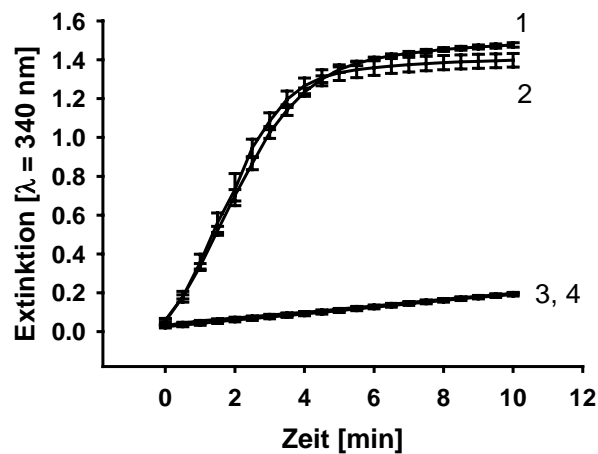


Abb. 28: Enzymtest auf Adenylatkinase-Aktivität zur Überprüfung der Funktionalität überexprimierter pAK7. Die Messungen erfolgten nach einer 10minütigen Vorinkubation bei RT. Anschließend wurde der Absorptionsanstieg bei 340 nm und 37°C 10 min lang alle 30 s abgelesen. Als Positivkontrolle wurde HEK-Zellhomogenat mit überexprimierter AK1 aus Ratte verwendet (Kurve 1) sowie 0.5 U Myokinase aus Kaninchen gemischt mit HEK-Zellhomogenat (Kurve 2). Als Negativkontrolle diente reines HEK-Zellhomogenat (Kurve 3). Zur Messung der pAK7 wurde HEK-Zellhomogenat mit überexprimierter pAK7 verwendet (Kurve 4). Die Kurven 3 und 4 überlagern sich und sind daher optisch nicht zu unterscheiden. Darstellung der jeweiligen Mittelwerte \pm Standardabweichungen.

2.9 Suche nach Interaktionspartnern der pAK7 mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems

AK-Domänen enthaltende Proteine wurden bereits mehrfach im Zusammenhang gebracht mit Ciliogenese (Kpl2; Ostrowski *et al.*, 1999), Cilienaufbau (cpc1; Zhang und Mitchell, 2004) oder Cilienschlag (Oda5p-assoziierte AK; Wirschell *et al.*, 2004). Lokalisation von Adenylatkinasen sowohl in Cilien als auch in Flagellen erscheint im Hinblick auf ihre ATP-generierende enzymatische Reaktion begründet. Das ATP kann dann anschließend an die molekularen Motoren des Axonems abgegeben werden. Für einen effektiven Cilienschlag konnte dies von Zhang und Mitchell (2004) in *Chlamydomonas reinhardtii* gezeigt werden. Ford (2006) postulierte für den Flagellenschlag von Spermien das Vorliegen eines Kinasen-getriebenen ATP-Transfer-“shuttles“. Mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System wurde nach Interaktionspartnern der pAK7 gesucht, die möglicherweise Aufschluss über die Funktion dieses ATP-Transfer-“shuttle“-Proteins geben könnten. So könnte beispielweise Interaktion von pAK7 mit “outer arm dynein“ ein Hinweis auf die direkte Beteiligung von pAK7 am Cilienschlag sein.

Da pAK7 im Hoden stark exprimiert wird, wurde zunächst eine humane Hoden-cDNA-Bibliothek unter Verwendung des “Matchmaker Gal4 Two-Hybrid Systems 3“ mit der pAK7-Volllänge-Sequenz durchsucht. Im Vorfeld der Hefeverpaarung wurden Tests auf Proteinexpression, Toxizität und Autoaktivierung des pAK7-Proteins durchgeführt. Diese Tests ergaben, dass die pAK7 schwach exprimiert wurde und für die mit dem pAK7-Köderplasmid transfizierten Hefen weder toxisch noch autoaktivierend war. Nach der Hefeverpaarung fand sich jedoch kein einziger Hefeklon, der nach Durchführung von Tests auf α - und β -Galaktosidasebildung eine Proteininteraktion bestätigte. Von weiteren Tests (z. B. PCR zum Nachweis von Köder- und Bibliotheksplasmid, Restriktionsverdau der isolierten Plasmide) mit den in diesem Suchlauf erhaltenen Hefeklonen wurde daher abgesehen.

Daraufhin wurde der Anteil der pAK7 am als Köder dienenden Gal4-Fusionsprotein auf den C-Terminus reduziert, gegen den auch der Peptid-Antikörper gerichtet ist. Wie auch das pAK7-Volllängeprotein wurde die verkürzte Variante des Köderkonstrukts nur schwach exprimiert, und war für die mit dem pAK7-Köderplasmid transfizierten Hefen weder toxisch noch autoaktivierend. Die humane Hoden-cDNA-Bibliothek wurde mit diesem Köder durchforstet. Der Suchlauf resultierte in 17 scheinbar positiven Klonen, bei denen α - und β -Galaktosidase gebildet wurden. Nach Durchführung der Rückverpaarung stellten sich 5 der Klone jedoch als “autoaktiv“ heraus und wurden nicht weiter untersucht.

Unter "autoaktiv" versteht man, dass die Hefen nicht wie erwartet nur nach erfolgreicher Interaktion auf Mangelmedium wachsen und α - und β -Galaktosidase bilden, sondern auch wenn sie nur ein Bibliotheks- und kein Köderprotein exprimieren. Das Bibliotheksprotein besitzt in diesem Fall die Fähigkeit, auch ohne Interaktionspartner die Reportergene der Hefen zu aktivieren.

Die verbliebenen 12 Kandidaten wurden einer NCBI-Datenbankanalyse unterworfen. Ziel war es, Hinweise auf die jeweiligen gewebe-, zell-, zeit- oder kompartimentspezifische Expression zu finden. Nach Abschluss der Analyse wurden 8 weitere Klone ausgeschlossen, da sie in Verbindung mit den Grundeigenschaften der pAK7 (cytosolisch und endoplasmatisch) nicht als potentielle Interaktionspartner in Betracht kamen. Die verbliebenen vier Klone sind in Tabelle 3 aufgeführt. Allerdings konnten die zu Klon 3 und 11 korrespondierenden mRNAs durch RT-PCR nicht in EPK nachgewiesen werden, sodass deren Translationsprodukte als native Interaktionspartner entfallen. Die zu den Klonen 25 und 29 korrespondierenden mRNAs konnten durch RT-PCR in EPK nachgewiesen werden. Diese Klone mussten aber ebenfalls als Interaktionspartner ausgeschlossen werden, weil die cDNA-Einschübe der aus Klon 25 und 29 isolierten Plasmide zum damaligen Zeitpunkt jeweils nur einem Bereich im 3'UTR (nicht translatierter Bereich, der sich an den offenen Leserahmen anschließt, engl.: *untranslated region*) des jeweiligen Transkripts zugeordnet werden konnten. Mittlerweile findet man jedoch eine kodierende Sequenz mit entsprechend exprimiertem Protein (siehe Klon 29, Tabelle 3).

Tabelle 3: Übersicht über die möglichen Interaktionspartner von pAK7 aus dem durchgeführten Hefe-Zwei-Hybrid-Versuch. Dargestellt sind die Ergebnisse einer NCBI-Recherche mit Hilfe des Programms BLASTX (nr), bei der die zu den Klonen 3, 11, 25 und 29 korrespondierenden Proteine in *Homo sapiens* gesucht wurden (“Ergebnis BLASTX (nr)“). Zur zusätzlichen Charakterisierung der Proteine werden Pubmed-Zugriffscodes und Prozesse, bei denen das jeweilige Protein beteiligt ist, angegeben (“Zugriffscodes (Pubmed)“ und “Prozesse“). Die Bereiche, deren Aminosäuren an der im durchgeführten Hefe-Zwei-Hybrid-Versuch nachgewiesenen Interaktion beteiligt waren, werden ebenfalls aufgeführt (interagierender Bereich, “IB“; Angabe der interagierenden Aminosäuren (Aa) Aa n bis Aa $n+x$).

Klon	Ergebnis BLASTX (nr)	“Zugriffscodes“ (Pubmed)	IB	Prozesse
3	<i>testis development-related NYD-SP20B</i>	AAK51120	Aa 155-320	Hodenentwicklung
11	<i>dickkopf-like 1 (soggy) precursor</i>	NP055234	Aa 86-242	Morphogenese
25	<i>SEC24-related protein C</i>	NP 004913.2	Aa 964-1094	Vesikelvermittelter Transport
29	<i>unnamed protein product</i> aus Lunge	BAB15704	Aa 49-220	Unbekannt

Kapitel 3

Diskussion

3.1 Subtraktionseffizienz der eingesetzten subtraktiven cDNA-Bibliotheken und Reproduzierbarkeit der erhaltenen Daten

Ob Herstellung und Durchsuchung einer subtraktiven cDNA-Bibliothek effizient verliefen, läßt sich am besten an der Häufigkeit messen, mit der Transkripte von Genen gefunden werden, die nachweislich nur in den zu untersuchenden Zellen oder Geweben exprimiert werden. Bei subtraktiven cDNA-Bibliotheken aus Ependym oder Subcommissuralorgan sind dabei Gene charakteristisch, die bekanntermaßen mit Kinocilien in Verbindung stehen. Sie können als interne Kontrolle angesehen werden. Darunter fällt z. B. Spag6, ein Bestandteil des Zentralapparates von 9+2-Kinocilien (Sapiro et al., 2000).

Mit der in dieser Arbeit beschriebenen Anwendung von SSH und den dabei entstandenen subtraktiven cDNA-Bibliotheken konnten im Arbeitskreis um S. Verleysdonk bereits 1500 cDNA-Klone untersucht werden, die Teile von Transkripten ependymspezifischer oder ciliärer Proteine enthielten (Verleysdonk, 2006). Nach Sequenzierung von 85 Klonen enthielten beispielsweise 6 cDNA-Klone Teilsequenzen des Spag6-Leserahmens und 5 Klone Teile des Leserahmens des kinocilienassoziierten Wdr16-Proteins (Hirschner *et al.*, 2007). Jedoch wurde nur ein Klon gefunden, der für einen Teil des pAK7-Proteins kodiert.

3.2 Gemeinsames Vorkommen von pAK7 und Kinocilien

Durch “Real-time“-RT-PCR konnte gezeigt werden, dass die mRNA von pAK7 in kinocilientragenden Zellen und Geweben im zeitlichen Verlauf parallel zu denjenigen der Kinocilienmarker Spag6 und Hydin transkribiert wird. Sie zeigt jedoch keine Parallelen zum zeitlichen Verlauf der mRNA von Polaris, einem Indikatorprotein für primäre Cilien (Haycraft *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu Kinocilien sind primäre Cilien bereits im Hodengewebe des Embryos (Ward *et al.*, 2003) nachweisbar. Bedingt dadurch kommt auch Polaris-mRNA in geringen Mengen bereits in frühen Entwicklungsstufen der Rattenhoden vor, wie in Abb. 12 K erkennbar ist. Der starke Anstieg der Polaris-mRNA im Hoden ab Tag 10 *post partum* ist mit dem erhöhten Bedarf an Polaris und anderen IFT-Komponenten beim Aufbau der Spermienflagellen begründet.

Durch Untersuchungen des zeitlichen pAK7-Expressionsprofils in verschiedenen Geweben mittels “Western blot“ wurden die auf Transkriptionsebene erhaltenen Ergebnisse bestätigt. Auch auf Proteinebene wurde pAK7 nur in kinocilientragenden Zellen gefunden. Die auffällige Abwesenheit eines pAK7-Signals in “Western blots“ mit Lungenhomogenat (Ergebnisse Abb. 10) läßt sich damit begründen, dass die vorhandene Menge pAK7 unter der Nachweisgrenze lag, was aufgrund der RT-PCR-Analysen, bei denen nur wenig pAK7-mRNA nachgewiesen werden konnte, mit einiger Wahrscheinlichkeit zu erwarten war. Ein analoger Fall wurde durch Zhang *et al.* (2002) beschrieben, bei dem das in Mäusen gefundene Homologe des axonemalen Proteins Pf20 per “Immunoblot“ nur in Hoden, nicht aber in der Lunge nachgewiesen werden konnte, obwohl beide Gewebe Kinocilien besitzen und daher das Protein aufweisen sollten.

Die auf den “Blot“-Membranen für Leber, Niere, Herz und Hoden beobachteten Zusatzbanden im unteren Molekularmassenbereich ließen sich mit Hilfe von NCBI-Datenbankrecherchen nicht erklären. Eine zunächst im adulten Rattenhoden entdeckte Zusatzbande wurde in weiteren Experimenten mit Hoden unterschiedlichen Alters stets in gleicher Intensität wiedergefunden. Für alle Experimente wurden die Hoden von 4-30 d alten sowie von adulten Ratten verwendet; Vierfachbestimmungen wurden durchgeführt. Auch durch Zusatz von Proteaseinhibitoren oder den Einsatz gereinigter Antikörper (siehe 4.2.13) konnten die unerwarteten “Western blot“-Signale nicht in ihrer Intensität verringert werden. Selbst nach Inaktivierung aller Enzyme sofort nach Organentnahme durch Homogenisation in heißem SDS traten die Zusatzbanden ebenfalls auf. Diese sind also nicht auf Abbauprodukte der pAK7 zurückführbar. Eine mögliche Erklärung für ihr Auf-

treten wäre das Vorhandensein von Proteinen entsprechender Molekularmassen, mit denen das Antiserum kreuzreagiert. Dazu müßten sie die selbe Aminosäuresequenz wie das zur Immunisierung verwendete Peptid aufweisen. Offenbar weist der polyklonale Antikörper, dessen Affinität zum Antigen ohnehin nicht sehr hoch ist (siehe auch Ergebnisse 2.4, "Western blot"), Affinität zu Epitopen auf, die denen des Immunisierungspeptids ähneln und Teile anderer Proteine sind, welche keine Beziehung zu pAK7 haben. Entstehung der Zusatzbanden durch Antikörper aus dem Antiserum, die nicht auch pAK7 erkennen, kann jedoch ausgeschlossen werden, da nach Vorinkubation des Serums mit immunogenem Peptid **alle** im "Western blot" vorhandenen Signale (4.2.19.2) vom "Blot" verschwanden.

Bei der Analyse des Verlaufs der pAK7-Expression in EPK konnte deutlich gezeigt werden, dass das Genprodukt ab Tag 7 auftaucht, also ab dem Zeitpunkt der Kinocilienbildung in diesen Primärkulturen (Tritschler *et al.*, 2007). Im Vergleich zu EPK bleibt das Expressionsniveau von pAK7 in APK erwartungsgemäß gering, da APK stets nur einen geringen Prozentsatz "kontaminierender", kinocilientragender Ependymzellen enthalten (B. Hamprecht, persönliche Mitteilung; D. Gschwend, unveröffentlichte Daten). Die resultierende Menge pAK7-Protein reicht offenbar nicht aus, um im verwendeten "Western blot"-System nachgewiesen werden zu können.

Bei "Western blots" mit Rattenhoden unterschiedlichen Alters konnte die pAK7 ab einem Alter von 25-26 Tagen als schwache Bande nachgewiesen werden. Nach Zhengwei *et al.* (1990) beginnt die Produktion von Spermatozyten im Rattenhoden im Alter von 24 Tagen, wenn die Anzahl primärer, axonemfreier Spermatozyten ihren Höhepunkt erreicht. Dies bekräftigt erneut, dass pAK7 mit Kinocilien kolokalisiert ist, da das Axonem der Spermienflagellen bei Säugern nach Irons und Clermont (1982) erst im Spermatozytenstadium gebildet wird. Offenbar kann das Protein – vermutlich aufgrund der niedrigen Affinität des Antikörpers zum Antigen – erst ab einem etwas späteren Zeitpunkt zweifelsfrei nachgewiesen werden.

Die Immunanfärbungen von EPK und APK sowie angefärbte Gehirnschnitte neugeborener, 2 d alter und adulter Ratten zeigen eine ausschließliche Lokalisation der pAK7 in kinocilientragenden Ependymzellen. Auch ist deutlich erkennbar, dass die pAK7 erst zum Zeitpunkt der Kinocilienbildung und ependymalen Ausdifferenzierung auftritt. Dabei beginnt die Proteinsynthese offensichtlich im Bereich des Aquädukts und breitet sich von dort in die Ventrikel aus. Die Anfärbungen von 10 μm dicken Hodengefrierschnitten unterschiedlich alter Ratten wurden ursprünglich durchgeführt, um weitere Hinweise zu bekommen, wo und wann die pAK7 in cilientragenden Zellen exprimiert wird. Die Färbun-

gen konnten aufgrund des ungünstigen Signal-Hintergrundverhältnisses nicht ausgewertet werden, wodurch die initiale Fragestellung zum “wo“ und “wann“ bestehen bleibt.

pAK7-Transkripte und das pAK7-Protein treten erst mit der Differenzierung kinocili-entragender Zellen auf. Transkripte und Protein fehlen hingegen in mono- und uncili-ierten Zellen. Daher kann die pAK7 – ebenso wie Wdr16 (Hirschner *et al.*, 2007) – als Differenzierungsmarker kinocili-entragender Zellen angesehen und in EPK und Gehirn zur Markierung und Detektion polycilii-erter Zellen verwendet werden.

3.3 Kolokalisation von pAK7 mit der Gehirnisoform der Glycogenphosphorylase

Im Gehirnparenchym findet man GP BB in Ependymzellen. Nach Doppelanfärbung von Zellkulturen und Gehirnschnitten mit pAK7- und GP BB-Antisera zeigt sich Kolokalisation der beiden Proteine in Ependymzellen. Es wird angenommen, dass das ependymale Glykogen einen zelleigenen Energiespeicher darstellt, der bei Bedarf durch die GP BB mobilisiert werden kann (Cataldo und Broadwell, 1986; Prothmann *et al.*, 2001). Ein Beispiel für derart gesteigerten Energiebedarf wäre die durch Serotonin oder Noradrenalin ausgelöste Erhöhung der Schlagfrequenz der ependymalen Kinocilien, die mit einem Abbau des zellulären Glycogens einhergeht (Nguyen *et al.*, 2001; Prothmann *et al.*, 2001; Verleysdonk *et al.*, 2005). Auch Natriuretische Peptide können der Grund für einen gesteigerten Energieverbrauch sein. Sie führen nachweislich zu einer Erhöhung der cytosolischen cGMP-Konzentration in Ependymzellen und bedingen dadurch möglicherweise vermehrte aktive, ATP-verbrauchende Ionentransportprozesse (Wellard *et al.*, 2003; 2006).

3.4 Mögliche Interaktionspartner von pAK7

In den durchgeführten Hefe-Zwei-Hybrid-Experimenten konnten keine physiologischen Interaktionspartner für pAK7 gefunden werden. Bei allen Hefeverpaarungen wurden 2 ml einer Hefebank eingesetzt, die schon mindestens zwei Jahre gelagert worden war. Von dieser wurden für die drei parallel durchgeführten Verpaarungen pro Ansatz nur 670 μ l eingesetzt (entsprechend $\frac{2}{3}$ der vom Hersteller angegebenen Menge der Bank; siehe Methoden 4.2.22.4), um nicht unterschiedliche Herstellungschargen der Bank miteinander zu vermischen. Die Nachteile, die durch die Abweichungen vom Herstellerprotokoll bei der

Durchführung der Hefeverpaarung entstanden sind, spiegeln sich in der geringen Transfektionseffizienz wieder. Zunehmendes Alter der Hefen wirkt sich negativ auf deren Fähigkeit aus, durch Fusion haploider Hefen diploide Zellen zu bilden. Dadurch gelangen weniger Köder- und Bibliotheksplasmide in die gleiche Hefezelle. In der Folge können weniger Köderproteine mit unterschiedlichen Bibliotheksproteinen interagieren als mit einer neu hergestellten Hefebank theoretisch möglich.

Die nucleäre Lokalisation der Fusionskonstrukte ist beim Hefe-Zwei-Hybrid-System die Voraussetzung für eine Aktivierung der Reportergene und deren Transkription. Mit dem pAK7-Vollängenprotein konnten keine physiologischen Interaktionspartner von pAK7 gefunden werden. Es wurde angenommen, dass das Fusionsprotein aus pAK7 und Gal4-DNA-Bindungsdomäne (BD) mit einer berechneten und experimentell bestätigten Masse von 105.7 kDa zu groß sei, um effizient in den Kern zu gelangen. Daher wurden sechs Teilstücke der pAK7-cDNA-Sequenz kloniert, deren Expression zu Fusionsproteinen mit molekularen Massen von 44 bis 56.5 kDa führte. Von diesen Konstrukten konnte nur mit einer den C-Terminus der pAK7 umfassenden Variante (49.7 kDa), ein Hefe-Zwei-Hybrid-Experiment erfolgreich durchgeführt werden. Nach Ausplattierung dieses Verpaarungsansatzes auf unterschiedlichen Medien zur Selektion wuchsen 80 diploide Klone. Von diesen Klonen wurden 17 nachanalysiert (z. B. durch X- α - und X- β -Gal-Reaktionen, mit PCR unter Verwendung ependymaler cDNA) und aufgrund der erhaltenen Ergebnisse (z. B. Autoaktivierung der Reportergene durch das gefundene Bibliotheksprotein, fehlender Nachweis der zum jeweiligen Klon korrespondierenden mRNA in EPK) alle als Interaktionspartner ausgeschlossen.

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System war unter den oben genannten Rahmenbedingungen bei der Suche nach Interaktionspartnern der pAK7 wenig erfolgreich. Um jedoch zu einer allgemein gültigen Wertung zu kommen, müsste die Analyse unter optimalen Bedingungen wiederholt werden. Als generell zu erwartendes Problem muss die hohe Anzahl an falsch positiven Klonen in Hefe-Zwei-Hybrid-Systemen genannt werden, die nie auf Null reduziert werden kann. Bei geringer Effizienz des Hefe-“Matings“ macht sich der Nachteil einer großen Anzahl an falsch positiven Klonen besonders stark bemerkbar. Daher sollten bei zukünftigen Experimenten insbesondere Bankqualität und -quantität hoch sein. Ferner ist es möglich, dass die heterologe Expression der pAK7 in interaktionskompetenter Form in Hefe auf prinzipielle Probleme stößt. Denkbar wären z. B. fehlende Chaperone oder mangelnde posttranslationale Modifikationen.

Ein Klon aus der Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse konnte zunächst per Datenbankanalyse

mit dem Bardet-Biedl-Protein *BBS1* in Zusammenhang gebracht werden. *BBS1* wurde von Mykytyn et al. (2002, 2003) näher charakterisiert; es handelt sich um ein Protein mit vorhergesagter β -Propellerdomäne, dessen Fehlfunktion eine mögliche Ursache des BBS darstellt. Das BBS entsteht, wie in 1.3.2 beschrieben, durch Mutationen in einem oder mehreren von 12 bis heute bekannten Genloci (Blacque und Leroux, 2006). Es geht mit einer Fehlfunktion des Basalkörpers und gestörtem Aufbau von Cilien einher (Anstley et al., 2003; Beales, 2005). Typische Krankheitssymptome zeigen, dass das BBS eine Erkrankung durch den Defekt primärer Cilien ist (siehe Einleitung 1.3.2). Da pAK7 in vorliegender Arbeit als mit Kinocilien, nicht aber als mit primären Cilien kolokalisiertes Protein identifiziert werden konnte, fehlte damit nach dem heutigen Erkenntnisstand grundsätzlich die Möglichkeit einer Interaktion von *BBS1* mit pAK7. Zudem konnte dem im Hefe-Zwei-Hybrid-System gefundenen cDNA-Klon von *BBS1* nur ein Abschnitt von dessen mRNA-Sequenz zugeordnet werden, der im 3'UTR liegt. Dies stuft ihn als falsch-positiven Klon ein, solange keine alternativen Spleißvarianten oder Translationsprodukte von *BBS1* bekannt sind, die diesen 3'UTR-Bereich umfassen und solange *BBS1* nicht in kinocilientragenden Zellen nachgewiesen werden kann.

3.5 Vergleich von pAK7 mit anderen Adenylatkinasen

Adenylatkinasen aus Axonemen von Cilien oder eukaryotischen Flagellen wurden bereits mehrfach beschrieben, beispielweise in *Tetrahymena thermophila* (Nakamura et al., 1999), *Trypanosoma brucei* (Pullen et al., 2004) oder *Chlamydomonas reinhardtii* (Wirschell et al., 2004). Bereits in den 1970er Jahren war in Flagellen aus *Chlamydomonas* Adenylatkinaseaktivität detektiert worden (Watanabe und Flavin, 1976). Dies geschah bald darauf ebenso in den Cilien und Flagellen anderer Spezies (Schoff et al., 1989; Nakamura et al., 1999; Noguchi et al., 2001). Darauf aufbauend entstand die Hypothese eines "Adenylatkinase-shuttles" am Beispiel von Säugetierspermien (nach Dzeja und Terzic, 2003). Dieses "shuttle" soll eine zur Glycolyse alternative, vor Ort vorhandene Energiequelle für den Flagellenschlag darstellen (Übersichtsartikel: Ford, 2006).

In vorliegender Arbeit wurde im mittleren Teil der pAK7 das Motiv einer Adenylatkinase (AK)-Domäne entdeckt (Ergebnisse 2.2). Zudem konnte gezeigt werden, dass pAK7 im Cytosol kinocilientragender Zellen lokalisiert ist. Eine Umsetzung von $2 ADP \rightleftharpoons ATP + AMP$ konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Müller und Schulz (1992) untersuchten die Aminosäuren der *E. coli* W3110-AK, die den Inhibitor P,P-bis(adenosin-5'-)pentaphosphat (Ap_5A) im reaktivem Zentrum über Wasserstoffbrücken binden. Vergleicht man diese mit den korrespondierenden Aminosäuren der pAK7, lassen sich einige

Unterschiede erkennen, die zu einer schlechteren Bindung von 2 ADP im reaktiven Zentrum der pAK7 führen und damit die fehlende AK-Aktivität erklären könnten (Abb. 29). Möglicherweise kann pAK7 jedoch alternative Nucleotide wie z. B. GDP umsetzen und dadurch zur Bildung von ATP in der Zelle beitragen. Im Falle von GDP wäre allerdings zu berücksichtigen, dass dieses bei der Aktivierung von großen und kleinen G-Proteinen im Rahmen von Signaltransduktion und Vesikelverkehr sowie beim Zusammenbau von Mikrotubuli entstehen kann. Durch Nucleosid-Diphosphatkinase wäre dieses dann leicht wieder zu GTP aufphosphorylierbar. Eine Notwendigkeit für Existenz einer GMP-Kinase ist also fraglich. Zudem ist zu berücksichtigen, dass GTP/GDP in ein bis zwei Größenordnungen niedrigeren Konzentrationen in Zellen vorkommt als ATP. Als Energiereserve hätten GTP/GDP also wenig zu bieten. Sollten die beiden G-Nucleotide dennoch zur ATP-Erzeugung herangezogen werden, müsste dieses ATP allerdings erst aus dem Cytosol in die Cilien gelangen, um für den Cilienschlag Verwendung zu finden.

Die molekulare Masse der pAK7 ist mit ca. 82.4 kDa ungewöhnlich hoch für Adenylatkinasen. In der Regel handelt es sich bei diesen um globuläre Proteine mit nur etwa 21 bis 46 kDa (Noda, 1973). Allerdings wurde im Rahmen von Untersuchungen der Evolution der Proteinfamilie der Nucleosidmonophosphatkinasen eine ganze Reihe vergleichsweise massenreicher Proteine mit Adenylatkinase-Sequenzmotiven gefunden, in die sich auch pAK7 einordnen lässt (Fukami-Kobayashi *et al.*, 1996). Ein Beispiel dafür ist das Protein "central pair complex 1" (Cpc1) des Zentralapparates der *Chlamydomonas*-Flagellen mit einer molekularen Masse von 205 kDa. Zhang und Mitchell (2004) beschrieben, dass das Protein für den korrekten Aufbau eines für den Cilienschlag notwendigen Proteinkomplexes essentiell ist. Cpc1 enthält zwei konservierte Domänen: eine zentrale AK-Domäne und ein einzelnes "EF hand"-Motiv zur Bindung von Ca^{2+} am C-Terminus. Die konservierten Motive sind durch ausgedehnte Sequenzen verbunden. Fehlt Cpc1 in *Chlamydomonas*-Zellen, so verlangsamt sich deren Cilienschlag. Werden allerdings die Flagellenaxoneme solcher Mutanten isoliert und in einem AK-Test eingesetzt, können keine signifikanten Unterschiede zwischen AK-Aktivitäten von Wildtyp und *cpc1*-Mutante ausgemacht werden. Dies legt den Schluss nahe, dass die AK-Domäne in Cpc1 keinen entscheidenden Energiebeitrag zum Cilienschlag liefert, da sie möglicherweise kein oder nur wenig ATP bilden kann. Alternativ könnte sie aber auch Regulationsmechanismen unterliegen, die ihre Aktivität in einem Axonemhomogenat nicht hervortreten lassen. Das zu Cpc1 orthologe Protein in Säugetieren ist Kpl2, für das vermehrte Transkription während der Ciliogenese in Trachea-Explantaten aus Ratten gezeigt werden konnte (Ostrowski *et al.*, 1999). Vergleicht man Cpc1 aus *Chlamydomonas reinhardtii* und Kpl2 aus Ratte, finden sich konservierte Regionen im Bereich der zentralen AK-Domäne und im "EF hand"-Motiv.

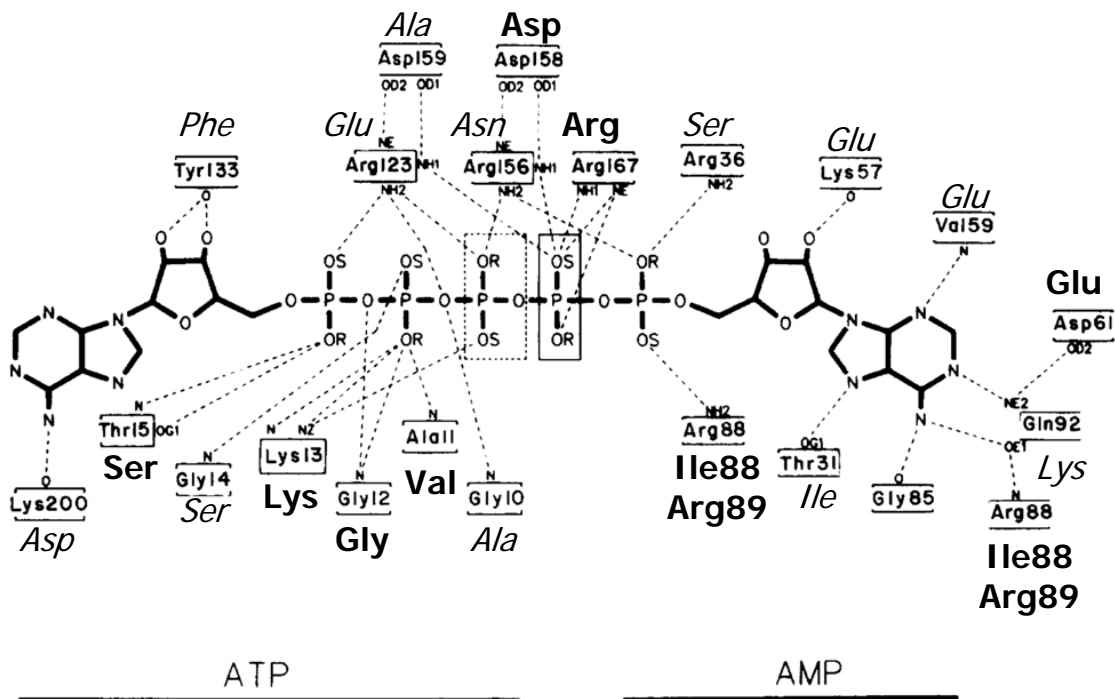


Abb. 29: Darstellung der Aminoacylreste (Aa) der *E. coli* W3110-AK, die den Inhibitor P,P-bis(adenosin-5'-)pentaphosphat (Ap₅A) im reaktiven Zentrum über Wasserstoffbrücken binden, nach Müller und Schulz (1992). Die vermutlich dazu korrespondierenden Aminosäuren aus dem aktiven Zentrum von pAK7 sind entsprechend zugeordnet. Fett gedruckt dargestellte Aa entsprechen den Aa in der *E. coli* W3110-AK und ermöglichen ebenfalls die Bindung der beiden Substratmoleküle, hier durch Ap₅A nachgeahmt; kursiv dargestellte Aa tragen aufgrund mangelnder Ladung nicht zur Bindung des Substrats bei.

3.6 Mögliche Funktion der pAK7

Im Rahmen vorliegender Arbeit sollte die Funktion der pAK7 ermittelt werden. Das Protein wurde in einem Enzymtest auf AK-Aktivität untersucht. Zwar ist die AK-Domäne des Proteins strukturhomolog mit der anderer Adenylatkinasen, das Volllängenprotein zeigte aber unter den Testbedingungen keine enzymatische Aktivität. Die beiden Positivkontrollen Myokinase und AK1 aus Ratte wiesen hingegen die erwartete deutlich meßbare Aktivität auf. Das Fehlen enzymatischer Aktivität bei pAK7 lässt sich unterschiedlich interpretieren. Zum einen könnten ependymspezifische Proteinkomplexe, die für eine korrekte Faltung erforderlich sind, in den zur pAK7-Expression verwendeten HEK-Zellen fehlen. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass für die volle Aktivität notwendige Faktoren fehlen, die z. B. zur Öffnung des aktiven Zentrums erforderlich sein könnten. Durchführung desselben enzymatischen Tests in transfizierten, pAK7 überexprimierenden Ependymzellen könnte diese Frage klären. Zusätzlich erscheint die Variation der Testbedingungen sinnvoll, um nach fehlenden, für die AK-Aktivität nötigen Faktoren zu suchen. Dazu ist der Einsatz von beispielsweise Ependymhomogenat sinnvoll, da das Homogenat diese Faktoren enthalten könnte. Alternativ ist auch ein Verlust der enzymatischen Aktivität im Laufe der Evolution durch Mutationen in der vorhergesagten AK-Domäne der pAK7 denkbar. Möglicherweise stand der pAK7 im eingesetzten Enzymtest aber auch nicht das benötigte Substrat zur Verfügung, damit eine Aktivität der pAK7 mit einem alternativen Nucleotid (z. B. CDP, GDP oder UDP) bestimmbar geworden wäre.

3.7 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass pAK7 ein mit Kinocilien assoziiertes Protein ist. Nachdem der Einsatz des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems nicht zum Ziel geführt hat, erscheint es sinnvoll, ein alternatives System zum Auffinden möglicher pAK7-Interaktionspartner einzusetzen, z. B. das TAP-System (siehe Einleitung 1.8). Dazu sollten EPK verwendet werden, die keine native pAK7 mehr synthetisieren können, sondern nur noch pAK7 in Fusion mit dem TAP-Protein, jedoch ohne Überexpression des Fusionsproteins. Allerdings müssen für TAP-Reinigungen große Mengen Protein eingesetzt werden, die nur durch großen organisatorischen und materiellen Aufwand aus Primärkulturen oder gar *in vivo*-Experimenten erhalten werden können.

Durch den Einsatz morpholinosubstituierter Oligonucleotide und der damit verbundenen Verhinderung von Proteintranslation oder RNA-“Spleißen“ kann möglicherweise die Funktion eines Proteins abgeleitet werden, wenn sich sein Fehlen in einem veränderten

Phänotyp erkennen lässt. Eine Anwendung dieser Methode wäre daher auch zur weiteren Untersuchung von pAK7 beispielweise in Zebrafisch (vgl. Hirschner *et al.*, 2007) überlegenswert.

Der Einsatz von RNAi-Technologie in EPK könnte Aufschluss geben über die Folgen eines pAK7-Mangels während und nach der Entwicklung bzw. Ausdifferenzierung kinocilientragender Zellen. Durch Regulation der RNAi-Transkription, wie z.B. in Szulc *et al.* (2006) beschrieben, wären Auswirkungen des Transkriptverlusts auf die kinocilientragenden Zellen direkt und bei Bedarf zeitabhängig darstellbar. Als mögliche Beobachtungen kämen z. B. in Frage: unbewegliche, verkürzte, falsch aufgebaute oder fehlende Kinocilien.

Auch die Erzeugung eines monoklonalen Antikörpers gegen die pAK7 zur Erzielung höherer Spezifität für Immunfluoreszenzfärbungen und “Western blots“ wäre anzustreben. Dadurch könnte die Lokalisation des Proteins z.B. durch Konfokale “Laser-Scanning“-Mikroskopie oder Immungoldfärbungen genauer bestimmt werden.

Kapitel 4

Materialien und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Geräte

Autoklav	Typ 669, Aigner, München
Cryostat	HM 505 E, Microm, Volketswil, Schweiz
Elektro-“Blot“-Kammer	Bio-Rad, München
Elektrophoresekammer	für Agarosegele: Model B1 (110 mm × 90 mm), Owl Separation Systems, USA für Polyacrylamidgele: Bio-Rad, München
ELISA-“Reader“	Titertec Plus MS 212, Friedrich S. Bartolomey Labortechnik, Alfter; verbunden mit einem PC und EIA3-Software von ICN, Meckenheim
Heizblock	Grant QBT, CLF Laborgeräte, Emersacker
Hybridisierungsöfen	Biometra, Göttingen
Kameras	Coolpix 995; Nikon, Düsseldorf Canon EOS 350D, Canon, Krefeld
Lightcycler [®] -PCR-Gerät	Roche, Mannheim
Magnetrührer	IKAMAG RCT, Bachofer, Reutlingen
Mikroskop (Phasenkontrast)	Modelle IM, Zeiss, Oberkochen

Mikroskop (Fluoreszenz)	Modelle IM 35, Zeiss, Oberkochen
Mikrowellenofen	Micro-Chef FM 3915 Q, Moulinex, Kauf- land, Tübingen
Netzgeräte für Elektrophorese	Consort E 132, BioBlock Scientific, Ill- kirch, Frankreich; 2301 Macrodrive 1, LKB Bromma, Wien, Österreich Power Supply Model 200, Bethesda Rese- arch Laboratories, Life Technologies, Inc., USA Computer Controlled Electrophoresis Power Supply, Model 3000 X, Bio Rad, München
Osmometer	Osmometer Automatic, Knauer, Eppel- heim
pH-Meter	PHM 92, Radiometer, Copenhagen, Däne- mark
PCR-Gerät	Primus 96 plus, MWG AG Biotech, Ebers- berg
Pipettoren	Finn-Pipettoren (5-40 μ l, 40-200 μ l, 200- 1000 μ l), Labsystems, Finnland Eppendorf-Pipettoren (0.5-10 μ l, 10- 100 μ l, 200-1000 μ l), Eppendorf, Hamburg Mehrkanal-Pipettor Titerman, Eppen- dorf, Hamburg
Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine	SRX-101, Konica Europe, Hohenbrunn
Röntgenfilm-Expositionskassette	Hypercassette, Amersham Buchler, Braunschweig
Scanner	CanoScan LiDE 60, Canon, Amsterdam, Niederlande
Schüttler	Vortex Genie, Bender und Hobein, München

	Horizontal-Schüttelplattform	KL2, Bühler, Tübingen, mit Inkubator von Wilhelm Störk, Klingenberg
		ZMD 201, Amersham, Freiburg
Schweißgerät Super Poly 281		Audion Elektro, Kleve
SDS-PAGE-Apparatur		Ready Gel Cell, Bio-Rad, München
Spektrophotometer		Shimadzu UV-120-01, Kyoto, Japan
		Uvikon 860 with Plotter 800, Kontron, Eching
Sterilbank		Biogard Hood, Baker Company, Sanford, USA
		Lamin Air HLB 2448, Heraeus, Hanau
		Lamin Air TL 2448, Heraeus, Hanau
Sterilfiltrationsapparatur		Sterilfiltrationsapparatur, Millipore, Eschborn
Tischzentrifuge		Zentrifuge 5415 C, Eppendorf, Hamburg
Trockenschrank		Typ U-30, Memmert, Schwabach
Ultraschallstab		Branson B-30 mit Microspitze, Heine- mann, Schwäbisch Gmünd
UV-Transluminator	Chromato-Vue	UVP, San Gabriel, USA
	TM-20	
Wasserbad		Julabo Standard, Julabo PC Thermostat, Labora, Mannheim
Wassersterilisationsanlage		USF Elga (0.22 μm Filter), Purelabs, USA
Zellinkubatoren		Typ B 5060 EC CO ₂ , Heraeus, Hanau
Zentrifuge		Varifuge K, Heraeus, Hanau

4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen (18 mm × 18 mm)	Roth, Karlsruhe
Deckgläschen (24 mm × 50 mm)	Roth, Karlsruhe
Filterpapier (Whatman 3MM)	Whatman, Göttingen
Filtrationseinheiten (sterile Millex-Einheiten)	Millipore, Eschborn
Gefrier Röhrchen (2 ml)	Greiner, Frickenhausen
Glasperlen (0.45 mm-0.6 mm)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glaspipetten (1 ml, 5 ml, 10 ml)	Hirschmann, Eberstadt
Glaswaren	Schott, Mainz
	Brand, Wertheim
Hybridisierungsbehälter	Fisher Scientific, Schwerte
Kulturschalen (3 und 10 cm Durchmesser)	Becton Dickinson, Heidelberg
	Nunc, Wiesbaden
Microtiterplatten (Immunoplate F96)	Applichem, Darmstadt
“Reprobe Nitrocellulose supported“ (82 mm Durchmesser, 0.45 µm)	Bio-Rad, München
Nitrocellulosemembran (Trans-Blot, 0.45 µm)	Sefar GmbH, Wasserburg/Inn
Nylongaze (132, 210 µm Maschenweite)	QBIOgene, Heidelberg
Nylonmembran, positiv geladen	Menzel via Roth, Karlsruhe
Objektträger für die Mikroskopie (26 mm × 76 mm × 1 mm)	PeqLab, Erlangen
PCR-Gefäße (0.2 ml)	Roth, Karlsruhe
Petrischalen (AD94/H16mm)	Braun, Melsungen
Pipettenspitzen	Greiner, Frickenhausen
Plastikgefäße (14 ml, steril)	Nunc, Wiesbaden
Plastikgefäße (15 ml, steril)	Nunc, Wiesbaden
Plastikgefäße (50 ml, steril)	Brand, Wertheim
Plastikreaktionsgefäße (1.5 und 2 ml)	

Röntgenfilm	Amersham, Freiburg
“SuperFrost Plus“-Objektträger für die Mikroskopie	Menzel, via Roth, Karlsruhe

4.1.3 Chemikalien

3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI)	Sigma-Aldrich, Steinheim
α -D(+)-Glucose-Monohydrat	Roth, Karlsruhe Fluka, Steinheim
AEBSF-Hydrochlorid	Applichem, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Aprotinin	Applichem, Darmstadt
“Bradfordassay“-Färbereagenz	Bio-Rad, München
Bromphenolblau	Fluka, Steinheim
BSA	Sigma-Aldrich, Steinheim
“CDP-Star“ (Chemilumineszenzreagenz)	Roche, Mannheim
Coomassie-Brilliantblau R 250	Sigma-Aldrich, Steinheim
D(+)-Saccharose >99.5%, p.a.	Roth, Karlsruhe
Dimethylformamid (DMF)	Applichem, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO) wasserfrei, 99.9%	Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA	Roth, Karlsruhe
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Isopentan	Fluka, Steinheim
L-Cystein-Hydrochlorid	Serva, Heidelberg
Leupeptin-Hemisulfat	Applichem, Darmstadt
Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe

Milchpulver	Naturaflor, Töpfer, Dietmannsried
MnCl ₂	Fluka, Steinheim
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	Fluka, Steinheim
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Steinheim
NaCl	Roth, Karlsruhe
NaHCO ₃	Roth, Karlsruhe
“PageRuler™ prestained“ Proteinmarker	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
PFA	Fluka, Steinheim
Pepstatin A	Applichem, Darmstadt
p-Nitrophenylphosphat (p-NPP)	Roche, Mannheim
Polyethylenglycol (PEG)	Fluka, Steinheim
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
RbCl	Sigma-Aldrich
“Roti®-ImmunoBlock“	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese®-Gel 30 (37.5 : 1)	Roth, Karlsruhe
SDS	Fluka / Sigma-Aldrich
SulfoLink®-aktiviertes Kopplungsgel	Pierce über PerbioScience, Bonn
Trichloressigsäure (TCA)	Fluka, Steinheim
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Tween®20	Fluka, Steinheim

Alle anderen Chemikalien wurden von E. Merck, Darmstadt, erworben.

4.1.4 Zusammenstellung kommerzieller Chemikalien (“Kits“)

“Advantage [®] 2 PCR Kit“	Clontech (jetzt Takara Bio), Heidelberg
“BD Creator [™] DNA Cloningkit“	Clontech (jetzt Takara Bio), Heidelberg
“BD Matchmaker Pretransformed MATCHMAKER library“ (menschliche Hoden-cDNA im Vektor pACT2)	Clontech (jetzt Takara Bio), Heidelberg
“BD Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System 3“	Clontech (jetzt Takara Bio), Heidelberg
“E.Z.N.A. [®] Plasmid Miniprep Kit I (classic line)“	PeqLab, Erlangen
“ECL Western Blotting Substrate“	Pierce über PerbioScience, Bonn
“Enhanced Chemiluminescence (ECL) Detection Reagent“	Amersham, Freiburg
“FastStart DNA Master“	Roche, Mannheim
“HotStarTaq [®] Master Mix Kit“	Qiagen GmbH, Hilden
“Inject [®] Maleimide Activated Immunogen Conjugation Kit“	Pierce über PerbioScience, Bonn
“Lightcycler [®] FastStart DNA master SYBR Green I“	Roche, Mannheim
NucleoSpin [®] Plasmid-“Kit“	Macherey-Nagel, Düren
“NucleoSpin [®] Extract II“	Macherey-Nagel, Düren
“Omniscript Reverse Transcriptase Kit“	Qiagen, Hilden
“PCR Digoxigenin (DIG) Probe Synthesis Kit“	Roche, Mannheim
“PCR Select [™] cDNA Subtraction Kit“	Clontech (jetzt Takara Bio), Heidelberg
“PCR-Select Differential Screening Kit“	Clontech (jetzt Takara Bio), Heidelberg
QIAGEN [®] “PCR Cloningplus Kit“	Qiagen, Hilden

“QIAprep Spin Miniprep Kit“	Qiagen, Hilden
“QIAquick“ Gelextraktions-“Kit“	Qiagen, Hilden
“QIAquick PCR Purification Kit“	Qiagen, Hilden
“RNeasy RNA Isolation Kit“	Qiagen, Hilden
“SAWADY Pwo DNA Polymerase Kit“	PeqLab, Erlangen
“SMART [™] PCR cDNA Synthesis Kit“	Clontech (jetzt Takara Bio), Heidelberg
“SulfoLink [®] Coupling gel“	Pierce über PerbioScience, Bonn

4.1.5 Reagenzien für die Molekularbiologie

10× T4 DNA-Ligationspuffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Anti-DIG-Alkalische Phosphatase (AP), Fab-Fragmente	Roche, Penzberg
Bactoagar	BD Biosciences Clontech Germany, Heidelberg
dATP, dCTP, dGTP, dTTP (je 10 μ M)	Promega, Mannheim
Desoxyribonucleosidtriphosphat (dNTP); (je 10 mM)	PeqLab, Erlangen
Dithiothreitol (DTT), 0.1 M	Gibco BRL, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Fluka, Steinheim
“GeneRuler 1 kb DNA Ladder“	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
“GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus“	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Oligo(dT ₁₅) Adapter-“Primer“	Invitrogen, Karlsruhe
“PageRuler Prestained Protein Ladder“	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
PANScript NH ₄ -Puffer	PAN Biotech, Aidenbach
PCR-“Primer“	Invitrogen, Karlsruhe
peqGold-Universalagarose	PeqLab, Erlangen
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Fluka, Steinheim
“Random hexamer primer“ (500 μ g/ml)	Promega, Mannheim
RNAsin Ribonucleaseinhibitor (40 U/ μ l)	Promega, Mannheim

4.1.6 Enzyme für die Molekularbiologie

BamHI	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
“Calf Intestine Alkaline Phosphatase“ (CIAP)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Ecl136II	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Eco32I (EcoRV)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
EcoRI	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
“Eppendorf Triple Master Polymerase“	Eppendorf
HindIII	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
MluI	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
NotI	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
“PfuUltra TM High-Fidelity Hotstart DNA-Polymerase“	Stratagene
PvuII	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Reverse Transkriptase	PeqLab, Erlangen
“SAWADY“-Pwo-DNA-Polymerase	PeqLab, Erlangen
SpeI (BcuI)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
SspI	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4 DNA-Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Taq-DNA-Polymerase	PeqLab, Erlangen
XhoI	New England Biolabs, Frankfurt a.M.

4.1.7 Reagenzien für die Kultivierung von Bakterien und Säugerzellen

“-Ade/-His/-Leu/-Trp Dropout Supplement“	Clontech (jetzt Takara Bio), Heidelberg
“-His/-Leu/-Trp Dropout Supplement“	Clontech (jetzt Takara Bio), Heidelberg
“-His Dropout Supplement“	Clontech (jetzt Takara Bio), Heidelberg
“-Leu/-Trp Dropout Supplement“	Clontech (jetzt Takara Bio), Heidelberg
“-Leu Dropout Supplement“	Clontech (jetzt Takara Bio), Heidelberg
“-Trp Dropout Supplement“	Clontech (jetzt Takara Bio), Heidelberg
Adeninsulfat rein >98% (HPLC)	Fluka Chemie GmbH / Sigma-Aldrich GmbH
Ammoniumsulfat	Fluka, Steinheim
Antimycoticum	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bactoagar	Clontech (jetzt Takara Bio), Heidelberg
Carbenicillin, Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	Applichem, Darmstadt
“Dulbecco’s modified Eagle’s medium“ (DMEM), Pulver (ohne Pyruvat und NaHCO ₃)	GibcoBRL, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (engl.: <i>fetal calf serum</i> , FCS)	Biochrome, Berlin
“Hank’s balanced salt solution“ (HBSS)	GibcoBRL, Karlsruhe
Insulin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kanamycin	Applichem, Darmstadt
LB-Agar, Pulver	Fluka, Steinheim

LB-Flüssigmedium, Pulver	Fluka, Steinheim
L-Cystein-Hydrochlorid	Serva, Heidelberg
“Minimal Essential Medium“ (MEM), Pulver	GibcoBRL, Karlsruhe
Penicillin G, Kaliumsalz	Serva, Heidelberg
SOC-Medium	Novagen, Schwalbach/Ts.
Streptomycinsulfat	Serva, Heidelberg
Thrombin (Mensch)	zur Verfügung gestellt von Dr. Mirna Rapp, ZLB Behring, Marburg
Transferrin	Roche, Mannheim
Trypsin	ICN, Eschwege
“Yeast Nitrogen Base“ ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim

4.1.8 Antigenes Peptid

CDFLAEYLFKNNPEMQ Hergestellt von K.-H. Wiesmüller, IFIB, Universität Tübingen

4.1.9 Antikörper

4.1.9.1 Primäre Antikörper

Antikörper	bezogen durch	Verdünnung	Anwendung
Antikörper gegen Gal4-BD aus Maus	BD Biosciences, Heidelberg	1:5000	WB
Antiserum gegen GP BB aus Kaninchen	zur Verfügung gestellt von B. Pfeiffer-Guglielmi, IFIB, Universität Tübingen	1:1000	IF
Antiserum gegen pAK7-Peptid (C-Terminus) aus Kaninchen	Charles River Laboratories, Stolzenseeweg 32-36, 88353 Kißlegg, hergestellt im Rahmen dieser Arbeit	1:5000	WB
		1:200	IF
Monoklonaler Antikörper gegen β -Actin (AC-15) aus Maus-Ascites	Sigma-Aldrich, Steinheim	1:25000	WB
Monoklonaler Antikörper gegen GFAP aus Maus	Sigma-Aldrich, Steinheim	1:400	IF
Monoklonaler Antikörper gegen Myc-“tag“ (9B11) aus Maus	Cell Signaling über New England Biolabs, Frankfurt a.M.	1:5000	WB
		1:50	IF
Monoklonaler Antikörper gegen α -Tubulin (6-11B-1) aus Maus-Ascites	Sigma-Aldrich, Steinheim	1:1000	IF

WB, “Western blot“; IF, Immunfluoreszenzfärbungen

4.1.9.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	bezogen durch	Verdün- nung	Anwend- ung
Anti-Kaninchen-IgG, AP-Konjugat	Jackson, über Dianova	1:1000	ELISA
Anti-Kaninchen-IgG, POD-Konjugat	Dianova, Hamburg	1:120000	WB
Anti-Maus-IgG, POD- Konjugat	Jackson, über Dianova	1:20000	WB
		1:100000	WB
Esel-anti- Meerschweinchen-IgG, Cy3-Konjugat	Jackson, über Dianova	1:1000	IF
Ziege-anti-DIG-IgG, AP- Konjugat	Jackson, über Dianova	1:20000	DB
Ziege-anti-Kaninchen- IgG, Alexa Fluor 488- Konjugat	Molecular Probes, über Invitrogen, Karlsruhe	1:2000	IF
Ziege-anti-Kaninchen- IgG, Alexa Fluor 568- Konjugat	Molecular Probes, über Invitrogen, Karlsruhe	1:2000	IF
Ziege-anti-Maus-IgG, Alexa Fluor 488- Konjugat	Molecular Probes, über Invitrogen, Karlsruhe	1:1000	IF

DB, Dot Blot; IF, Immunfluoreszenzfärbungen; WB, "Western blot"

4.1.10 Verwendete Mikroorganismen

4.1.10.1 Bakterienstämme

DH5 α E.coli-Zellen	zur Verfügung gestellt von F. Madeo, IFIB, Universität Tübingen
“NovaBlue TM Singles“	Novagen, Schwalbach/Ts.
“Qiagen EZ“ kompetente Zellen	Qiagen, Hilden

4.1.10.2 Hefestämme

AH109	zur Verfügung gestellt von F. Madeo, IFIB, Universität Tübingen
Y187	Clontech (jetzt Takara Bio), Heidelberg

4.1.11 Säugerzellen

HEK293T-Zellen	zur Verfügung gestellt von R. Vogel, LGN, Paris, Frankreich
----------------	--

4.1.12 Tiere

Wistar-Ratten	erworben von Charles River, Stolzenseeweg 32-36, 88353 Kitzlegg, oder Eigenzucht im Tierstall des Instituts
---------------	---

4.1.13 Vektoren

pCL1	Clontech (jetzt Takara Bio), Heidelberg
pDNR-1r	Clontech (jetzt Takara Bio), Heidelberg
pDrive Klonierungsvektor	Qiagen, Hilden
pETBlue-2	Novagen, Schwalbach/Ts.
pGADT7 AD-Vektor	Clontech (jetzt Takara Bio), Heidelberg
pGADT7-T	Clontech (jetzt Takara Bio), Heidelberg
pGBKT7 BD-Vektor	Clontech (jetzt Takara Bio), Heidelberg
pGBKT7-53	Clontech (jetzt Takara Bio), Heidelberg
pLP-GADT7 AD-Akzeptorvektor	Clontech (jetzt Takara Bio), Heidelberg
pLP-GBKT7 BD-Akzeptorvektor	Clontech (jetzt Takara Bio), Heidelberg
pWPXL	zur Verfügung gestellt von D. Trono, EPFL, Lausanne, Schweiz

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultur

4.2.1.1 Medien und Lösungen für die Zellkultur

Penicillin / Streptomycin (PS)-Stammlösung: 651 mg Penicillin G (1536 U/mg) und 1 g Streptomycinsulfat (750 U/mg) in 50 ml H_2O_{dd}

Puck's D1-Lösung: 137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.22 mM KH_2PO_4 , 0.17 mM Na_2HPO_4 ; pH 7.4

Pucks D1 / Gluc / Suc-Lösung: 5 mM D-Glucose, 58.4 mM Saccharose, 200 U/ml Penicillin G, 150 U/ml Streptomycinsulfat (750 U/mg) in Puck's D1-Lösung

MEM_{wash}: 9.65 g MEM-Pulver und 2.2 g NaHCO_3 in 1 l H_2O_{dd}

MEM_K: MEM_{wash}-Medium, ergänzt mit 0.5 g/l BSA, 5 mg/l Insulin, 10 mg/l Transferrin und 1 ml PS-Stammlösung pro 1 l Medium

MEM_{KT}: MEM_K ergänzt mit 500 U/l Thrombin

DMEM: 133.75 g DMEM-Pulver ohne Pyruvat und NaHCO_3 , 2.2 g Natriumpyruvat und 74 g NaHCO_3 wurden in 20 l H_2O_{dd} aufgelöst. Das Medium wurde durch Einleitung von CO_2 auf pH 7.4 gebracht. Die Osmolarität betrug 320-340 mosmol/l.

DMEM / 10% FCS: 10% (v/v) FCS und 90% (v/v) DMEM

DMEM / 10% FCS / PS: 1 ml PS-Stammlösung auf 1 l DMEM / 10% FCS

DMEM / 10% FCS / Antimykoticum: 1 ml 1000× Stammlösung des Antimykoticums auf 1 l DMEM / 10% FCS

4.2.1.2 Ependymreiche Primärkulturen (EPK)

EPK wurden innerhalb 24 h nach der Geburt junger Wistar-Ratten aus deren Gehirnen nach der Methode von Weibel *et al.* (1986) in der Variante nach Prothmann *et al.* (2001) angelegt.

Beschichten der Kulturschalen mit Fibronectin Kulturschalen mit 35 mm Durchmesser wurden mit Fibronectin beschichtet, indem die Platten mit 0.7 ml steriler Fibronectinlösung (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) mindestens 2 h lang bei 37°C inkubiert wurden (Tritschler *et al.*, 2007). Nach dieser Zeit wurde die Fibronectinlösung durch 2 ml MEM-Waschmedium (MEM_{wash}) ersetzt. Die Platten wurden bis zur weiteren Verarbeitung in einen Zellinkubator mit einer Atmosphäre aus 95% Luft und 5% CO₂ gestellt.

Vorbereitung der Rattenhirne Die neugeborenen Ratten wurden mit einer Schere dekapitiert, die Gehirne durch das *Foramen magnum* gedrückt und in einer Petrischale mit 10 ml eiskalter Puck's D1 / Gluc / Suc-Lösung gesammelt.

Dissoziierung in Einzelzellen Zur Dissoziierung der Gehirne wurden mit einem "Super Poly 281"-Schweißgerät Nylongazesäckchen von ungefähr 5 cm \times 3 cm und Maschenweiten von 135 μm und 210 μm hergestellt. Die Gehirne wurden durch die Gazesäckchen mit 210 μm Maschenweite massiert, um eine grobe Zerteilung des Gewebes zu erreichen. Die daraus resultierende Zellsuspension wurde in einer anderen Petrischale, ebenfalls 10 ml eiskalter Puck's D1 / Gluc / Suc-Lösung enthaltend, gesammelt. Mit einer 10 ml-Glaspipette wurde die Suspension trituriert, um stärkere Vereinzelnung der Zellen zu erreichen. Anschließend wurde die Suspension durch ein Gazesäckchen mit 135 μm Maschenweite in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen filtriert, um größere Zellaggregate abzutrennen. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 1500 Upm in einer Heraeus/Christ Varifuge K wurde der Überstand verworfen und der Zelniederschlag wieder in 10 ml MEM_K-Medium aufgenommen. Zum Ansäen wurde die Zellsuspension erneut durch ein Gazesäckchen mit 135 μm Maschenweite in ein Volumen von je 30 ml an MEM_K pro Rattengehirn filtriert, um inzwischen gebildete Zellaggregate zu entfernen.

Ansäen der dissoziierten Gehirnzellen In den vorbereiteten Kulturschalen wurde das Waschmedium durch 2 ml Zellsuspension in MEM_K-Medium ersetzt. Nach 48 h bei 37°C in einem Inkubator mit 95% Luft und 5% CO₂ erfolgte ein Medienwechsel zu MEM_{KT}-Medium. Ab diesem Zeitpunkt wurde das Medium alle 2-3 d erneuert, bis die Zellen für Experimente (spätestens am Tag 13) benötigt wurden. Der Zustand der Kulturen wurde regelmäßig per Phasenkonstrastmikroskop kontrolliert.

4.2.1.3 Astrogliareiche Primärkulturen (APK)

Die APK wurden aus den Gehirnen neugeborener Wistar-Ratten nach Hamprecht und Löffler (1985) angelegt, wobei die Tiere nicht älter als 36 h waren. Die Vorgehensweise wurde, wie unten beschrieben, leicht verändert.

Dissoziation der Gehirne in Einzelzellen Es wurde grundsätzlich vorgegangen wie beim Anlegen von EPK beschrieben. Allerdings wurden die Zellen nach der Zentrifugation in DMEM / 10% FCS / PS aufgenommen, wobei pro verwendetem Gehirn 50 ml Medium eingesetzt wurden.

Aussaat der Zellen 2 ml der Zellsuspension wurden in Kulturschalen mit 35 mm Durchmesser überführt. Die ausgesäten Zellen wurden bei 37°C in einem Inkubator mit einer Atmosphäre aus 90% Luft und 10% CO₂ kultiviert, das Medium danach alle sieben Tage erneuert. Der Zustand der Kulturen wurde regelmäßig Phasenkontrast-mikroskopisch kontrolliert.

Um die APK in nahezu homogene Astrogliazellkulturen zu überführen, wurde an Tag 5 der Kultur das Standardmedium durch ein DMEM-Medium mit 10% FCS ersetzt, in dem alle Aminosäuren außer Serin, Glutamin und Glycin fehlten (R. Schmid, B. Hamprecht, unveröffentlichte Versuche; Verleysdonk, 1994).

4.2.1.4 HEK293T-Zellen und daraus hergestellte Zelllinien

Für die Kultivierung von HEK293T-Zellen oder davon abgeleiteten Zelllinien wurden Kulturschalen mit 100 mm Durchmesser verwendet, in die 0.5 Millionen HEK-Zellen angesät worden waren. Der Inkubator wurde bei 37°C mit einer Atmosphäre aus 90% Luft und 10% CO₂ betrieben. Die Zellen wurden 2-mal wöchentlich subkultiviert, wobei jeweils 1-2 d später das Medium (DMEM / 10% FCS) erneuert wurde. Der Zustand der Kulturen wurde regelmäßig Phasenkontrast-mikroskopisch kontrolliert.

4.2.2 Sammeln von Rattenorganen und -zellen

4.2.2.1 Sammeln von Rattenorganen zur Isolierung von RNA und zur Herstellung von Proteinhomogenaten

Die Wistar-Ratten wurden im benötigten Alter getötet. Erwachsene Tiere wurden in einem mit CO₂ gefüllten Gastank betäubt und anschließend mit einer Guillotine geköpft. Die neugeborenen, maximal 36 h alten Ratten wurden ausschließlich mit einer Schere dekapitiert. Die benötigten Organe wurden entnommen. Für die Isolierung von RNA wurden sie in ein vorgekühltes Plastikgefäß überführt und darin mit Hilfe von flüssigem Stickstoff eingefroren. Organe zur späteren Herstellung von Proteinhomogenaten wurden nach der Isolierung in Plastikgefäßen mit eiskalter PBS gewaschen, unter Kühlung in kleine Stücke zerteilt und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Alle gefrorenen Organe wurden in Plastikgefäßen bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.2.2.2 Sammeln von Zellen aus Kulturschalen

Entsprechend den in den Experimenten benötigten Mengen Protein wurden die Zellen von 3-20 Kulturschalen von 35 mm Durchmesser verwendet. Dazu wurde zunächst das Medium entfernt, danach wurden alle Zellen 3× mit je 2 ml eiskaltem PBS gewaschen. Dann wurde 1 ml eiskalte PBS auf die erste Kulturschale pipettiert, und die Zellen wurden mit Hilfe eines Gummischabers vom Schalenboden abgekratzt. Die erhaltene Suspension wurde in die nächste vorher von Medium befreite Schale überführt, und die dort gewachsenen Zellen wurden geerntet. Die Vorgehensweise wurde wiederholt, bis alle Zellen der vorgesehenen Kulturschalen in Suspension vorlagen. In einem 1.5 ml Zentrifugengefäß wurden die Zellen nun bei 3000 Upm und 4°C 10 min lang in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Zellschlag bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.2.3 Fixation von Rattenorganen und Zellen für die spätere Verwendung in Immunfluoreszenzanfärbungen

4.2.3.1 Fixation von Rattenorganen

Die Tiere wurden getötet wie in 4.2.2.1 beschrieben. Anschließend wurden die entnommenen Organe in 4% PFA / PBS 24 h lang bei 4°C fixiert und danach weitere 24 h in 30% Saccharose bei 4°C inkubiert, um später Eiskristallbildung zu verhindern. Die Gehirne frisch geborener oder 2 d alter Ratten wurden zur Fixation im Schädel belassen; es wurde der gesamte Kopf fixiert, um die Organe nicht zu schädigen. Nach der Inkubation in Saccharose-Lösung wurde die Schädelkalotte entfernt. Alle Proben wurden in "Tissue-Tek O.C.T. compound" eingebettet, indem sie in durch flüssigen Stickstoff vorgekühltes Isopentan eingetaucht wurden. Die fertigen Präparate wurden bei -80°C gelagert.

4.2.3.2 Fixation von Zellen in Kulturschalen

Die auf Deckgläschen angesäten Zellen wurden direkt in den Kulturschalen fixiert, gelagert und gefärbt. Zur Fixation wurde zunächst das Medium entfernt, danach wurden alle Zellen 3× mit je 2 ml eiskalter PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen mit je 2 ml 4% PFA in PBS (4°C) 10 min lang bei RT inkubiert. Nach 3× Waschen mit kalter PBS wurden die Zellen in PBS bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

4.2.4 Herstellung von Homogenaten

Benötigte Lösungen: Proteaseinhibitoren:

Inhibitor	Stammlösung	Endkonzentration
AEBSF	20×	2 $\mu\text{g/ml}$
Aprotinin	500×	0.5 mg/ml
Leupeptin	100×	10 $\mu\text{g/ml}$
Pepstatin A	300×	3.33 $\mu\text{g/ml}$

Homogenisationspuffer: 100 mM Tris, 2 mM EDTA; pH 7.4

4.2.4.1 Herstellung aus Rattenorganen

Die nach 4.2.2.1 eingefrorenen Rattenorgane wurden gewogen und in Homogenisationspuffer mit Proteaseinhibitoren (200 μl Puffer auf 100 mg Gewebe) auf Eis aufgetaut. Das Gewebe wurde mit dem "Branson"-Ultraschallstab unter ständiger Eiskühlung homogenisiert (5-7 Stöße, "output control" 2, "duty cycle" 50%). Die Homogenate wurden 3×10 min lang bei 5000 Upm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils in ein neues Zentrifugengefäß überführt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Lysat in aliquotierten Volumenteilen bei -20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

4.2.4.2 Herstellung aus Zellkulturen

Die nach 4.2.2.2 geernteten Zellen wurden auf Eis in Homogenisationspuffer (10 μl Puffer auf 10 μl Zellniederschlag) aufgetaut. Die Zellen wurden mit dem Ultraschallstab aufgeschlossen (5-7 Stöße, "output control" 2, "duty cycle" 50%). Danach wurde das Lysat 1 min lang bei 4°C und 14000 Upm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Protein im Überstand wurde nach Bradford (1976) (siehe 4.2.15) bestimmt. Zur weiteren Probenvorbereitung und SDS-PAGE siehe 4.2.16.

4.2.5 Herstellung von Cryostatschnitten

Aus den nach 4.2.3.1 vorbereiteten Geweben wurden mit einem Cryostat bei -30°C 10 μm dicke Schnitte gewonnen und auf "SuperFrost Plus"-Objektträger übertragen. Nach Lufttrocknung bei RT wurden sie bis zur weiteren Verwendung bei -20°C in Objektträgerboxen gelagert.

4.2.6 Subtraktive cDNA-Bibliotheken aus Ependym

4.2.6.1 Herstellung subtraktiver cDNA-Bibliotheken aus ventrikulärem Ependym und Rinder-Subcommissuralorgan

Alle verwendeten “Kits“ wurden entsprechend der jeweiligen Herstellerangaben benutzt. Beim ortsansässigen Schlachter wurden Köpfe frisch geschlachteter Kühe erworben, die Schädel wurden gehäutet und durch Abtrennen des okzipitalen Teils mit Hilfe einer hydraulischen Guillotine geöffnet. Es wurde besonders vorsichtig vorgegangen, um die Gehirne nicht zu zerdrücken. Diese wurden durch die entstandene Öffnung entnommen, die lateralen Ventrikel vorsichtig mit einem Skalpell geöffnet, die Ependymschicht mittels eines Skalpells mit gebogener Schneide von den Ventrikelwänden gekratzt und in eiskalter HBSS gelagert. Zusätzlich wurden die Subcommissuralorgane isoliert und ebenfalls in eiskalter HBSS bis zur weiteren Verwendung innerhalb von 6 h gelagert. PolyA-RNA wurde aus den jeweils vorbereiteten Geweben mit Hilfe des “RNeasy RNA Isolation Kits“ erhalten. Nach der reversen Transkription mit dem “SMARTTM PCR cDNA Synthesis Kit“ und der anschließenden Amplifikation mit dem “Advantage[®] 2 PCR System“ wurde cDNA aus Ependym (interessierendes Gewebe, “tester“) bzw. SCO (ebenfalls interessierendes Gewebe, “tester“) erhalten. Die cDNA für das Referenzgewebe (“driver“) wurde aus ependymfreien, kortikalem Rinderhirngewebe mit der selben Methode erhalten. Die weiteren Schritte wurden, wie im Handbuch des “PCR SelectTM cDNA Subtraction Kit“ vorgegeben, nach dem Prinzip der Suppressierenden Subtraktiven Hybridisierung (SSH) durchgeführt, die von Diatchenko *et al.* (1999) beschrieben wurde (siehe Einleitung).

4.2.6.2 Durchforstung der ependymalen subtraktiven cDNA-Bibliothek

Bei der Durchforstung der subtraktiven cDNA-Bibliotheken wurde gemäß der Angaben des “PCR-Select Differential Screening Kit“-Handbuchs vorgegangen. Dabei wurde ein sogenannter “dot blot array“ verwendet, um zu untersuchen, ob und wie stark die Mengen der vorliegenden Transkripte in ependymalem und Resthirn-Gewebe variierten. Hierbei wurde die DNA von bis zu 96 Klonen der subtraktiven Bibliothek im Duplikat in einer 12 × 8 Matrix auf je eine positivierete Nylonmembran aufgetragen, die daraufhin mit regulär und invers subtrahierten cDNA-Sonden hybridisiert wurden. Die regulär subtrahierten cDNA-Sonden wurden analog der cDNA-Bibliothek mittels PCR hergestellt (siehe 4.2.6.1). Bei den invers subtrahierten Sonden dienten ependymale mRNAs zur Erzeugung der “Driver“- und kortikale mRNAs zur Herstellung der “Tester“-Population. Dabei wurde vorgegangen wie im “PCR-Select cDNA Subtraction Kit“ beschrieben. Die Sonden wurden wie im “DIG Probe Synthesis Kit“ beschrieben mit Digoxigenin (DIG) markiert und mit Hilfe eines DIG-Antikörpers (AP-Konjugat) detektiert. Die durch Dephosphorylierung

des CDP-Star-Reagenz entstehende Chemilumineszenz wurde mit einem lichtsensitiven Film detektiert. Das Fleckmuster der mit regulären Sonden inkubierten Nylonmembran wurde mit demjenigen der mit inversen Sonden bedeckten Membran verglichen. Nur Klone, die mit regulär subtrahierten cDNA-Sonden, nicht aber mit invers subtrahierten ein Signal ergaben, konnten als Kandidaten für differentielle Expression angesehen werden. Ihre cDNA wurde zur kommerziellen Sequenzierung an SeqLab Laboratories, Göttingen, geschickt. Klone, deren cDNA mit den invers subtrahierten cDNA-Sonden hybridisierte, wurden nicht weiter analysiert und bildeten den Detektionshintergrund.

4.2.7 Weitere molekularbiologische Methoden

4.2.7.1 Herstellung von Flüssignährmedien für Bakterien

Reines LB-Medium 20 g Pulver für LB-Medium wurden mit Hilfe eines Magnetrührers in 1 l H₂O gelöst und die Lösung anschließend 15 min lang bei 121°C autoklaviert. Nachdem das Nährmedium auf ca. 55°C abgekühlt war, wurde 1 ml einer 1000× konzentrierten, sterilfiltrierten Antibiotica-Stammlösung zugegeben. Alle Medien wurden bei 4°C und dunkel gelagert. Als Antibiotica-Stammlösungen wurden Carbenicillin (100 mg/ml), Kanamycin (50 mg/ml) oder Chloramphenicol (30 mg/ml) verwendet.

LB-Medium mit 7% Saccharose 40 g Pulver für LB-Medium wurden mit Hilfe eines Magnetrührers in 1 l H₂O gelöst und die Lösung anschließend wie oben angegeben autoklaviert. Eine 14%ige Saccharoselösung wurde hergestellt und sterilfiltriert. Nach Abkühlung des autoklavierten Mediums wurde dieses im Verhältnis 1:1 mit der sterilfiltrierten Saccharoselösung gemischt und wie oben beschrieben weiterverwendet.

4.2.7.2 Herstellung von Agarplatten für Bakterien

Reine LB-Agarplatten 30 g Pulver für LB-Agar wurden mit Hilfe eines Magnetrührers in 1 l H₂O suspendiert und durch 15 min langes Autoklavieren bei 121°C in Lösung gebracht. Nachdem das Agarmedium auf schätzungsweise 55°C abgekühlt war, wurde 1 ml einer 1000× konzentrierten, sterilfiltrierten Antibiotica-Stammlösung zugegeben und die noch warme Flüssigkeit unter sterilen Bedingungen in Petrischalen gegossen. Nach dem Aushärten und Trocknen bei RT wurden die Platten in Plastiktüten verpackt und bei 4°C dunkel gelagert.

LB-Agarplatten mit 7% Saccharose Für diese Platten wurden 60 g LB-Agar mit Hilfe eines Magnetrührers in 1 l H₂O suspendiert und die Lösung anschließend wie oben

beschrieben autoklaviert. Eine 14%ige Saccharoselösung wurde hergestellt und sterilfiltriert. Nach Abkühlung des autoklavierten Agars wurde dieser im Verhältnis 1:1 mit der sterilfiltrierten Saccharoselösung gemischt und die Mischung wie oben beschrieben weiterverarbeitet.

LB-Agarplatten zur Blau-Weiß-Selektion Auf eine Antibiotica-haltige LB-Agarplatte mit 10 cm Durchmesser wurden 35 μ l X- β -Gal (50 mg/ml in DMF) und 20 μ l IPTG (24 mg/ml) pipettiert und mit Hilfe eines Drygalskispatels gleichmäßig verteilt. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurden auf diesen Platten Ligationsansätze ausplattiert oder bereits transformierte Bakterienklone ausgestrichen und die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die entstandenen Kolonien 2 h lang bei 4°C inkubiert, wodurch eine bessere Differenzierung zwischen weißen und blauen Klonen erreicht wurde.

4.2.7.3 Anzucht von Bakterien als Flüssigkultur

Um später eine ausreichende Menge Plasmid-DNA isolieren zu können, wurden Bakterienklone als Übernachtskultur vermehrt. Eine auf einer LB-Agarplatte herangezogene Kolonie Bakterien wurde mit einer sterilen Pipettenspitze “gepickt“ und in ein Röhrchen mit 3-4 ml LB-Medium überführt. Anschließend wurde ca. 17 h lang bei 37°C und 350 Upm auf einem Schüttler inkubiert.

4.2.7.4 Präparation von Plasmid-DNA hoher Qualität im kleinen Maßstab aus Bakterien

Die Übernachtskulturen der Bakterien nach 4.2.7.3 wurden in einer Heraeus/Christ-Vari-fuge K bei 3000 Upm und RT 10 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Plasmid-DNA aus dem Bakteriensediment isoliert. Dabei kamen sowohl das “QIAprep Spin miniprep Kit“, als auch das “E.Z.N.A.[®] Plasmid Miniprep Kit I (classic line)“ und das “NucleoSpin[®] Plasmidkit“ zum Einsatz. Es wurde entsprechend den Angaben des jeweiligen “Kit“-Herstellers vorgegangen. Alle verwendeten Systeme lieferten ungefähr dieselben Ausbeuten. Die DNA-Konzentration wurde bestimmt wie in 4.2.7.13 beschrieben.

4.2.7.5 Präparation von Plasmid-DNA geringer Qualität zu Kontrollzwecken

Benötigte Lösungen

STET: 10 mM Tris/HCl, pH 8.0 mit 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA und 5% (w/v) Triton-X 100

Lysozym-Stammlösung: 10 mg/ml Lysozym in H₂O_{dd}

Isopropanol

Ethanol 70%

Gewinnung der Plasmid-DNA 1.5 ml der Bakterien-Übernachtskulturen wurden in einer Tischzentrifuge bei 4°C und 14000 Upm 1 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 400 µl STET vollständig resuspendiert und mit 30 µl Lysozym-Stammlösung versetzt. Die Mischung wurde 1 min lang bei 100°C gekocht und dann 15 min bei 14000 Upm und 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde mit einem sterilen Zahnstocher entfernt, der restliche Ansatz mit 400 µl Isopropanol gemischt. Nach Zentrifugation über 10 min bei 14000 Upm und 4°C wurde das Sediment mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen. Wieder wurde bei 4°C und 14000 Upm 10 min lang zentrifugiert und der Niederschlag danach bei 60°C im Hybridisierungssofen getrocknet. Um die gefällten Nucleinsäuren wieder zu lösen, wurde der Rückstand in 100 µl 65°C warmem H₂O_{dd,a} über 10 min unter mehrmaligem starkem Schütteln gelöst.

4.2.7.6 Anlegen bakterieller Dauerkulturen (Glyceroldauerkulturen); Rekultivierung

Zur dauerhaften Lagerung der Bakterien wurden Glyceroldauerkulturen angelegt. Hierzu wurden 0.5 ml Übernachtskultur und 0.5 ml Glycerol gemischt und sofort bei -80°C eingefroren. Zur Rekultivierung wurde eine kleine Menge der gefrorenen Suspension mit einer sterilen Impföse von der Oberfläche abgekratzt und als Dreifachausstrich auf einer Agarplatte bei 37°C über Nacht inkubiert. Die resultierenden Kolonien wurden bis zu 14 d bei 4°C aufbewahrt.

4.2.7.7 Herstellung flüssiger Nährmedien für Hefen

Benötigte Lösungen und Substanzen

10 M KOH: 56 g KOH-Plätzchen in 100 ml H₂O_{dd} gelöst

0.2% Adeninhemisulfatlösung: 0.2 g Adeninhemisulfat in 100 ml H₂O_{dd}, sterilfiltriert

5000× Kanamycin-Stammlösung: 500 mg Kanamycin in 10 ml H₂O_{dd}, sterilfiltriert

1 M 3-AT: 8.41 g 3-AT in 100 ml H₂O_{dd}, sterilfiltriert

X-alpha-Gal-Lösung: 2 mg X-alpha-Gal in 1 ml DMF

Aminosäuremischung für Hefemedien: Die vollständigen 10× Aminosäuremischungen enthalten folgende L-Aminosäuren (in Klammern sind die späteren 1× Endkonzentrationen im Medium angegeben): Isoleucin (30 mg/l), Valin (150 mg/l), Arginin·HCl (20 mg/l), Histidin·HCl·H₂O (20 mg/l), Leucin (100 mg/l), Lysin/HCl (30 mg/l), Methionin (20 mg/l), Phenylalanin (50 mg/l), Threonin (200 mg/l), Tryptophan (20 mg/l), Tyrosin (30 mg/l) und Uracil (20 mg/l), außerdem Adeninhemisulfat (20 mg/l). Serin, Asparaginsäure und Glutaminsäure werden nach dieser Rezeptur weggelassen, da sie den pH-Wert des Mediums zu stark ins Saure verschieben würden und die eingesetzten Hefestämme diese Aminosäuren selbst synthetisieren können. Als Selektionsmedien wurden SD/-Trp, SD/-Leu, SD/-Trp/-Leu (DDO), SD/-Trp/-Leu/-His (TDO) und SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade (QDO) verwendet (jeweils im Dreibuchstabencode angegebene Aminosäure(n) fehlen gegenüber der obigen vollständigen Aminosäuremischung). Je mehr Aminosäuren im Medium fehlen, desto höher ist der entstehende Selektionsdruck auf die im Medium kultivierten Hefen.

YPDA-Medium: 20 g Pepton, 10 g Hefeextrakt und 20 g wasserfreie Glucose wurden in 900 ml H₂O_{dd} gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert mit 10 M KOH auf 6.0 eingestellt. Das Lösungsvolumen wurde mit H₂O_{dd} auf 1 l gebracht bevor 15 min lang bei 121°C autoklaviert wurde. Nach Abkühlung des Mediums auf ca. 55°C wurden 15 ml sterilfiltrierte Adeninhemisulfatlösung zugegeben. Medium, das für Hefeverpaarungen eingesetzt wurde, wurde desweiteren 0.2 ml Kanamycin-Stammlösung zugesetzt. Das Medium wurde anschließend bei 4°C aufbewahrt.

SD-Medium: 1.7 g “Yeast Nitrogen Base“, 5 g Ammoniumsulfat, 20 g Glucose und die benötigte Aminosäuremischung zur Selektion wurden in 900 ml H_2O_{dd} gelöst und der pH-Wert der Lösung mit 10 M KOH auf 6.0 eingestellt. Das Lösungsvolumen wurde mit H_2O_{dd} auf 1 l gebracht und die Lösung 15 min lang bei 121°C autoklaviert. Das Medium wurde anschließend bei 4°C aufbewahrt.

4.2.7.8 Herstellung von Agarplatten für Hefen

YPDA-Agar 20 g Pepton, 10 g Hefeextrakt, 20 g Glucose und 20 g Bacto-Agar wurden in 900 ml H_2O_{dd} gelöst bzw. suspendiert. Anschließend wurde der pH-Wert mit 10 M KOH auf 6.0 eingestellt. Das Ansatzvolumen wurde mit H_2O_{dd} auf 1 l gebracht und die Lösung 15 min lang bei 121°C autoklaviert. Nach Abkühlung des Agarmediums auf schätzungsweise 55°C wurden 15 ml sterilfiltrierte Adeninhemisulfatlösung zugegeben. Der Agar wurde in Petrischalen mit 10 cm Durchmesser gegossen, die Schalen sofort geschlossen, aufeinander gestapelt und nach dem Aushärten mit dem Boden nach oben für 3-4 d zum Trocknen bei RT belassen. Danach wurden die Platten bei 4°C gelagert.

SD-Agar 1.7 g “Yeast Nitrogen Base“, 5 g Ammoniumsulfat, 20 g Glucose und 20 g Bacto-Agar, sowie die benötigte Aminosäuremischung zur Selektion wurden in 900 ml H_2O_{dd} gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert mit 10 M KOH auf 6.0 eingestellt. Das Lösungsvolumen wurde mit H_2O_{dd} auf 1 l gebracht und die Lösung 15 min lang bei 121°C autoklaviert. Für Agarmedium zwecks Hefeverpaarungen wurden ferner nach Abkühlung des Mediums auf schätzungsweise 55°C 2.5 ml sterilfiltrierte 3-AT-Lösung (1 M, Inhibitor der Histidinbiosynthese) zugegeben. Danach wurde vorgegangen wie bereits bei YPDA-Agar beschrieben. Für X-alpha-Gal-Platten wurden 100 μ l X-alpha-Gal auf eine Agarplatte mit 10 cm Durchmesser pipettiert und mit einem Drygalskispatel verteilt. Nachdem die Lösung ca. 15 min lang bei RT eingezogen und keine Restflüssigkeit mehr erkennbar war, konnten die Platten weiter verwendet werden.

4.2.7.9 Austitrieren von SD/-His/-Leu/-Ade-Platten für Hefeverpaarungen mit 3-AT

Wie in 4.2.7.8 beschrieben, wurde SD/-His/-Trp-Agar hergestellt. Nach Abkühlung auf schätzungsweise 80°C wurden unter sterilen Bedingungen je 50 ml Agarmedium in sterile Plastikgefäße gegossen. Nach Abkühlen auf schätzungsweise 55°C wurde die zur Vermeidung eines Hintergrundwachstums von Hefen benötigte Menge der 3-AT-Lösung (1 M) zugegeben: 125 μ l für 2.5 mM, 250 μ l für 5.0 mM, 375 μ l für 7.5 mM, 500 μ l für 10.0 mM, 625 μ l für 12.5 mM und 750 μ l für 15.0 mM 3-AT-Endkonzentration. Durch Invertieren der

Plastikgefäße wurde das 3-AT mit dem Agarnährmedium vermischt. Anschließend wurde die Lösung in Petrischalen gegossen. Nach Verschließen der Petrischalen und Aushärten des Agars wurden die Agarschalen noch 3 d lang umgedreht bei RT trocknen gelassen. Die später bei Hefeverpaarungen eingesetzten Hefeklone wurden auf den Agarplatten jeweils unterschiedlicher 3-AT-Konzentration dreifach ausgestrichen und die Platten 1 Woche lang bei 30°C inkubiert. Das Wachstum der Hefen wurde täglich kontrolliert. Die ermittelte optimale 3-AT-Konzentration betrug 2.5 mM und wurde bei weiteren Versuchen eingesetzt.

4.2.7.10 Anzucht von Hefen als Flüssigkultur

Eine höchstens zwei Monate alte Hefekolonie mit einem ungefähren Durchmesser von 3 mm wurde zum Animpfen von 2-5 ml des Mediums mit dem entsprechenden erwünschten Selektionsgrad verwendet. Dazu wurde die Kolonie mit einer sterilen Pipettenspitze vom Agar gekratzt, in ein Medium enthaltendes, steriles Glasgefäß überführt, welches über Nacht bei 30°C geschüttelt wurde. Diese Übernachtskulturen (Volumen <5 ml) wurden in Reagenzgläsern mit Kapsenbergverschluß kultiviert und entweder nach 1.5 d zur Plasmidisolierung oder nach maximal eintägiger Inkubation zum Animpfen größerer Kulturen verwendet. Übernachtskulturen mit Volumina >5 ml wurden in mit Alufolie verschlossenen sterilen Erlenmeyerkolben des 5-10fachen Volumens geschüttelt. Kulturen mit Volumina >50 ml wurden zur besseren Durchmischung in Erlenmeyerkolben mit Schikane inkubiert. Die untransfizierten Zellen der Hefestämme AH109 und Y187 wurden auf YPDA-Medium angezogen. Nach Aufnahme von Plasmiden mit Selektionsgenen wurde das entsprechende SD-Medium eingesetzt.

4.2.7.11 Präparation der Plasmid-DNA aus Hefen

Benötigte Lösungen

Hefeaufschlusspuffer: 10% 10× TE-Puffer, 0.2% SDS, 1% (w/v) Triton-X 100

3 M Natriumacetat

Ethanol: 70% und 100%

10× TE-Puffer: 100 mM Tris, 10 mM EDTA; pH 7.5

Aufschluß der Zellen und Fällung der Plasmid-DNA: Wie in 4.2.7.10 beschrieben wuchsen die Hefen ca. 1.5 d lang im entsprechenden Medium. Die Kultur wurde durch Zentrifugation (2 min bei RT und 13000 Upm in der Tischzentrifuge) geerntet und das Sediment mit 1 ml $\text{H}_2\text{O}_{dd,a}$ gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (2 min bei RT und 13000 Upm) wurde das Sediment in 100 μl Hefeaufschlusspuffer resuspendiert. Nach Zugabe einiger Glasperlen und kurzem, heftigen Schütteln wurden 400 μl Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben. Der Ansatz wurde 1 min lang auf dem Vortex-Schüttler heftig gemischt, kurz auf Eis gestellt und dann durch Zentrifugation bei 4°C und 14000 Upm über 2 min in zwei Phasen aufgetrennt. Die wäßrige Phase (ca. 100 μl) wurde abpipettiert und in ein neues Zentrifugengefäß mit 1.5 ml Volumen überführt. Dann wurden 10 μl eiskalte 3 M Natriumacetatlösung und 250 μl eiskaltes 100%iges Ethanol zugegeben. Nach heftigem Schütteln wurde die Plasmid-DNA über Nacht bei -20°C gefällt. Am nächsten Morgen wurde der Niederschlag in einer Tischzentrifuge bei 4°C und 14000 Upm über 30 min abgetrennt, mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen und 15 min lang bei 4°C und 14000 Upm wieder sedimentiert. Der Überstand wurde durch Trocknen bei 60°C im Hybridisierungssofen entfernt, der resultierende Rückstand in 10 μl $\text{H}_2\text{O}_{dd,a}$ gelöst (50-60°C, 10 min, Wasserbad). 5 μl dieser Lösung wurden für die Transformation einer Einheit kompetenter Zellen “NovaBlue™ Singles“ eingesetzt (siehe 4.2.7.26).

4.2.7.12 Anlegen von Hefe-Dauerkulturen (Glyceroldauerkulturen)

Benötigte Lösungen

50% Glycerol: 50% Glycerol in H_2O_{dd} , sterilfiltriert

Anlegen und Rekultivierung: Zur dauerhaften Lagerung der Hefen wurden Glyceroldauerkulturen angelegt. Hierzu wurde eine Mischung von 0.5 ml Übernachtkultur (siehe 4.2.7.10) und 0.5 ml 50% Glycerol sofort bei -80°C eingefroren. Zur Rekultivierung wurde eine kleine Menge der gefrorenen Suspension mit einer sterilen Impföse von der Oberfläche abkratzt und auf einer Agarplatte ausgestrichen. Die Platten wurden bei 30°C 2-4 d lang inkubiert. Die resultierenden Kolonien wurden bis zu 2 Monate bei 4°C aufbewahrt.

4.2.7.13 Photometrische Bestimmung der Nucleinsäurekonzentration

Die Konzentrationen von DNA und RNA wurde photometrisch bestimmt. Hierzu wurde die Extinktion bei 260 nm gemessen. Das Lösungsmittel, in dem sich die Nucleinsäure befand, diente als Referenz (Nullwert). Ein E_{260} -Wert von 1 entsprach einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bei doppelsträngiger DNA und einer Konzentration von 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$

bei RNA. Durch sinnvolle Vorverdünnungen der Ausgangsproben wurde die Extinktion zwischen 0.1 und 1 gehalten, um die lineare Abhängigkeit zwischen Nucleinsäurekonzentration und Extinktion zu gewährleisten. Das eingesetzte Probenvolumen betrug 10 μl . Um die Reinheit der Proben abschätzen zu können, wurde das Verhältnis E_{260}/E_{280} bestimmt. Als proteinfrei wurde eine Nucleinsäurelösung mit einem Quotienten von 1.8 bis 2.0 angesehen.

4.2.7.14 Klonierung des pAK7-PCR-Produkts in das Köderplasmid pLP-GBKT7

Klonierung des pAK7-PCR-Produkts in den Donorvektor pDNR-1r: Aus EPK wurde mit Hilfe des "RNeasy RNA Isolation Kits" nach Herstellerangaben die Gesamzell-RNA isoliert. 1 μg dieser RNA wurde mit 1 μl RNasin (40 U/ μl) und 1 μl Oligo(dT₁₅) Adapter-"Primern" (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) gemischt. Das Reaktionsvolumen wurde mit H₂O_{dd} auf 12 μl gebracht bevor 10 min lang bei 70°C inkubiert wurde. Nach kurzer Abkühlung auf Eis wurden zusätzlich zugegeben: 1 μl RNasin (40 U/ μl), 2 μl 10× "Omniscrypt"-Puffer RT, 2 μl DTT (0.1 M), 1 μl dNTPs (alle Nucleotide je 10 mM) und 1 μl H₂O_{dd}. Die Mischung wurde 2 min lang bei 70°C inkubiert und dann nach Zugabe von 1 μl Reverser Transkriptase "Omniscrypt" (4 U/ μl) bei 70°C weitere 50 min lang inkubiert. Anschließend wurde das Enzym über 5 min bei 95°C hitzeinaktiviert. Das Reaktionsgefäß wurde kurz zur Abkühlung auf Eis gestellt und dann bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Zur Amplifikation der pAK7-cDNA wurde Eppendorf-"Triple Master"-Polymerase verwendet. Es wurden zwei Reaktionsansätze hergestellt, wobei der erste 1 μl EPK-cDNA und 2 μl "Primer-Mix", der zweite 6.0 μl 10× "High Fidelity"-Puffer, 1.0 μl dNTPs und 0.5 μl Eppendorf-"Triple Master Mix" mit Polymerase enthielt. Beide Mischungen wurden mit H₂O_{dd,a} auf 10 μl bzw. 40 μl ergänzt. Die Ansätze wurden beide auf 94°C erhitzt und erst dann gemischt. Vor der PCR wurde 5 min lang bei 95°C inkubiert. Es folgten 30 PCR-Zyklen mit je 94°C über 30 s; 55°C über 30 s und 72°C über 2 min 10 s. Die finale Elongation bei 72°C dauerte 10 min.

Das entstandene PCR-Produkt wurde mit dem "QIAquick PCR Purification Kit" nach Herstellerangaben gereinigt. Anschließend wurde es mit je 10 U EcoRI und BamHI in EcoRI-Puffer mit 0.1 mg/ml BSA 4 h lang bei 37°C verdaut (vergleiche 4.2.7.19). Nach der Hitzeinaktivierung der Enzyme bei 65°C über 20 min wurde die verdaute DNA mit dem "QIAquick"-Gelextraktions-"Kit" nach Herstellerangaben gereinigt. Die pDNR-1r-Vektor-DNA wurde auf die gleiche Weise verdaut, jedoch wurden nach der Hitzeinaktivierung der Enzyme zur Dephosphorylierung 5 μl Dephosphorylierungspuffer (500 mM Tris/HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA) und 0.5 μl CIAP (70000 U/ml) zugegeben. Anschließend wurde die Vektor-DNA gefällt (siehe 4.2.7.20) und über Agarose-Gelelektrophorese (4.2.7.23) mittels "QIAquick"-Gelextraktions-"Kit" gereinigt.

Vektor-DNA und PCR-Produkt wurden mit T4-Ligase ligiert (4.2.7.24). Das Produkt wurde anschließend in "NovaBlueTM Singles" Zellen transfiziert (4.2.7.26). Von den gewachsenen Klonen wurden mehrere mit einer Pipettenspitze aufgenommen und auf Agar-

platten ausgestrichen. Mit derselben Pipettenspitze wurden 3 ml LB-Medium mit Carbenicillin in einem 14 ml Plastikröhrchen angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde mit dem “QIAprep Spin Miniprep Kit“ gemäß Handbuch des Herstellers die Plasmid-DNA aus den E.coli-Zellen isoliert und zur Kontrolle der Klonierung mit mit Ecl136II und EcoRV verdaut (4.2.7.19). Klone, die nach Analyse des Verdaumusters gemäß der Agarose-Gelelektrophorese die erwarteten Banden aufwiesen, wurden kommerziell bei SeqLab Laboratories, Göttingen, sequenziert. Von einem der mutationsfreien Klone wurde eine Glyceroldauerkultur (4.2.7.6) angelegt, die dann bei -80°C gelagert wurde.

Verwendete “Primer“-Sequenzen für die Klonierung in pDNR-1r:

pAK7 5′-GCATACGAATTCCATGGCTGAAGAGGAAGTTCCT-3′
 5′-GCATACGGATCCGCCTGCATTTCTGGGATTGTTCT-3′

Transfer des pAK7-PCR-Produkts in den Akzeptorvektor pLP-GBKT7: Zum Transfer der pAK7-cDNA aus dem Klonierungsvektor pDNR-1r in den Hefevektor pLP-GBKT7 wurde die Cre-Rekombinase des “BD CreatorTM DNA Cloning Kits“ verwendet. Nach Protokoll des Herstellers wurden je 200 ng des Donor- und des Akzeptorvektors mit 10× Cre Reaktionspuffer, 10× BSA (1 mg/ml) und Cre-Rekombinase (100 ng/μl) gemischt und bei RT 15 min lang inkubiert. Das Enzym wurde bei 70°C über 5 min inaktiviert, um eine Rückreaktion zu verhindern. Dann wurde 1 μl des Reaktionsansatzes zur Transfektion kompetenter Zellen (“NovaBlueTM Singles“) (4.2.7.26) verwendet. Die zur Selektion verwendeten Agarplatten enthielten außer dem zum pLP-GBKT7-Selektionsgen korrespondierenden Carbenicillin noch 30 μg/ml Chloramphenicol und 7% Saccharose, um Bakterien mit den gewünschten Rekombinationsergebnissen zu selektieren. Von den erhaltenen Kolonien wurden mehrere ausgewählt und auf Agarplatten ausgestrichen. Anschließend wurde der Rest dieser Kolonien zur Animpfung von 3 ml LB-Medium mit Carbenicillin, Chloramphenicol und Saccharose, wie oben beschrieben, verwendet und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde, wie in 4.2.7.4 beschrieben, die Plasmid-DNA aus den E.coli-Zellen isoliert und zur Kontrolle der Rekombination mit HindIII und EcoRV gemäß 4.2.7.19 verdaut. Klone, die nach Analyse des Verdaumusters durch Agarose-Gelelektrophorese die erwarteten Banden aufwiesen, wurden zur Transfektion von Hefen (4.2.7.27) eingesetzt. Parallel wurde eine Glyceroldauerkultur (4.2.7.6) angelegt, die dann bei -80°C gelagert wurde.

4.2.7.15 Klonierung des pAK7-PCR-Produkts mit Hilfe eines “Fluoreszenzvektors“

Der Vektor pWPXL wurde mit EcoRI und MluI verdaut (siehe 4.2.7.19) und wie im Abschnitt 4.2.7.23 angegeben mittels Gelelektrophorese gereinigt. Für die PCR zur Amplifikation des pAK7-EGFP-PCR-Produkts wurden zwei Reaktionsansätze hergestellt, wobei der erste 5 ng Matrize (pEGFP-C1-pAK7) und 6 μl “Primer-Mix“, der zweite 10.0 μl 10 \times Eppendorf-“High Fidelity“-Puffer, 2.0 μl dNTPs (10 mM jedes Nucleotids) und 1.0 μl Eppendorf-“Triple Master“-Polymerase [5 U/ μl] enthielt. Beide Mischungen wurde mit $\text{H}_2\text{O}_{dd,a}$ auf 50 μl ergänzt. Die Ansätze wurden beide auf 94°C erhitzt und dann gemischt. Es folgten 2 min bei 94°C und danach 15 PCR-Zyklen mit je 94°C über 30 s; 58°C über 30 s und 72°C über 2 min 45 s. Die abschließende Elongation bei 72°C dauerte 10 min. Anschließend wurde das PCR-Produkt mit dem “QIAquick PCR Purification Kit“ nach Herstellerangaben gereinigt. Die resultierenden 50 μl Eluat des PCR-Produkts wurden mit 10.0 μl 10 \times MBI-Puffer “R“, 1.0 μl MluI, 0.5 μl EcoRI und 38.5 μl $\text{H}_2\text{O}_{dd,a}$ gemischt und 4 h lang bei 37°C verdaut. Danach wurden die Restriktionsendonucleasen über 20 min bei 65°C inaktiviert. Wie in 4.2.7.23 angegeben, wurde das verdaute PCR-Produkt über Gelelektrophorese mit dem “QIAquick“-Gelextraktions-“Kit“ gereinigt. Die Ligation von verdaulichem pAK7-EGFP-PCR-Produkt und Vektor pWPXL wurde über Nacht bei 16°C durchgeführt. Der Reaktionsansatz enthielt, abweichend von 4.2.7.24, aufgrund der Vektorgröße von >10 kb größtmögliche Mengen des geschnittenen Vektors (6.0 μl) und PCR-Produkts (10 μl), außerdem 2.0 μl 10 \times T4 DNA-Ligasepuffer und 2.0 μl T4 DNA-Ligase. Am folgenden Morgen wurde die Ligase bei 65°C 10 min lang inaktiviert. Danach wurde der Ligationsansatz, wie in 4.2.7.26 angegeben, zur Transfektion kompetenter DH5 α -Zellen eingesetzt.

Mehrere der gewachsenen Klone wurden, wie in 4.2.7.14 beschrieben, “gepickt“, ausgestrichen und über Nacht in LB-Medium mit Carbenicillin kultiviert. Am nächsten Morgen wurde, wie in 4.2.7.5 beschrieben, die Plasmid-DNA aus den E.coli-Zellen isoliert und zur Kontrolle der Klonierung mit SpeI verdaut. Für den Restriktionsansatz wurden 1.0 μl 10 \times NEB2-Puffer, 0.1 μl Enzym, 1.0 μl RNase A (0.3 mg/ml) und 0.1 μl 100 \times BSA (10 mg/ml) mit $\text{H}_2\text{O}_{dd,a}$ auf 10 μl ergänzt und mit 5 μl der DNA-Präparation gemischt. Der Verdauungsansatz inkubierte bei 37°C über Nacht. Am nächsten Morgen wurden die Restriktionsendonucleasen bei 65°C über 20 min inaktiviert. Die gesamte Probe wurde mit 5 μl 3 \times Ladepuffer versetzt und, wie in 4.2.7.22 beschrieben, elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Abgleich der Fragmentlängen gegen die über das Computerprogramm “Vector NTI“ berechneten Werte wurden Klone mit dem erwarteten Verdauemuster zur

kommerziellen Sequenzierung an die Firma MWG geschickt.

Verwendete Primersequenzen für die Klonierung in pWPXL:

pAK7-EGFP 5'-GAACGCGTCACCATGGCTGAAGAGGAAGTTCCTGC-3'
 5'-GAGAATTCCTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG-3'

4.2.7.16 Klonierung der pAK7-Teilstücke in das Köderplasmid pLP-GBKT7

Klonierung der pAK7-Teilstücke in pDNR-1r Um die pAK7-Teilstücke zu klonieren, wurde das pDNR-1r-Plasmid mit EcoRI und BamHI verdaut (siehe 4.2.7.19) und anschließend nach dem Protokoll des "QIAquick"-Gelextraktions-"Kits" gereinigt. Die pAK7-Teilstücke wurden unter Einsatz von Pwo-DNA-Polymerase mittels PCR hergestellt. Es wurden zwei getrennte Ansätze vorbereitet. Ansatz 1 enthielt 5 ng Matrize (pDNR-1r-pAK7) aus 4.2.7.14, 6 μl "Primer-Mix" (je 10 μM), 2 μl dNTPs (10 mM von jedem Nucleotid) und $\text{H}_2\text{O}_{dd,a}$ in einem Volumen von 50 μl . Ansatz 2 enthielt 10 μl "kompletten Reaktionspuffer", 2.5 μl Pwo-Polymerase [1 U/ μl] und 37.5 μl $\text{H}_2\text{O}_{dd,a}$. Beide Ansätze wurden auf 94°C gebracht, gemischt und 2 min lang bei 94°C initial denaturiert. Es folgten 15 PCR-Zyklen (94°C, 30 s; 50°C, 30 s; 72°C, 1 min). Die terminale Elongation bei 72°C dauerte 7 min. Die PCR-Produkte wurden mit dem "QIAquick PCR Purification Kit" nach Herstellerangaben gereinigt und danach mit BamHI und EcoRI gemäß 4.2.7.19 über Nacht verdaut.

Nach Reinigung mit dem "QIAquick"-Gelextraktions-"Kit" wurden 25 ng Vektor-DNA und 23 ng der jeweils zu ligierenden pAK7-Teilstücke mit 2.0 μl T4 DNA-Ligase und 1 \times T4 DNA-Ligasepuffer in einem Volumen von 20 μl über Nacht bei 16°C inkubiert (vergleiche 4.2.7.24). Am folgenden Morgen wurde die Ligase bei 65°C 10 min lang inaktiviert. Danach wurde der Ligationsansatz, wie in 4.2.7.26 angegeben, zur Transfektion kompetenter DH5 α -Zellen eingesetzt. Mehrere der gewachsenen Kolonien wurden selektiert (4.2.7.14) und sowohl ausgestrichen als auch über Nacht in je 5 ml LB-Medium mit Carbenicillin kultiviert. Am nächsten Morgen wurde mit dem "E.Z.N.A.[®] Plasmid Miniprep Kit I (classic line)" nach Herstellerangaben die Plasmid-DNA aus den E.coli Zellen isoliert. Die DNA-Konzentration wurde wie in 4.2.7.13 beschrieben bestimmt. 500 ng der DNA wurden zur Kontrolle der Klonierung mit PvuII und im Doppelverdau mit EcoRI und BamHI verdaut (4.2.7.19). Kolonien, die nach Analyse des Verdaumusters durch Agarose-Gelelektrophorese die erwarteten Banden aufwiesen, wurden kommerziell bei SeqLab Laboratories, Göttingen, sequenziert. Von je einem der mutationsfreien Klone wurde

eine Glyceroldauerkultur (4.2.7.6) angelegt, die ab dann bei -80°C gelagert wurde.

Verwendete “Primer“-Sequenzen für die Klonierung in pDNR-1r:

pAK7-1 5'-GCATCAGAATTCCATGGCTGAAGAGGAAGTTCC-3'
 5'-GCATACGGATCCTATTGCTCCCGTCTCCAAACA-3'

pAK7-2 5'-GCATCAGAATTCCATGTGCATTCCAGCCATT-3'
 5'-GCATACGGATCCTTTCATCTTCCTGGTTGAACAGG-3'

pAK7-3 5'-GCATCAGAATTCCATGGAGGAAGAAGAGGAAGTCA-3'
 5'-GCATACGGATCCTCTGCATTTTCGGGATTGTTCTTG-3'

pAK7-4 GCATCAGAATTCCATGGCTGAAGAGGAAGTTCC-3'
 5'-GCATACGGATCCTAGGGCCGGTATTTTTTGCTGA-3'

pAK7-5 5'-GCATCAGAATTCCATGGGAAAAATCCAGAAAGTACC-3'
 5'-GCATACGGATCCTGCTGTAGTGAGTTCCCGCCA-3'

pAK7-6 5'-GCATCAGAATTCCATGCAGGACCGATTCCT-3'
 5'-GCATACGGATCCTCTGCATTTTCGGGATTGTTCTTG-3'

Transfer der pAK7-Teilstücke in pLP-GBKT7: Zum Transfer der cDNAs der pAK7-Teilstücke aus dem Klonierungsvektor pDNR-1r in den Hefektor pLP-GBKT7 wurde die Cre-Rekombinase des “BD CreatorTM DNA Cloning Kits“ verwendet. Es wurde wie in 4.2.7.14 beschrieben vorgegangen.

4.2.7.17 Klonierung des pAK7-PCR-Produkts in den lentiviralen Vektor pWPXL

Zur Amplifikation der pAK7-cDNA wurde die “Pfu Ultra High-Fidelity Hotstart“-DNA-Polymerase verwendet. Für den Reaktionsansatz wurden $5.0\ \mu\text{l}$ $10\times$ Pfu-Polymerase-Puffer, $5\ \text{ng}$ Plasmid-DNA von pWPXL-pAK7-EGFP (4.2.7.15) als Matrize, $2.5\ \mu\text{l}$ “Primer-Mix“ (je $10\ \mu\text{M}$), $1.0\ \mu\text{l}$ dNTPs ($10\ \text{mM}$ von jedem Nucleotid) und $1.0\ \mu\text{l}$ Pfu-“Hotstart“-Polymerase in einem PCR-Reaktionsgefäß vereinigt und mit $\text{H}_2\text{O}_{dd,a}$ auf ein Volumen von $50\ \mu\text{l}$ aufgefüllt. Die PCR wurde mit der Aktivierung der DNA-Polymerase über $2\ \text{min}$ bei 95°C begonnen. Es folgten 20 Zyklen mit je 95°C über $30\ \text{s}$, 55°C über $30\ \text{s}$ und 72°C über $2.5\ \text{min}$. Die finale Elongation bei 72°C dauerte $10\ \text{min}$. Anschließend wurde das PCR-Produkt mit dem “NucleoSpin[®] Extract II Kit“ nach Herstellerangaben gereinigt. Die resultierenden $50\ \mu\text{l}$ Eluat mit PCR-Produkt wurden mit $10.0\ \mu\text{l}$ $10\times$ EcoRI-Puffer, $2.0\ \mu\text{l}$ MluI, $1.0\ \mu\text{l}$ EcoRI und $37.0\ \mu\text{l}$ $\text{H}_2\text{O}_{dd,a}$ gemischt und bei 37°C über Nacht verdaut. Am nächsten Morgen wurden die Restriktionsendonucleasen bei 65°C $20\ \text{min}$ lang

inaktiviert. Wie in 4.2.7.23 angegeben wurde das verdaute PCR-Produkt über Gelelektrophorese gereinigt. Die Ligation von verdaulichem pAK7-PCR-Produkt und verdaulichem Vektor (4.2.7.15) wurde über Nacht bei 16°C in einem Reaktionsansatz durchgeführt, der außer 6.0 µl geschnittenem Vektor noch 10 µl pAK7-cDNA, 2.0 µl 10× T4 DNA-Ligasepuffer und 2.0 µl T4 DNA-Ligase enthielt. Am folgenden Morgen wurde die Ligase bei 65°C 10 min lang inaktiviert. Danach wurde der Ligationsansatz, wie in 4.2.7.26 angegeben, zur Transfektion kompetenter DH5α-Zellen eingesetzt.

Mehrere der gewachsenen Kolonien wurden "gepickt" (4.2.7.14) und sowohl auf Agarplatten ausgestrichen als auch über Nacht in LB-Medium mit Carbenicillin kultiviert. Am nächsten Morgen wurde die Plasmid-DNA mit dem "NucleoSpin®"-Plasmid-"Kit" aus den E.coli-Zellen isoliert. Die DNA-Konzentration wurde bestimmt wie in 4.2.7.13 beschrieben. Zur Kontrolle der Klonierung wurden 500 ng der DNA verdaulich. Das erste hierzu verwendete Restriktionsenzym war SspI, das zweite XhoI. Für den SspI-Ansatz wurden 5.0 µl 10× NEB2-Puffer, 1.0 µl Enzym und 500 ng der DNA gemischt und mit H₂O_{dd,a} auf 50 µl ergänzt. Für den XhoI-Ansatz wurden 5.0 µl 10× NEB2-Puffer, 0.5 µl 100× BSA [10 mg/ml], 0.5 µl Enzym und 500 ng der DNA gemischt und mit H₂O_{dd,a} auf 50 µl ergänzt. Der Verdau inkubiert bei 37°C über Nacht. Am nächsten Morgen wurden die Restriktionsendonucleasen bei 65°C 20 min lang inaktiviert. Klone, die nach Analyse des Verdaumusters mittels Agarose-Gelelektrophorese die erwarteten Banden aufwiesen, wurden kommerziell bei MWG, Martinsried, sequenziert. Von einem der mutationsfreien Klone wurde eine Glyceroldauerkultur (4.2.7.6) angelegt, die anschließend bei -80°C gelagert wurde.

Verwendete Primersequenzen für die Klonierung in pWPXL:

pAK7 5'-GAACGCGTCACCATGGCTGAAGAGGAAGTTCCTGC-3'
 5'-GAGAATTCCTACTGCATTTTCGGGATTGTTCTTG-3'

4.2.7.18 Klonierung des AK1-PCR-Produkts in den lentiviralen Vektor pWPXL

Klonierung von AK1 in pWPXL Zur Amplifikation der AK1-cDNA aus Ratte wurde die "Pfu Ultra High-Fidelity Hotstart"-DNA-Polymerase verwendet. Für den Reaktionsansatz wurden 5.0 µl 10× Pfu-Polymerase-Puffer, 5 ng cDNA als Matrize, 2.5 µl "Primer-Mix" (je 10 µM), 1.0 µl dNTPs (10 mM von jedem Nucleotid) und 1.0 µl Pfu-"Hotstart"-Polymerase in ein PCR-Reaktionsgefäß pipettiert. Mit H₂O_{dd,a} wurde auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt. Die PCR wurde mit der Aktivierung der DNA-Polymerase

über 2 min bei 95°C begonnen. Es folgten 13 Zyklen mit je 95°C über 30 s, 55°C über 30 s und 72°C über 2.5 min. Die finale Elongation bei 72°C dauerte 10 min. Anschließend wurde das PCR-Produkt mit dem “NucleoSpin[®] Extract II Kit“ nach Herstellerangabe gereinigt. Die resultierenden 50 μ l Eluat mit PCR-Produkt wurden zur Erzeugung Vektor-kompatibler Enden mit 10.0 μ l 10 \times EcoRI-Puffer, 2.0 μ l MluI, 1.0 μ l EcoRI und 37.0 μ l H₂O_{dd,a} gemischt und bei 37°C über Nacht verdaut. Am nächsten Morgen wurden die Restriktionsendonucleasen bei 65°C über 20 min inaktiviert. Wie in 4.2.7.23 angegeben wurde das verdaute PCR-Produkt mittels Gelelektrophorese gereinigt. Die Ligation des AK1-Fragments mit dem gemäß 4.2.7.15 verdauten Vektor pWPXL wurde über Nacht bei 16°C durchgeführt. Der Reaktionsansatz enthielt die größtmögliche Menge des geschnittenen Vektors (6.0 μ l) und des erzeugten AK1-Fragments (10 μ l), außerdem 2.0 μ l 10 \times T4 DNA-Ligasepuffer und 2.0 μ l T4 DNA-Ligase. Diese Abweichung von 4.2.7.24 war notwendig, da die Vektorgöße 10 kb überschritt. Am folgenden Morgen wurde die Ligase 10 min lang bei 65°C inaktiviert. Danach wurde der Ligationsansatz, wie in 4.2.7.26 angegeben, zur Transfektion kompetenter DH5 α -Zellen eingesetzt.

Mehrere der nach 24 Stunden gewachsenen Klone wurden gemäß 4.2.7.14 sowohl auf selektiven Agarplatten als auch in Flüssigmedium (LB-Medium mit Carbenicillin) kultiviert. Am nächsten Morgen wurde die Plasmid-DNA mit dem “NucleoSpin[®]“-PlasmidKit aus den E.coli-Zellen isoliert. Die DNA-Konzentration wurde gemäß 4.2.7.13 bestimmt, um anschließend 500 ng der Plasmid-DNA zur Kontrolle der Klonierung mit Restriktionsendonucleasen zu verdauen. Das erste hierzu verwendete Enzym war SspI, das zweite XhoI. Für den SspI-Ansatz wurden 5.0 μ l 10 \times NEB2-Puffer, 1.0 μ l Enzym und 500 ng der DNA gemischt und mit H₂O_{dd,a} zu 50 μ l ergänzt. Für den XhoI-Ansatz wurden 5.0 μ l 10 \times NEB2-Puffer, 0.5 μ l 100 \times BSA, 0.5 μ l Enzym und 500 ng der DNA gemischt und mit H₂O_{dd,a} zu 50 μ l ergänzt. Der Verdau-Ansatz inkubierte bei 37°C über Nacht. Am nächsten Morgen wurden die Restriktionsendonucleasen bei 65°C über 20 min inaktiviert. Klone, die nach Analyse des Verdaumusters per Agarose-Gelelektrophorese die erwarteten Banden aufwiesen, wurden kommerziell sequenziert (MWG, Martinsried). Von einem der mutationsfreien Klone wurde eine Glyceroldauerkultur (4.2.7.6) angelegt, die dann bei -80°C gelagert wurde.

Klonierung von AK1-cDNA in pWPXL mit DNA-Einschub für Peptid 64 Zur Amplifikation der AK1-cDNA ohne Stop-Codon wurde das oben beschriebene Protokoll angewendet. Als Matrize für die PCR diente das zuvor klonierte Plasmid mit AK1-cDNA-Einschub. Zur C-terminalen Verlängerung des AK1-Leserahmens um die Sequenz für das “Peptid 64“ (siehe Einleitung zu 2.4) wurde das PCR-Protokoll abgewandelt; nach der

Aktivierung der Polymerase folgten 15 Zyklen von je 95°C über 30 s, 55°C über 30 s und 72°C über 10 s. Die Elongationszeit von 10 min und die Temperatur von 72°C blieben unverändert. Die amplifizierte Sequenz für Peptid 64 und das Konstrukt pWPXL-AK1 wurden beide separat mit EcoRI und SpeI verdaut und gereinigt. Alle weiteren Schritte wurden wie in 4.2.7.18 angegeben durchgeführt.

Verwendete Primersequenzen für die Klonierung in pWPXL:

AK1	5'-GAACGCGTATGGAAGACAAGCTGAAGAAGGCCA-3'
	5'-GAGAATTCTCACTTCAGGGAGTCAAGATAGGTGCAGAC-3'
AK1	5'-GAACGCGTATGGAAGACAAGCTGAAGAAGGCCA-3'
(ohne Stop-Codon)	5'-GAGAATTCCTTCAGGGAGTCAAGATAGGTGCAGACC-3'
Peptid 64	5'-GAGAATTCGATTTTCTGGCCGAGTATCTCTTCAAGAAC-3'
	5'-GAACTAGTTCCTGCATTTCGGGATTGTTCTTGAAGAG-3'

4.2.7.19 Verdau von DNA mit Restriktionsendonucleasen

Präparativer Verdau von Vektor-DNA und PCR-Produkt 2-4 mg DNA wurden mit je 10 U der benötigten Restriktionsenzyme im geeigneten Puffer bei entsprechender Temperatur über Nacht verdaut. Die Ansatzvolumina betragen in der Regel 50 μ l, jedoch 100 μ l, wenn ein Doppelverdau mit zwei Enzymen durchgeführt wurde. Durch die Verdopplung des Ansatzvolumens wurde die sog. "star-activity" der Enzyme vermieden, die ab einer Glycerolkonzentration von >1% (v/v) häufig auftritt (Angabe des Herstellers Fermentas unter <http://www.fermentas.com/techinfo/re/restrstaract.htm>).

Analytischer Verdau von rekombinanter DNA 0.5-1 mg rekombinante Plasmid-DNA wurde mit je 10 U der benötigten Restriktionsenzyme im geeigneten Puffer bei entsprechender Temperatur 2-4 h lang verdaut. Das Ansatzvolumen betrug jeweils 50 μ l.

4.2.7.20 Phenol-/ Chloroform-/ Isoamylalkohol-Extraktion verdauter Vektoren mit anschließender Ethanolpräzipitation

Die Prozedur wurde durchgeführt, um im Ansatz vorhandene Proteine zu entfernen und einen für nachfolgende Schritte optimal geeigneten Puffer verwenden zu können.

Benötigte Lösungen

Phenol-/ Chloroform-/ Isoamylalkohol (25:24:1 v/v/v)

3 M Natriumacetat

Ethanol 70% und 100%

Durchführung der Fällung Die verdaute Vektor-DNA aus 4.2.7.19 wurde mit dem gleichen Volumen Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (25:24:1 v/v/v) in einem 1.5 ml-Plastikreaktionsgefäß durch "Vortexen" ca. 1 min lang gemischt. Zur Beschleunigung der Phasentrennung wurde die Mischung anschließend kurz bei RT zentrifugiert und dann 2 min lang auf Eis gestellt. Die wässrige Phase wurde in ein neues 1.5 ml-Plastikreaktionsgefäß überführt und dort mit dem 0.1fachen Volumen eiskalter 3 M Natriumacetatlösung und dem 2.5fachen Volumen eiskalten 100%igen Ethanols versetzt. Nach kurzem Mischen ("Vortexen") wurde die DNA über Nacht bei -20°C gefällt. Am nächsten Morgen wurde der Fällungsansatz 30 min lang bei 4°C und 14000 Upm zentrifugiert. Der Niederschlag wurde mit 1 ml 70% Ethanol (v/v) gewaschen und 15 min lang bei 4°C und 14000 Upm zentrifugiert. Der Rückstand wurde 1 h lang bei 60°C im Hybridisierungsofen getrocknet.

4.2.7.21 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Das nach 4.2.7.20 erhaltene DNA-Sediment wurde in 50 μ l 1 \times CIAP-Reaktionspuffer gelöst und die Lösung in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt. 50 μ l 1 \times CIAP-Reaktionspuffer mit 0.5 μ l CIAP, entsprechend 0.5 U, und die DNA-Lösung wurden gemischt und die Mischung 1 h lang bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Enzym 15 min lang bei 85°C inaktiviert. Der dephosphorylierte Vektor wurde, wie in 4.2.7.23 angegeben, mittels Gelelektrophorese und anschließender Gelextraktion gereinigt.

4.2.7.22 Agarosegelelektrophorese

Benötigte Lösungen

50× **TAE:** 2 M Tris; 0.1 M EDTA, Natriumsalz; pH 8.5 (mit Eisessig eingestellt)

3× **DNA-Ladepuffer:** 40% (w/v) Saccharose, 0.25% Bromphenolblau

5× **DNA-Ladepuffer:** 40% (w/v) Saccharose, 0.25% Bromphenolblau

Durchführung der Elektrophorese Die Agarosegelelektrophorese wurde sowohl zu analytischen als auch zu präparativen Zwecken (zur DNA-Reinigung) eingesetzt. Die Agarosekonzentrationen der Gele variierten je nach Größe der erwarteten Fragmente zwischen 0.8 und 2.2%. Die Agarose wurde in 50 ml 1× TAE-Puffer durch Erhitzen im Mikrowellengerät geschmolzen. Nach anschließender Abkühlung der Lösung auf schätzungsweise 40-45°C wurde sie in einen 110 × 90 mm großen Gelschlitten gegossen. Sofort danach wurde zur Ladetaschenbildung ein Gelkamm eingesetzt. Für analytische Gele belief sich die Kapazität der Taschen auf 20 μ l Ladevolumen, in präparative Geltaschen konnten bis zu 35 μ l Probe geladen werden. Nach Gelieren der Agarose wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer mit 1× TAE-Puffer eingesetzt und vom Kamm befreit. Zur Probenherstellung wurde der 5fach konzentrierter Ladepuffer gegebenenfalls unter Zuhilfenahme von H_2O_{dd} so mit der aufzutrennenden Lösung gemischt, dass sich die einfache Konzentration ergab und die Lösung in die Taschen geladen. Die Elektrophorese wurde bei 75-100 V über ca. 1.5 h durchgeführt. Als DNA-Größenstandards wurden "GeneRuler 1 kb DNA Ladder" oder "GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus" verwendet. Zur Anfärbung der Nucleinsäuren wurde das Agarosegel 1.5 h lang in 0.005% Ethidiumbromid / 1× TAE (w/v) bei RT inkubiert. Die DNA-Banden wurden auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht ($\lambda = 254$ nm). Dokumentiert wurden die Gele mit einer Digitalkamera. Die präparativen Agarosegele wurden behandelt wie in 4.2.7.23 beschrieben.

4.2.7.23 DNA-Extraktion aus präparativen Agarosegelen

In die erste und/oder letzte Tasche eines präparativen Agarosegels wurden 5 μ l DNA-Größenstandard ("GeneRuler 1 kb DNA Ladder" oder "GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus"), in die benachbarten 3 Taschen je 5 μ l, 25 μ l und 25 μ l der zu präparierenden DNA-Probe geladen. Nach Durchführung der Gelelektrophorese (siehe 4.2.7.22) wurde das Gel auf einer Glasplatte mit einem Skalpell so zerteilt, dass die äußerste(n) mit DNA-Größenstandard und zusätzlich die nur mit 5 μ l der DNA-Probe bestückten

Spur(en) der Länge nach vom Hauptteil des Gels abgetrennt wurden. Der bzw. die äußere(n) Gelstück(e) wurde(n) in 0.005% Ethidiumbromid / $1 \times$ TAE 1.5 h lang gefärbt. Auf dem UV-Transilluminator wurde anschließend die interessierende Bande möglichst knapp ausgeschnitten. Der bzw. die Gelstreifen wurde(n) mit einer Digitalkamera vor und nach dem Ausschneiden zu Dokumentationszwecken fotografiert. Der bzw. die Gelstreifen wurde(n) nun wieder genau an den Hauptteil des Gels angelegt. Jeweils genau auf Höhe des ausgeschnittenen Fragments wurde ein Streifen aus dem ungefärbten Hauptteil des Gels ausgeschnitten, in einem leeren, tarierten 14 ml-Plastikgefäß gewogen und ggf. in kleinere Stücke zerteilt. Danach wurde die DNA mit einem "QIAquick"-GelextraktionsKit oder "NucleoSpin[®] Extract II Kit" nach Herstellerprotokoll isoliert. Die Menge der isolierten DNA wurde bestimmt wie in 4.2.7.13 angegeben.

4.2.7.24 Ligation von Vektor und PCR-Produkt

Das verdaute PCR-Produkt und der Vektor (siehe 4.2.7.19) wurden über Nacht bei 16°C in einem Reaktionsansatz ligiert, der außer geschnittenem PCR-Produkt und 25 ng linearisiertem Vektor noch 2.0 μ l $10 \times$ T4 DNA-Ligasepuffer und 2.0 μ l T4 DNA-Ligase enthielt und mit $H_2O_{dd,a}$ auf 20 μ l aufgefüllt worden war. Die benötigte Menge PCR-Produkt ("Insert") wurde nach der Formel

$$\text{Menge Insert} = \frac{5 \times \text{Menge Vektor} \times \text{Länge Insert}}{\text{Länge Vektor}}$$

berechnet. (Dabei werden Menge Insert und Menge Vektor in ng angegeben, Länge Insert und Länge Vektor in bp. Die Zahl 5 ist dimensionslos.) Am folgenden Morgen wurde die Ligase bei 65°C 10 min lang inaktiviert. Danach wurde der Ligationsansatz, wie in 4.2.7.26 angegeben, zur Transfektion kompetenter DH5 α -Zellen eingesetzt.

4.2.7.25 Herstellung kompetenter E.coli DH5 α -Zellen

Benötigte Lösungen

TFB I-Puffer: 10 mM CaCl₂, 15% (v/v) Glycerol, 30 mM Kaliumacetat, 100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂; pH 5.8

TFB II-Puffer: 10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15% (v/v) Glycerol; pH 7.0

Durchführung Die DH5 α -E.coli-Zellen wurden freundlicherweise von F. Madeo auf einer Agarplatte ausgestrichen zur Verfügung gestellt. Mit dem Ausstrich wurden 5 ml

einer Bakterienvorkultur in antibioticafreiem Flüssigmedium angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Herstellung der kompetenten Zellen wurden 500 ml frisches antibioticafreies Medium mit 1 ml der Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C auf einem Schüttler bis zu einer Extinktion bei 595 nm von 0.5 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in einer Heraeus/Christ-Varifuge K 15 min lang bei 4°C und 3000 Upm abzentrifugiert. Das entstandene Sediment wurde in 150 ml TBF I-Puffer resuspendiert und die Suspension 15 min lang auf Eis gestellt. Danach wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (4°C, 3000 Upm, 15 min). Nach Resuspendieren des Sediments in 20 ml TBF II-Puffer wurden die kompetenten DH5 α E.coli-Zellen in Portionen á 100 μ l in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

4.2.7.26 Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA

Transformation kompetenter “NovaBlueTM Singles“-Zellen Eine Portion kompetente Zellen (“NovaBlueTM Singles“) wurde auf Eis aufgetaut und dann vorsichtig mit 1.5 μ l eines Ligationsansatzes oder 5 μ l der aus Hefen isolierten Plasmid-DNA gemischt. Der Ansatz wurde 5 min lang auf Eis inkubiert, bevor der Hitzeschock (30 s bei 42°C) erfolgte. Danach wurden die Zellen 2 min lang auf Eis gestellt. Es wurden 250 μ l zimmerwarmes SOC-Medium (vom Hersteller der “NovaBlueTM Singles“-Zellen mitgeliefert) zugegeben. Anschließend wurde 1 h lang bei 37°C inkubiert. Danach wurden Portionen von 100 bis 150 μ l auf Antibiotica enthaltenden Agarplatten mittels Drygalskispatel ausplattiert. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht wurden die Agarplatten am nächsten Morgen auf das Vorhandensein von Bakterienkolonien geprüft.

Transformation kompetenter DH5 α -Zellen Eine Portion kompetente DH5 α -E.coli-Zellen wurde auf Eis aufgetaut und mit 10 μ l Ligationsansatz oder 1-5 μ l Plasmid-DNA vorsichtig gemischt. Die Mischung wurde 10 min lang auf Eis inkubiert, bevor sie dem Hitzeschock (2 min bei 42°C) ausgesetzt wurde. Danach wurde die Zellsuspension 2 min lang auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 500 μ l zimmerwarmen antibioticafreien LB-Mediums wurde 1 h lang bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde vorgegangen wie im vorangegangenen Absatz beschrieben.

Transformation kompetenter “Qiagen EZ“-Zellen Eine Portion kompetente “Qiagen EZ“-Zellen wurde auf Eis aufgetaut und dann vorsichtig mit 2 μ l Ligationsansatz gemischt. Der Ansatz wurde 5 min lang auf Eis inkubiert, bevor er dem Hitzeschock (30 s bei 42°C) ausgesetzt wurde. Danach wurde die Zellsuspension erneut 2 min lang auf Eis gestellt. Sodann wurden 250 μ l zimmerwarmen SOC-Mediums (vom Hersteller

der “Qiagen EZ“-Zellen mitgeliefert) zugegeben und der Ansatz 1 h lang bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden Portionen á 75 µl auf Antibiotica enthaltenden Agarplatten ausplattiert, die mit 35 µl X-β-Gal (24 mg/ml) und 20 µl IPTG (24 mg/ml) beschichtet worden waren. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht wurden die Agarplatten am nächsten Morgen auf das Vorhandensein von Bakterienkolonien geprüft.

4.2.7.27 Transformation von Hefen mit Plasmid-DNA

Die Hefen wurden nach Ito *et al.* (1983) unter leichter Abwandlung des Protokolls transfiziert.

Benötigte Stammlösungen

10× **TE**: 100 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA; pH 7.5

10× **LiAc**: 1 M Lithiumacetat in H₂O_{dd}, sterilfiltriert

50% **PEG 4000**: 50% PEG 4000 in H₂O_{dd}, sterilfiltriert

Herstellung kompetenter Hefen Bei einer nach 4.2.7.10 hergestellten ersten Vorkultur mit 5 ml Kulturvolumen wurde am nächsten Morgen die Extinktion bei 600 nm bestimmt. Für die zweite Vorkultur wurden 10 ml YPDA-Medium auf eine Extinktion bei 600 nm von 0.1 angeimpft und bis zum nächsten Morgen inkubiert. Nach erneuter Bestimmung der Extinktion bei 600 nm wurden 50 ml YPDA-Medium für die dritte Hefekultur auf eine Extinktion bei 600 nm von 0.1 angeimpft und innerhalb von 5-7 h auf eine optische Dichte von 0.5-0.7 angezogen. Die Zellen wurden durch dreiminütige Zentrifugation in einer Heraeus/Christ-Varifuge K bei 1000 Upm und RT geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit H₂O_{dd,a} gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen. Sodann wurden die Hefen mit 1 ml 1× LiAc / 0.5× TE gewaschen. Nach einer 3 min langen Zentrifugation bei 1000 Upm und RT wurde der Überstand verworfen und der Zellschlag in 1× LiAc / 0.5× TE resuspendiert (100 µl Puffer für jedes zu transfizierende Plasmid). Die nun kompetenten Hefen wurden bei RT ruhen gelassen und innerhalb von 10-60 min weiterverwendet.

Transformation der kompetenten Hefen Um die Zellen zu transfizieren, wurde Heringsperma-DNA als Träger-DNA (10 mg/ml) 20 min lang bei 95°C denaturiert und der Ansatz anschließend auf Eis gestellt. Für jeden benötigten Transfektionsansatz wurden 10 µl der Träger-DNA mit kompetenten Hefezellen (100 µl Volumen) gemischt. Diese

Mischung wurde auf Eis zu den entsprechenden Plasmiden gegeben. Dann wurde die Mischung mit 700 μl 1 \times LiAc / 1 \times TE / 40% PEG gemischt und 30 min lang bei 30°C inkubiert. Zum Hitzeschock und resultierender Plasmidaufnahme wurden die Transformationsansätze 20 min lang in ein 42°C warmes Wasserbad gestellt und danach 3 min lang bei 4000 Upm und RT zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Hefen mit je 1 ml des Selektionsmediums (entsprechend den später verwendeten Agarplatten) gewaschen. Die Waschfraktion wurde durch Zentrifugation (3 min bei 4000 Upm und RT) abgetrennt. Die Zellen wurden jeweils in 100 μl des erforderlichen Selektionsmedium aufgenommen und mit einem Drygalskispatel auf Agarplatten gleicher Selektivität ausplattiert. Anschließend wurden die Platten 2-4 Tage lang bei 30°C inkubiert.

4.2.8 Bioinformatische Programme

Alle Sequenzen wurden mit den Computerprogrammen BLASTN und TBLASTN mit den unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> verfügbaren Sequenzdatenbanken verglichen. Die Suche nach Proteinmotiven wurde über die Internetseiten <http://smart.embl-heidelberg.de>, <http://www.ebi.ac.uk/InterProScan> und <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> und das Programm BLASTP durchgeführt.

4.2.9 Reverse Transkriptase-Reaktion

Mit einem “RNeasy RNA isolation Kit“ wurde die Gesamtzell-RNA entsprechend den Herstellerangaben isoliert. Der Reaktionsansatz für die reverse Transkription der RNA enthielt 5 mM MgCl₂, je 10 mM der Nucleotide dATP, dGTP, dCTP und dTTP, 25 U AMV Reverse Transkriptase (RT), 0.625 µg Oligo(dT₁₅) Adapter-“Primer“, 0.625 µg “random hexamer primer“ und 1 µg Gesamtzell-RNA in 50 µl 1× “PAN Script NH₄“-Puffer. Die Komponenten wurden auf Eis zusammenpipettiert. Anschließend wurde die Mischung 1 h lang auf 42°C erhitzt. Danach wurde die AMV-RT durch Erhitzen auf 95°C (5 min) inaktiviert. Nach Verdünnung mit H₂O 1:2 wurde die Probe bei -80°C gelagert. Zu Kontrollzwecken wurde die Reaktion auch ohne RT durchgeführt.

4.2.10 RT-PCR zur Analyse des pAK7-Transkriptionsprofils

1 µl cDNA aus 4.2.9 wurde mit 12.5 µl “HotStar Taq Mastermix“, 1 µl “Primermix“ (4 µM jedes Primers) und 10.5 µl H₂O_{dd,a} in einem Gesamtvolumen von 25 µl gemischt. Die Reaktion wurde mit der Aktivierung der Taq-Polymerase im Reaktionsansatz (95°C / 15 min) gestartet. Es folgten 30 Zyklen (94°C, 30 s; 58°C, 30 s; 72°C, 1 min) PCR. Die abschließende Elongation bei 72°C dauerte 10 min. Die Negativkontrolle ohne RT aus 4.2.9 wurde genauso durchgeführt. Als Kontrolle der cDNA-Qualität und als Positivkontrolle für die Agarose-Gelelektrophorese wurde die PCR-Reaktion mit β-Actin-Primern durchgeführt.

Verwendete “Primer“-Sequenzen für die RT-PCR:

pAK7	5′-TTGTCGACAGTGATGACATGGGCG-3′
	5′-TCGGCGTTGATGTGGTCCTGGA-3′
β -Actin	5′-GGGTCAGAAGGACTCCTACG-3′
	5′-GGTCTCAAACATGATCTGGG-3′

4.2.11 Quantitative (“Real-time“) PCR

Die quantitative PCR wurde mit einem FastStart DNA Master SYBR Green I Kit entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Der Reaktionsansatz enthielt 3 mM MgCl₂, 0.2 μ M jedes “Primers“ und 2 μ l gemäß 4.2.9 hergestellte cDNA. Die PCR-Reaktionen wurden in einem “LightCycler[®]“-PCR-Gerät über 45 Zyklen durchgeführt. Die Prozesse begannen jeweils mit der Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 95°C über 10 s. Das Anlagern der “Primer“ erfolgte bei einer während der ersten 10 Zyklen um jeweils 1°C abnehmenden Temperatur, beginnend bei 67°C. Bei den Zyklen 11-45 betrug die Anlagerungstemperatur jeweils 57°C. Die Elongation wurde je 12 s lang bei 72°C durchgeführt. Die Spezifität der Reaktion wurde durch Bestimmung von Produkt-Schmelzkurven und anschließende Agarose-Gelelektrophorese der Produkte überprüft. Um die Varianz zwischen den verschiedenen Läufen zu berücksichtigen, wurde jedesmal ein externer Standard mit bekanntem, invariantem CP eingesetzt. Um diesen Standard herzustellen, wurde RNA aus 3 verschiedenen Hoden und 3 verschiedenen EPK wie in 4.2.9 beschrieben revers transkribiert. Die cDNA-Produkte wurden schließlich vereint, wodurch sich für den invarianten Standard ein Endvolumen von 300 μ l ergab.

Um die Effizienzen der RT-PCR für verschiedene “Primer“-Paare und RNA-Quellen zu bestimmen, wurden Verdünnungsreihen von jeder RNA-Probe hergestellt und der quantitativen PCR unterworfen. Die aus diesen Experimenten erhaltenen CP wurden je in einem Diagramm pro RNA-Quelle gegen die Logarithmen der jeweiligen Konzentrationen aufgetragen. Hierbei wurden die Matrizenkonzentrationen der unverdünnten Proben gleich 1000 willkürlichen Einheiten gesetzt. Nach linearer Regression wurden aus den erhaltenen Geraden die Amplifikationseffizienzen (E) der einzelnen Reaktionen nach der Gleichung $E = 10^{-1/Steigung}$ bestimmt. In Fällen, in denen das pAK7-spezifische PCR-Produkt aus der Mehrzahl der Verdünnungen nicht erhalten werden konnte, blieb der quadrierte lineare Korrelationskoeffizient (R^2) unter 0.98, und es konnte für diese RNA-Quelle keine PCR-Effizienz bestimmt werden. In diesen Fällen wurde angenommen, dass die mRNA des pAK7-Proteins in der ursprünglichen RNA-Quelle fehlt. Für alle übrigen PCR-Effizienzen

aus Regressionsgeraden, deren R^2 -Wert über 0.98 lag, wurde relativ zur Konzentration der mRNA des internen Standards Cyclophilin die pAK7-mRNA-Konzentration nach folgender Formel berechnet:

$$C_{\text{rel,pAK7}} = A_Z/A_C$$

mit

$$A_Z = E_{\text{pAK7}}^{-\text{CP}(+)} - E_{\text{pAK7}}^{-\text{CP}(-)}$$

und

$$A_C = E_{\text{Cyclophilin}}^{-\text{CP}(+)} - E_{\text{Cyclophilin}}^{-\text{CP}(-)}$$

(+) bedeutet hierbei Anwesenheit von RT beim Umschrieb in cDNA, (-) Abwesenheit von RT beim Umschrieb in cDNA. Die Berechnungen für andere Matrizen als pAK7 verliefen analog.

Verwendete Primersequenzen für die quantitative PCR:

pAK7	5'-TTGTCGACAGTGATGACATGGGCG-3'
	5'-TCGGCGTTGATGTGGTCCTGGA-3'
Spag6	5'-TGTACCTACCTACCAGCCCTCGAGC-3'
	5'-CCTGGCTCTGCTTTTATCTCCTGGA-3'
Hydin	5'-AACCTGTCCACTTCCAGACCGTTCTT-3'
	5'-CCACGCTGACTTCAGTGCCACC-3'
Polaris	5'-GTGAAGAGTGCAGCTGCGACCAA-3'
	5'-GGGCCTCTTTATAGAACTCAGCTGCCT-3'
Cyclophilin	5'-GGGGAGAAAGGATTTGGCTA-3'
	5'-ACATGCTTGCCATCCAGCC-3'

4.2.12 Herstellung des pAK7-Peptid-Antikörpers

Steigerung der Antigenität des Peptids Für die Herstellung eines Peptidantikörpers wurde, ausgehend von der pAK7-Rattensequenz, das Peptid CDFLAEYLFKNNPEMQ mit dem “Inject Maleimide Activated Immunogen Conjugation Kit“ entsprechend den Herstellerangaben an mKLLH gekoppelt. Das mKLLH war bereits durch Sulfo-succinimidyl-4-[N-maleimidomethyl]cyclohexan-1-carboxylat (Sulfo-SMCC) aktiviert. Das oben beschriebene Peptid wurde auf dieselbe Weise ebenfalls an aktiviertes BSA gekoppelt. Das Konjugat wurde bis zur Verwendung im ELISA bei -20°C gelagert. Das N-terminale Cystein der Peptidsequenz war ursprünglich nicht in der Sequenz der pAK7 enthalten, wurde aber hinzugefügt, um die Kopplung an die Trägerproteine mKLLH und BSA zu ermöglichen. Die Immunisierung von Kaninchen mit dem mKLLH-Peptid-Konjugat wurde kommerziell bei Charles River Laboratories, Kisslegg, durchgeführt. Nach Vorgabe eines Standardprotokolls wurde am Tag 0 das PIS entnommen und danach die 1. Injektion des Konjugats vorgenommen. An den Tagen 37 und 51 wurden weitere Serumproben entnommen. Die nächsten Injektionen erfolgten an denen Tagen 28, 41 und 56. Am Tag 70 wurden die Tiere ausgeblutet.

4.2.13 Affinitäts-Reinigung des pAK7-Antikörpers

Benötigte Lösungen

Kopplungspuffer: 50 mM Tris, 5 mM EDTA; pH 8.5

Waschpuffer: 1 M NaCl

Elutionspuffer: 100 mM Glycin; pH 2.5-3.0

Neutralisationspuffer: 1 M Tris; pH 9.0

Durchführung der Reinigung Das für die Immunisierung eingesetzte Peptid CD-FLAEYLFKNNPEMQ wurde nach Angaben des Herstellers des “SulfoLink[®] Coupling gels“ kovalent an die “SulfoLink“-aktivierte Sepharose gebunden. Das mit PBS verdünnte Antiserum wurde mit der Affinitätsmatrix 1.5 h lang bei RT auf einem Rollenschüttler inkubiert und nach Anweisung des Herstellers mit PBS gewaschen. Eluiert wurde in 1 ml-Fractionen, die anschließend mit 50 μl Neutralisationspuffer auf pH 7.2 gebracht wurden. Die Fractionen wurden photometrisch bei 280 nm auf ihren Proteingehalt getestet, wobei

eine Mischung aus Elutionspuffer und 5% Neutralisationspuffer als Referenz diente. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und bei 4°C gelagert.

4.2.14 ELISA

Benötigte Lösungen

Boratpuffer: 100 mM Borsäure, 25 mM Borax, 75 mM NaCl, 0.01% NaN_3 ; pH 8.4

Blockpuffer: 1% BSA in Boratpuffer

Waschpuffer: 0.2% (w/v) Tween in Boratpuffer

Substratpuffer: 100 mM Glycin/NaOH, 1 mM MgCl_2 , 1 mM ZnCl_2 ; pH 10.4

Substratlösung: 1 mg/ml p-Nitrophenylphosphat in Substratpuffer

Durchführung des ELISAs Für den ELISA wurden Mikrotiterplatten mit 96 Näpfen verwendet. Die folgenden Mengenangaben beziehen sich jeweils auf einen einzelnen Napf. Die Näpfe der Mikrotiterplatten wurden mit dem Peptid-BSA-Konjugat (250 ng in 100 μl Boratpuffer) über Nacht bei 4°C beschichtet. Nach Entfernen der Antigenlösung wurden restliche freie Bindungsstellen mit 200 μl Blockpuffer 1 h lang bei 37°C abgesättigt. Währenddessen wurden Verdünnungsreihen des Antiserums und PIS in Boratpuffer hergestellt: Verdünnungen 1:10, 1:30, 1:10², 1:3x10², 1:10³, 1:3x10³, 1:10⁴, 1:3x10⁴, 1:10⁵, 1:3x10⁵, 1:10⁶. Nach dem viermaligem Waschen mit 200 μl Waschpuffer wurden jeweils 100 μl der 11 verdünnten Lösungen des 1. Antikörpers in ihre korrespondierenden Näpfe pipettiert, bevor die Mikrotiterplatte 2 h lang bei 37°C inkubiert wurde. Nach Entfernung der verdünnten Lösungen wurden die Näpfe wieder 4× mit je 200 μl Waschpuffer gewaschen. Danach wurden die Näpfe mit je 100 μl einer 1:1000 verdünnten Lösung von mit alkalischer Phosphatase konjugiertem anti-Kaninchen-IgG-Antikörper aus Ziege versetzt. Nach 2 h Inkubation bei 37°C wurde 4× mit je 200 μl Waschpuffer gewaschen, dann 15 min lang bei 37°C mit Substratpuffer inkubiert. Nach Zugabe von 100 μl der Substratlösung pro Napf wurden die Platten 20 min lang auf 37°C temperiert. Das Produkt der enzymatischen Reaktion wurde anschließend bei 405 nm in einem ELISA-“Reader“ ausgelesen.

4.2.15 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von Bradford (1976) unter Verwendung von kommerziell erworbenem BioRad-Färbereagenz durchgeführt. Dazu wurden 990 μl 1:6 verdünntes Bradfordreagenz mit 10 μl der (gegebenenfalls mit H_2O_{dd} verdünnten) gemäß Kapitel 4.2.4 (Herstellung von Homogenaten) hergestellten Probe 15 min lang bei RT inkubiert. Die Probe wurde in eine Mikrotiterplatte mit 96 Näpfen pipettiert und die Extinktion in einem ELISA-“Reader“ bei 595 nm bestimmt. Die Proteinkonzentrationen wurden aus einer Eichgeraden berechnet, die mit BSA als Standardsubstanz erstellt worden war.

4.2.16 Diskontinuierliche SDS-PAGE

Die SDS-PAGE nach Laemmli (1970) wurde in der Variante nach Garfin (1990) durchgeführt.

Benötigte Lösungen

Acrylamidlösung: 29.2% (w/v) Acrylamid, 0.8% (w/v) Bisacrylamid (Rotiphorese Gel 30)

Puffer für Trenngel: 0.5 M Tris/HCl; pH 8.9

Puffer für Sammelgel: 1.5 M Tris/HCl; pH 6.8

Elektrodenpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0.1% SDS

5× SDS-Ladepuffer: Für 20 ml Ladepuffer wurden 0.8 g SDS (4% w/v) in 16.8 ml H_2O_{dd} gelöst und der Lösung 4 g Glycerol (20% w/v) zugegeben. 3.2 ml 1 M Tris/HCl (0.16 M); pH 6.8 und 1 Spatelspitze Bromphenolblau wurden mit SDS-Lösung gemischt. Portionen von jeweils 1.5 ml wurden bei -20°C eingefroren und je nach Bedarf wieder aufgetaut. Für die Elektrophorese unter reduzierenden Bedingungen wurden 45 μl Mercaptoethanol (0.38 M) pro 1.5 ml Ladepuffer hinzugefügt.

Herstellung der Gele Die Gele hatten eine Größe von $8\text{ cm} \times 10\text{ cm} \times 0.075\text{ cm}$. Trenngele wurden mit 10% Acrylamid und pH 8.9 hergestellt, Sammelgele mit 3% Acrylamid und pH 6.8 und zwar nach folgendem Pipettierplan (AA, Acrylamid; BA, Bisacrylamid; TEMED, N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin; APS, Ammoniumperoxodisulfat):

Lösung	10% Trenngel	3% Sammelgel
AA/BA	3.33 ml	0.50 ml
Puffer für Trenngel	1.25 ml	–
Puffer für Sammelgel	–	0.63 ml
H ₂ O _{dd}	5.30 ml	3.63 ml
10% (w/v) SDS	100 μl	50 μl
TEMED	20 μl	5 μl
10% (w/v) APS	37.5 μl	200 μl

Probenherstellung Die gemäß 4.2.4 erhaltenen Homogenate mit nach 4.2.15 ermittelter Proteinkonzentration wurden mit $5 \times$ SDS-Ladepuffer und gegebenenfalls H₂O_{dd} gemischt, sodass eine Endkonzentration von 20 μg Protein in 10 μl $1 \times$ SDS-Ladepuffer entstand. Maximal konnten 15 μl geladen werden. Die Proben wurden 3-5 min lang auf 95°C erhitzt, kurz zentrifugiert und auf Eis gestellt. Anschließend wurden je 10 μl der Proben in die Taschen der vorbereiteten Gele geladen. Als Molekularmassenstandard diente "PageRuler Prestained Protein Ladder". Pro Tasche wurden 2 μl davon aufgetragen.

4.2.17 Herstellung von Hefenhomogenaten

Hefezellen wurden nach Yaffe und Schatz (1984) aufgeschlossen.

Benötigte Lösungen

Lysepuffer CL: 1.85 M NaOH, 7.5% Mercaptoethanol

50% TCA: 50% TCA in H₂O_{dd}

Harnstoff-Ladepuffer: 200 mM Tris/HCl, 8 M Harnstoff, 5% SDS, 1 mM EDTA, 0.1% Bromphenolblau, 15 mM DTT; pH 6.8

Durchführung Von einer Übernachtskultur (siehe 4.2.7.10) wurden 1.5-3.0 ml zentrifugiert (1000 Upm, 15 min, RT); der Zelleniederschlag wurde mit 1 ml $H_2O_{dd,a}$ gewaschen. Die Zellen wurden in 160 μ l Lysepuffer CL resuspendiert und die Suspension 10 min lang auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 160 μ l 50% TCA zur Proteinfällung wurde die Mischung erneut 10 min lang auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Hefezellen abzentrifugiert (2 min, 14000 Upm / 4°C) und der Überstand entfernt. Der Niederschlag wurde in 150 μ l Harnstoff-Ladepuffer aufgenommen und die Lösung 10 min lang bei 95°C inkubiert bevor sie auf SDS-Polyacrylamidgele geladen wurde.

Elektrophorese Die Elektrophorese wurde bei konstanter Stromstärke (20 mA) ca. 1.5 h lang bei RT durchgeführt. Sobald die Bromphenolblau-Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet. Anschließend wurden die Gele entweder mit Coomassie-Blau gefärbt oder für "Western blotting" weiter verwendet.

4.2.18 Färbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Blau

Benötigte Lösungen

Färbelösung: 1% Coomassie Brilliant-Blau R 250 in MeOH/ H_2O_{dd} /Eisessig (5:4:1)

Entfärber: MeOH/ H_2O_{dd} /Eisessig (3:6:1)

Färbung der Gele Die Polyacrylamidgele wurden 1 h lang mit der Färbelösung inkubiert und danach solange mit Entfärber gewaschen, bis die einzelnen Proteinbanden gut erkennbar und der Hintergrund der Gele nahezu farblos war. Die Gele wurden kurz mit H_2O_{dd} gewaschen und zur Dokumentation mit einem Flachbrett-"Scanner" erfasst.

4.2.19 "Western blot"

4.2.19.1 Proteintransfer

Benötigte Lösungen

Transferpuffer: 25 mM Tris/HCl, 192 mM Glycin; pH 9.0

"Ponceau S"-Färbelösung: 1% "Ponceau S" in 3% TCA

Waschpuffer: 20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0.02% (w/v) Tween 20; pH 7.4

Durchführung Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden nach Burnette (1981) aus dem Gel auf eine Nitrocellulose (NC)-Membran übertragen. Die NC-Membran wurde zunächst mit Transferpuffer angefeuchtet. Anschließend wurde, wie in Abb. 30 dargestellt, ein Transfer-“Sandwich“ mit der “Bio-Rad MiniBlot“-Apparatur zusammengebaut. Luftblasen wurden durch leichten Druck auf das “Sandwich“ mit einem Breitspatel entfernt. Nach dem Zusammenbau wurde das “Sandwich“ in eine mit Transferpuffer gefüllte “Electroblot“-Kammer gestellt. Der Proteintransfer wurde bei 4°C und 130 mA über 2.5 h durchgeführt. Nach dem Transfer wurde die Membran reversibel mit “Ponceau S“ gefärbt, um die Proteinbanden sichtbar zu machen und die Effektivität des “Blot“-Vorgangs zu überprüfen. Die Membran wurde in Waschpuffer wieder entfärbt.

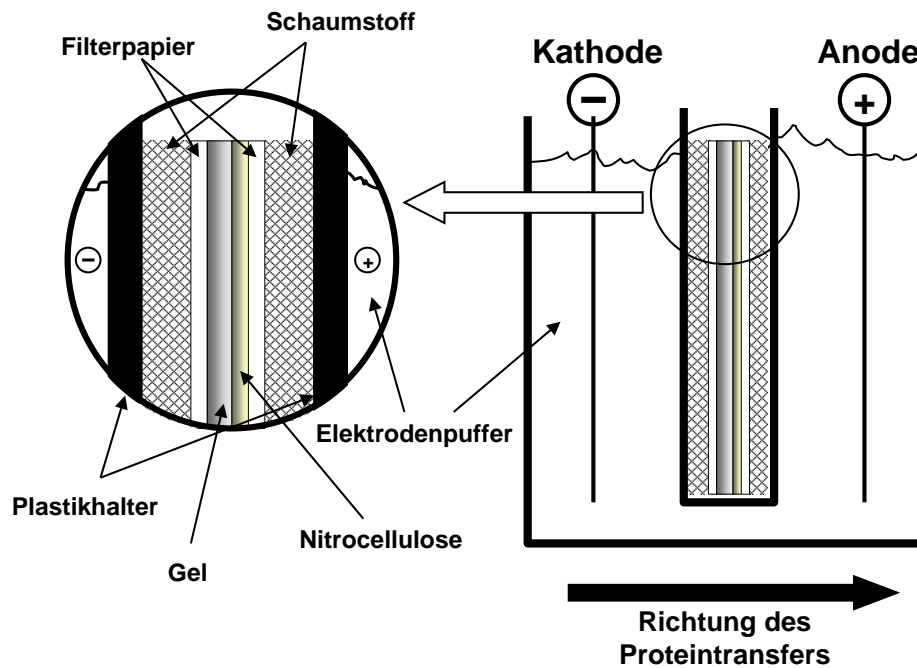


Abb. 30: Schematischer Aufbau eines Transfer-“Sandwiches“ nach Ausubel *et al.*, 1999.

4.2.19.2 Detektion der pAK7-Proteinbanden mit pAK7-Antiserum

Benötigte Lösungen

Waschpuffer: 20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0.02% (w/v) Tween 20; pH 7.4

Blockpuffer: 2% Milchpulver in Waschpuffer

Substratlösung: 1 ml ECL-Lösung I + 1 ml ECL-Lösung II

pAK7-Detektion Nach Entfärben der NC-Membran (4.2.19.1) wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation mit Blockpuffer abgesättigt. Nach 1 h bei RT wurde als 1. Antikörper das pAK7-Antiserum so in den Blockpuffer pipettiert, dass sich eine Verdünnung von 1:5000 ergab. Anschließend wurde bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Membran 3 × 5 min lang mit Waschpuffer gewaschen, dann wurde mit dem 2. Antikörper (anti-Kaninchen-IgG aus Ziege, POD-Konjugat), der in einer Verdünnung von 1:120000 1 h lang bei RT inkubiert. Danach wurde wiederum 3 × 5 min lang mit Waschpuffer gewaschen. Um überschüssiges Tensid zu entfernen, wurde 3 × kurz mit PBS gespült. Dann wurde das Detektionsreagenz auf die Membran pipettiert und der Überschuss nach 1-2 min wieder entfernt. Die NC-Membran wurde in eine Röntgenfilm-Kassette gelegt und zum Schutz des Röntgenfilms mit durchsichtiger Plastikfolie abgedeckt. In einer Dunkelkammer wurden Röntgenfilme 1-10 min lang auf die Membran aufgelegt und anschließend in einer Röntgenfilm-Entwicklermaschine entwickelt. Als Negativkontrolle diente neben PIS auch Immunsereum, das vor Applikation auf die Membran mit einem Überschuss (>26 μM) des zur Immunisierung verwendeten Peptids 1 h lang bei RT unter ständiger Durchmischung in Blockpuffer vorinkubiert wurde.

Ladekontrolle mit β-Actin-Antikörper Als Ladekontrolle wurden auf der “Blot“-Membran die β-Actinbanden detektiert. Die Membran wurde nach Detektion der pAK7-Banden 15 min lang mit H₂O_{dd} und 3 × 5 min lang mit Waschpuffer gewaschen. Es folgte die Inkubation mit monoklonalem β-Actin-Antikörper aus Maus-Ascites, der in einer Verdünnung von 1:25000 in Waschpuffer 1 h lang bei RT appliziert wurde. Nach 3 × 5 min langem Waschen mit Waschpuffer wurde der 2. Antikörper (anti-Maus-IgG aus Ziege, POD-Konjugat) 1:20000 in Waschpuffer verdünnt und 1 h lang bei RT appliziert. Wieder wurde 3 × 5 min lang mit Waschpuffer gewaschen. Nach 3maligem Spülen mit PBS wurden die β-Actinbanden detektiert wie oben angegeben.

4.2.19.3 Detektion der pAK7-Teilstücke als Bindedomänen (BD)-Fusionsproteine mit BD-Antikörper und POD

Benötigte Lösungen

Waschpuffer: 20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0.02% Tween 20; pH 7.4

Blockpuffer: 1× RotiBlock in PBS

Substratlösung: 1 ml ECL-Lösung I + 1 ml ECL-Lösung II

Detektion der BD-Fusionsproteine Nach Entfärben der NC-Membran (4.2.19.1) wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation mit Blockpuffer abgesättigt. Nach einstündiger Inkubation bei RT wurde die Membran 2 × 5 min lang mit Waschpuffer gewaschen und anschließend mit einer 1:5000 verdünnten Lösung des 1. Antikörpers (gegen Gal4-Bindedomäne aus Maus) in Waschpuffer bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Membran 3 × 5 min lang mit Waschpuffer gewaschen. Dann wurde mit dem 2. Antikörper (anti-Maus-IgG aus Ziege, POD-Konjugat) in einer Verdünnung von 1:100000 1 h lang bei RT inkubiert. Danach wurde wiederum 3 × 5 min lang mit Waschpuffer gewaschen. Um überschüssiges Tensid zu entfernen, wurde 3 × kurz mit PBS gespült. Dann wurde das Detektionsreagenz auf die Membran pipettiert und der Überschuss nach 1-2 min wieder entfernt. Die NC-Membran wurde in eine Röntgenfilm-Kassette gelegt und zum Schutz des Röntgenfilms mit durchsichtiger Plastikfolie abgedeckt. In einer Dunkelkammer wurden Röntgenfilme 1-10 min lang oder über Nacht auf die Membran aufgelegt und anschließend in einer Röntgenfilm-Entwicklermaschine entwickelt.

4.2.20 Virale Transfektion von HEK293T-Zellen

Die HEK293T-Zellen wurden wie in den Protokollen des Trono-Labors (<http://www.tronolab.com/protocols>) mit Lentiviren transfiziert, um nach genomischer Integration der cDNA eine permanente Expression des erwünschten Proteins zu erreichen. Zur Herstellung von Zelllinien wurden die Zellen anschließend so in die 96 Näpfe einer Mikrotiterplatte ausgesät, dass statistisch nur eine Zelle pro Napf vorlag. Nach 3-4 d wurde an der Verfärbung des Mediums erkennbar, ob Zellen gewachsen waren. Diese wurden durch Behandlung mit 0.005% Trypsin vom Napfboden gelöst und anschließend in Kulturschalen mit 35 mm Durchmesser neu ausgesät, auf deren Boden Deckgläschen (18 mm × 18 mm) durch steriles Silikonfett fixiert waren. Nach einer Woche wurden die

Zellen, wie in 4.2.3.2 angegeben, fixiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Ob eine reine pAK7-EGFP-Zelllinie vorlag, wurde geprüft, indem die Zellen gemäß 4.2.21 mit pAK7-Antiserum gefärbt wurden. Dabei wurde die Lokalisation des EGFP-Signals mit dem Signal für pAK7 verglichen. Durch die Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI konnte erkannt werden, ob alle Zellen pAK7 exprimierten. AK1 wurde als Fusionsprotein mit dem pAK7-C-Terminus exprimiert (siehe 4.2.7.18), damit die AK1-Expression mit pAK7-Antiserum nachweisbar wurde.

4.2.21 Immunfluoreszenz-Färbungen mit pAK7-Antiserum

Alle Lösungen wurden vor Beginn der Färbung auf RT gebracht. Die verwendeten Antikörper und -sera wurden auf Eis aufgetaut. Bei den verwendeten Zweitantikörpern wurden anschließend mit Hilfe einer Tischzentrifuge (13000 Upm, RT, 1 min) eventuelle Agglomerate entfernt.

Benötigte Lösungen

0.1% (w/v) Glycin in PBS

0.3% (w/v) Triton-X 100 in PBS

0.1% (w/v) Triton-X 100 in PBS

DAPI-Färbelösung: 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DAPI in PBS

Erstantikörperlösung: 10% (v/v) "Roti-ImmunoBlock", 0.3% (v/v) Triton-X 100, pAK7-Antiserum 1:200; in PBS

Zweitantikörperlösung: 10% (v/v) "Roti-ImmunoBlock", 0.3% (v/v) Triton-X 100, anti-Kaninchen-IgG aus Ziege, Alexa Fluor 568-Konjugat 1:2000; in PBS

4.2.21.1 Anfärbung von Rattengeweben

Zur Vorbereitung wurden die eingefrorenen Gewebeschnitte (siehe 4.2.5) auf RT gebracht und per "ImmEdge"-Stift mit Wachslösung ummalt, um ein Auslaufen der Antikörperlösungen zu vermeiden. Eine zusätzliche 5-10 min lange Inkubation bei RT sollte vollständiges Trocknen der Wachslösung gewährleisten. Alle anderen Schritte wurden im Färbebad durchgeführt. Zur Inaktivierung eventuell noch vorhandenen Paraformaldehyds wurde eine 10minütige Vorinkubation der Gewebeschnitte mit 0.1% (w/v) Glycin in PBS bei RT durchgeführt. Zur Permeabilisierung der Zellmembranen folgte eine 10minütige Inkubation bei RT in 0.3% (w/v) Triton-X 100 in PBS. Nach Applikation von 150-200 μl Erstantikörperlösung wurden die Schnitte 2 h lang bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert, danach kurz auf RT abgekühlt und 3 \times 2 min lang mit 0.1% (w/v) Triton-X 100 in PBS gewaschen. Der zweite Antikörper wurde mit den Geweben 1 h lang bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurde erneut 3 \times 2 min lang mit 0.1% (w/v) Triton in PBS gewaschen. Die Zellkerne wurden durch eine 10minütige Inkubation bei RT mit DAPI gefärbt. Nach 3 \times 2 min langem Waschen mit 0.1% (w/v) Triton-X 100 in PBS

wurde überschüssiges Tensid durch kurzes Waschen mit PBS entfernt. Zum mechanischen Schutz wurden die Schnitte danach mit Deckgläschen ($24\text{ mm} \times 50\text{ mm}$) abgedeckt und in “Immu-Mount“-Einbettungsmedium fixiert. Sie wurden über Nacht bei RT im Dunkeln aufbewahrt, um das in “Immu-Mount“ enthaltene Polymer aushärten zu lassen. Die weitere Lagerung erfolgte bei 4°C im Dunkeln.

Für Doppelfärbungen wurde entweder monoklonaler Antikörper gegen α -Tubulin aus Maus-Ascites (Endverdünnung 1:1000) oder GP BB-Antiserum aus Meerschweinchen (Endverdünnung 1:1000) mit entsprechendem Zweitantikörper (anti-Maus-IgG aus Ziege, Alexa Fluor 488-Konjugat bzw. anti-Meerschweinchen-IgG aus Esel, Cy3-Konjugat, beide 1:1000 verdünnt) verwendet. Bei Doppelfärbung mit GP BB wurde als Zweitantikörper anti-Kaninchen-IgG, konjugiert mit Alexa Fluor 488, eingesetzt.

4.2.21.2 Anfärbung von EPK, APK und HEK293T-Zellen

Alle Mengenangaben und Volumina beziehen sich auf ein Deckgläschen mit Zellen in einer 35 mm Kulturschale. Wurden die Zellen in Kulturplatten mit 24 Näpfen angesät, so wurde im Färbeprotokoll bei der Permeabilisierung und in allen Waschschritten nur 1 ml Lösung verwendet, die aufgetragene Menge Antikörperlösung blieb jedoch unverändert. Die nach 4.2.3.2 fixierten Zellen (auf Deckgläschen und in den zugehörigen Kulturschalen) wurden 10 min lang bei RT mit 2 ml 0.1% (w/v) Glycin in PBS gewaschen, um noch vorhandenes PFA abreagieren zu lassen. Danach wurde mit 2 ml 0.3% (w/v) Triton-X 100 10 min lang bei RT permeabilisiert. Nach Aufpipettieren von $100\ \mu\text{l}$ Erstantikörperlösung wurden die Zellen in einer feuchten Kammer bei 37°C 2 h lang inkubiert. Anschließend wurden sie $3\times$ mit 2 ml 0.1% (w/v) Triton-X 100 in PBS gewaschen. Nach Auftragung von $100\ \mu\text{l}$ Sekundärantikörperlösung wurden die Zellen in einer feuchten Kammer 1 h lang bei RT im Dunkeln inkubiert. Dann wurde erneut dreimal mit 2 ml 0.1% (w/v) Triton-X 100 in PBS gewaschen. Die Zellkerne wurden danach 10 min lang bei RT mit $100\ \mu\text{l}$ DAPI-Färbelösung im Dunkeln gefärbt. Nach $3\times$ Waschen mit 2 ml 0.1% (w/v) Triton-X 100 in PBS wurde überschüssiges Tensid durch Waschen mit 2 ml PBS entfernt. Um die gefärbten Zellen mechanisch zu schützen, wurden die Deckgläschen mit einem Tropfen “Immu-Mount“-Einbettungsmedium mit der Zelleseite nach unten auf einem Objektträger fixiert. Das Medium härtete über Nacht bei RT aus. Die Präparate wurden danach bei 4°C dunkel gelagert. Bei Doppelfärbungen wurden die in 4.2.21.1 angegebenen Antikörper verwendet.

4.2.22 Suche nach Interaktionspartnern mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems

4.2.22.1 Test auf Toxizität des pAK7-Proteins

Auf nach 4.2.7.8 hergestellten SD/-Trp, SD/-Leu, DDO-, TDO- und QDO-Platten wurden mehrere AH109-Hefeklonen, die die pAK7-cDNA-Sequenz oder Teile davon im Plasmidvektor pLP-GBKT7 enthielten, mit sterilen breiten Zahnstochern ausgestrichen. Eine Woche lang wurde das Wachstum auf den unterschiedlich stark selektierenden Agarplatten kontrolliert. Ab ungefähr dem 3. Tag sollten nur auf SD/-Trp-Platten Kolonien gewachsen sein. Alle Klone erfüllten dieses Kriterium, die exprimierten Proteine wurden als nicht toxisch angesehen und konnten daher für weitere Experimente verwendet werden.

4.2.22.2 Test auf Autoaktivierung

Nach 4.2.7.8 wurden SD/-Trp-, SD/-Leu-, DDO-, TDO- und QDO-Platten hergestellt. Die Hälfte davon wurde mit X- α -Gal beschichtet (4.2.22.10). Mehrere AH109-Hefeklonen, die die pAK7-cDNA-Sequenz oder das Teilstück 3 davon im Plasmidvektor pLP-GBKT7 als Köder enthielten, wurden auf allen vorhandenen Selektionsplatten (mit und ohne X- α -Gal) mit sterilen breiten Zahnstochern ausgestrichen. Als Positivkontrolle für die *MEL1*-Aktivierung wurden Hefezellen des Stammes AH109, die das Plasmid pCL1 enthielten, auf mit X- α -Gal beschichteten SD/-Trp-Platten ausgestrichen. Die Expression von α -Galaktosidase durch die Hefen führte zu einer Umsetzung des X- α -Gal zu einem blauen Indigofarbstoff. Als Negativkontrolle wurden Hefezellen des Stammes AH109 eingesetzt, die das Plasmid pGBKT7-Lam enthielten. Diese Hefezellen durften nur auf SD/-Trp-Platten wachsen. Eine Woche lang wurde das Wachstum auf den unterschiedlich stark selektierenden Agarplatten kontrolliert. Ab ungefähr dem 3. Tag sollten nur auf SD/-Trp-Platten Kolonien gewachsen sein. Eine Blaufärbung sollte nur bei Kolonien mit pCL1-Plasmid vorhanden sein. Klone, die diese Kriterien erfüllten, konnten als nicht autoaktiv angesehen werden.

4.2.22.3 Test auf Proteinexpression

Übernachtskulturen geeigneter Hefeklonen wurden angeimpft wie unter 4.2.7.10 beschrieben. Nach Heranwachsen wurden daraus Proben für die SDS-PAGE hergestellt (4.2.17) und auf 10%ige (w/v) SDS-Polyacrylamidgele geladen. Nach Durchführung der SDS-PAGE (siehe 4.2.16) wurden die Proteine auf NC-Membranen transferiert (siehe 4.2.19.1) und anschließend mit pAK7-Antiserum (für den Nachweis der exprimierten pAK7; Protokoll siehe 4.2.19.2) bzw. BD-Antikörper (für den Nachweis der pAK7-Teilstücke; Protokoll sie-

he 4.2.19.3) detektiert. Die mit den detektierten Proteinbanden korrespondierenden molekularen Massen wurden mit den durch das Computerprogramm "Vector NTI" berechneten Molekularmassen der einzelnen Fusionsproteine verglichen. Bei Übereinstimmung konnten die analysierten Klone für die weiteren Versuche, insbesondere die Verpaarung der Hefen, eingesetzt werden.

4.2.22.4 Verpaarung der Hefen

Die Verpaarung der Hefeklone, die die Tests gemäß 4.2.22.1, 4.2.22.2 und 4.2.22.3 erfolgreich bestanden hatten, erfolgte mit anderen Hefen, die cDNA einer humanen Hoden-cDNA-Bibliothek in pACT2 kloniert enthielten ("BD Matchmaker Pretransformed MATCHMAKER library"). Nach Auftauen der "BD Matchmaker Pretransformed MATCHMAKER library" wurden 10 μl der Bibliothek abgenommen und später für das Titrieren der cDNA-Bibliothek verwendet. Abweichend von den Empfehlungen des Herstellers der Bibliothek wurden anschließend nur 670 μl (entsprechend ca. $\frac{2}{3}$) dieser vortransformierten Hefen im Stamm Y187 mit einer Vorkultur des jeweiligen AH109-Hefeklons, der das gewünschte Köderplasmid enthielt, vorsichtig gemischt und 24 h lang bei 40 Upm auf einem Rundschüttler bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde nach Angabe des Herstellers vorgegangen, wobei nach 20 h auf das Vorkommen von Zygoten überprüft und 4 h später der Ansatz mit den Hefen auf verschiedenen selektierenden Agarplatten ausplattiert wurde. Mit 40 μl des Verpaarungsansatzes wurden unterschiedlich verdünnte Lösungen (1:10⁴, 1:10³, 1:10², 1:10) hergestellt, von denen je 100 μl auf Kontrollplatten zur Bestimmung der Paarungseffizienz ausplattiert wurden. Der Rest des Verpaarungsansatzes wurde auf 57 TDO-Platten verteilt, die auch 2.5 mM 3-AT enthielten und einen Durchmesser von 150 mm hatten, indem 200 μl pro Platte ausplattiert wurden. Die Platten inkubierten 1 Woche lang bei 30°C und wurden täglich auf Wachstum von Kolonien kontrolliert. Die entstandenen Klone wurden dann mehrfach parallel auf TDO- und QDO-Platten (siehe 4.2.22.8) ausgestrichen, bevor die in 4.2.22.9 und 4.2.22.10 beschriebenen Tests durchgeführt wurden.

4.2.22.5 Titrieren der cDNA-Bibliothek

Die Titration der cDNA-Bibliothek in Hefekulturen des Stamms Y187 wurde entsprechend den Angaben des Herstellers der "BD Matchmaker Pretransformed MATCHMAKER library" durchgeführt. Die vor der Verpaarung entnommenen 10 μl der aufgetauten Hefebibliothek wurden zur Herstellung von 1:10² und 1:10⁴ verdünnten Lösungen verwendet. 50 und 100 μl der 1:10⁴ verdünnten Lösungen wurden auf jeweils einer SD/-Leu-Platte ausplattiert. 10 μl der 1:10² verdünnten Lösungen wurden mit 50 μl Medium gemischt

und auf einer SD/-Leu-Platte ausplattiert. Nach 5tägiger Inkubation der Platten bei 30°C wurden die gewachsenen Klone ausgezählt. Entsprechend der Formel

$$\text{KBE/ml} = \frac{\text{Anzahl Kolonien}}{\text{ausplattiertes Volumen [ml]} \times \text{VF}}$$

(KBE, Koloniebildende Einheiten; VF, Verdünnungsfaktor) konnte damit ein Titer von 3.32×10^7 KBE/ml berechnet werden, wobei die Platte verwendet werden sollte, auf der 30-300 Kolonien gewachsen waren. Dieses Kriterium erfüllte die SD/-Leu-Platte mit 166 Klonen, bei der zuvor 50 μl der 10^{-4} verdünnten Lösungen ausplattiert worden waren.

4.2.22.6 Bestimmung der Gesamtzahl untersuchter diploider Klone

12.5 ml des Verpaarungsansatzes enthielten 5×10^3 diploide KBE pro ml, womit die Gesamtzahl der untersuchten diploiden Klone bei 6.3×10^4 KBE/ml liegt.

4.2.22.7 Bestimmung der Paarungseffizienz

Die Bestimmung der Paarungseffizienz wurde entsprechend den Angaben des Herstellers der humanen Hoden-cDNA-Bibliothek in pACT2 durchgeführt. Nach 5tägiger Inkubation der Kontrollplatten wurden die gewachsenen Klone ausgezählt:

Auf SD/-Leu-Platten wuchsen nach Ausplattierung von 100 μl einer 10^{-3} verdünnten Lösung der Hefen 147 Klone. Daraus lässt sich eine Konzentration von 1.47×10^6 KBE/ml berechnen. Auf SD/-Trp-Platten wuchsen nach Ausplattierung von 100 μl einer 10^{-4} verdünnten Lösung der Hefen ca. 1000 Klone. Daraus lässt sich eine Konzentration von 1×10^8 KBE/ml berechnen. Auf SD/-Trp/-Leu-Platten wuchsen nach Ausplattierung von 100 μl einer 10^{-1} verdünnten Lösung der Hefen 50 Klone. Daraus lässt sich eine Konzentration von 5×10^3 KBE/ml berechnen. Limitierender Partner der Verpaarung sind somit die Hefen, die Plasmide der "BD Matchmaker Pretransformed MATCHMAKER library" enthalten, da durch ihre geringere Anzahl im Verpaarungsansatz die mögliche Ausbeute drastisch gesenkt wurde. Nach Anwendung der vorgegebenen Formel

$$\text{Effizienz [\%]} = \frac{\text{Anzahl diploide KBE/ml}}{\text{Anzahl limitierender Partner KBE/ml}} \times 100$$

(Effizienz [%], Verpaarungseffizienz; KBE, Kolonie-bildende Einheiten; limitierender Partner: Hefen, die Plasmide der "BD Matchmaker Pretransformed MATCHMAKER library" enthalten) lag damit die Paarungseffizienz bei 0.34% (Normbereich liegt laut Hersteller bei 5%).

4.2.22.8 *ADE2*- und *HIS3*-Aktivierung: Bestätigung des Phänotyps

Für den Fall, dass einige der vortransformierten Hefen der cDNA-Bibliothek mehr als ein Plasmid enthielten, wurden nach der Paarung alle diploiden Klone 2-3fach auf DDO, TDO und QDO ausgestrichen. Dadurch verloren die sich teilenden Hefen zusätzliche, nicht für die Reporterogenaktivierung verantwortliche Plasmide. Der Selektionsdruck auf den TDO- und QDO-Platten erlaubte das Erkennen und Weiterbestehen wahrer Interaktionen.

4.2.22.9 *lacZ*-Aktivierung: X- β -Gal-Filtertest

Benötigte Lösungen

Z-Puffer-Stammlösung: 40 mM Na₂HPO₄, 60 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄; pH 7.0

X- β -Gal-Stammlösung: 100 mg/ml X- β -Gal in DMF

Gebrauchslösung: 20 ml Z-Puffer-Stammlösung, 0.054 ml Mercaptoethanol, 0.067 ml X- β -Gal-Stammlösung

Fixierlösung: 1 M Na₂CO₃

Durchführung des Tests Whatman-Filterpapier (ca. 10 cm \times 10 cm) wurde in eine verschließbare, dunkle Schale gelegt und mit 20 ml Gebrauchslösung getränkt. Runde Nitrocellulosefilter wurden auf die ausgestrichenen Hefekolonien gelegt, die Positionierung des NC-Filters auf den Hefen wurde markiert und nach kurzer Wartezeit wieder vorsichtig abgezogen. Die Hefen wurden auf der NC in flüssigem Stickstoff ca. 1 min lang fixiert. Danach wurde die wieder aufgetaute NC mit den Hefekolonien nach oben auf das nasse Whatman-Filterpapier gelegt. Die Schale wurde verschlossen und bei 30°C so lange inkubiert, bis die Kolonien der Positivkontrolle sich blau verfärbten. Die NC wurde vorsichtig aus der Schale gehoben und 10 min lang in Fixierlösung gelegt. Nach dem Trocknen wurden die Blaufärbungen den entsprechenden Kolonien zugeordnet. Die blaue Farbe zeigte eine *lacZ*-Reporterogen-Aktivierung an.

4.2.22.10 *MEL1*-Aktivierung: X-alpha-Gal-Test

Benötigte Lösung

Indikatorlösung: 2 mg/ml X-alpha-Gal in DMF

Durchführung des Tests Zur Vorbereitung des Tests wurden je 100 μl Indikatorlösung mit Hilfe eines sterilen Drygalskispatels auf nach 4.2.7.8 hergestellte TDO- und QDO-Platten verteilt. Nach dem Trocknen der Lösung wurden Hefeklone mit sterilen breiten Zahnstochern auf dem Agar ausgestrichen und die Platten bei 30°C 1 Woche lang inkubiert. Als Positivkontrolle diente pGBKT7-53 mit pGADT7-T in AH109, als Negativkontrolle pGBKT7-Lam mit pGADT7-T in AH109. Eine blaue Verfärbung der Hefekolonien zeigte eine *MEL1*-Reporter-gen-Aktivierung gefolgt von α -Galaktosidase-Sekretion an.

4.2.22.11 PCR zum Nachweis von pLP-GBKT7 und pACT2 in den diploiden Zellen

Die Hefeklone, bei denen die unter 4.2.22.8, 4.2.22.9 und 4.2.22.10 beschriebenen Tests positiv ausgefallen waren, wurden mit Hilfe einer PCR auf das Vorkommen der Bank- und Köderplasmide getestet. Von den jeweiligen Ausstrichen auf QDO-Platten wurden so viele Hefen gekratzt, wie in etwa einer Kolonie mit 3 mm Durchmesser entsprochen hätten. Die Hefen wurden in 1.5 ml-Plastikreaktionsgefäße gestrichen und mit jeweils 100 μl Lyticase-Lösung (20 U/ml) 10 min lang bei RT inkubiert. Danach wurden sie in einer Tischzentrifuge (5000 Upm, 5 min, RT) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und der Rückstand bei 92°C 5 min lang erhitzt. Dann wurden 100 μl $\text{H}_2\text{O}_{dd,a}$ zugegeben. Für den PCR-Ansatz wurden 40 μl des Hefelysats mit 5 μl 10 \times "Reaktionspuffer S" des "Kit"-Anbieters, 2 μl MgCl_2 , 1 μl dNTPs (je 10 mM jedes Nucleotids), 0.5 μl Taq-Polymerase (5 U/ μl) und 2 μl "Primermix" (jeder "Primer" 10 μM) gemischt. Zum Nachweis von pLP-GBKT7 wurden die Klonierungs-"primer" des verwendeten pAK7-Teilstücks eingesetzt. Als Positivkontrolle diente der für die Verpaarung verwendete haploide AH109-Hefeklon mit pAK7 in pLP-GBKT7, als Negativkontrolle pGBKT7-53 mit pGADT7-T in AH109. Die PCR wurde durch eine 2 min lange Inkubation bei 94°C gestartet. Es folgten 35 PCR-Zyklen (je 30 s bei 94°C; 30 s bei 56°C; 1 min 30 s bei 72°C). Die finale Elongation dauerte 10 min bei 72°C. Die PCR-Produkte wurden, wie in 4.2.7.22 angegeben, auf 1% (w/v) Agrarosegelen analysiert. Klone, in denen auch nach einer Wiederholung der PCR-Reaktion mit frischen Hefen keine pACT2-Plasmide nachgewiesen werden konnten, sondern nur pLP-GBKT7, wurden nicht weiter untersucht.

Verwendete Primersequenzen für die PCR mit diploiden Zellen:

pAK7-3/pLP-GBKT7 5'-GCATCAGAATTCCATGGAGGAAGAAGAGGAAGTCA-3'
 5'-GCATACGGATCCTCTGCATTTTCGGGATTGTTCTTG-3'
 pACT2 5'-AAGTGAACCTTGCGGGGTTTTTCAGTATCTACG-3'
 5'-CTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCC-3'

4.2.22.12 Isolierung und Sequenzierung der Bibliotheks-Plasmide

Aus den nach 4.2.22.11 positiven diploiden Zellen wurden die Plasmide nach 4.2.7.11 isoliert und nach 4.2.7.26 in kompetente “NovaBlueTM Singles“-Zellen transfiziert. Selektioniert wurde auf Kanamycinplatten, um nur Klone mit Bibliotheksplasmid zu propagieren. Aus den entstandenen Klonen wurden dann die Plasmide mit dem “E.Z.N.A.[®] Plasmid Miniprep Kit I (classic line)“ isoliert. Nach der Reinigung wurden die Plasmide zur Kontrolle mit den zur Klonierung der cDNA-Bibliothek verwendeten Restriktionsendonucleasen EcoRI und XhoI analytisch verdaut (siehe 4.2.7.19). Die Größen der ausgeschnittenen cDNA-Stücke wurden mit den gemäß 4.2.22.11 entstandenen PCR-Produkten verglichen. Dabei wurde berücksichtigt, dass durch die Lage der “Primer“-Bindungsstellen auf dem Vektor in der PCR um 200 bp längere Fragmente als die ausgeschnittenen cDNA-Stücke entstanden waren. Danach wurden die pACT2-Bibliotheksplasmide, wie in 4.2.22.13 beschriebenen, in AH109 transfiziert und parallel zur kommerziellen Sequenzierung an die Firma MWG, Martinsried, geschickt.

4.2.22.13 Rücktransformation zur Bestätigung der Interaktion in Hefe

Durch eine Rücktransformation kann zwischen autoaktiven und nicht autoaktiven Klonen unterschieden werden. Dazu müssen die isolierten Plasmide aller potentiellen Kandidaten zum einen zur Transformation von Hefezellen, die das Köderplasmid enthalten, und zum anderen zur Transformation von Hefezellen mit dem leeren Ködervektor pGBKT7 verwendet werden. Autoaktive Hefeklone können nach Transformation von Hefezellen auch dann wachsen, wenn diese nur den leeren Ködervektor pGBKT7 enthalten und sind daher kein Indikator für eine Interaktion von Köder und potentiellen Kandidaten. Sie sind für die weiteren Untersuchungen uninteressant.

Transformation von Hefezellen des Stammes AH109, die pGBKT7 bereits enthalten Nach dem in 4.2.7.27 beschriebenen Protokoll wurden Hefezellen des Stammes AH109, die den leeren BD-Vektor pGBKT7 enthielten, mit allen getesteten Bibliotheksplasmiden transfiziert. Die Hefen wurden nach der Plasmidaufnahme auf DDO-Platten

ausplattiert und danach 3 d lang bei 30°C inkubiert. Pro Plasmid wurden drei der auf DDO-Platten gewachsenen Klone weiter auf TDO- und QDO-Platten ausgestrichen, die Platten 3 d lang bei 30°C inkubiert und die Hefezellen anhand ihres Wachstum analysiert.

Transformation von Hefezellen des Stammes AH109, die das Köderplasmid bereits enthalten Nach dem in 4.2.7.27 beschriebenen Protokoll wurden Hefezellen des Stammes AH109, die das zur Verpaarung verwendete Köderplasmid enthielten, mit allen getesteten Bibliotheksplasmiden transfiziert. Die Hefen wurden nach der Plasmidaufnahme auf DDO-Platten ausplattiert und danach 3 d lang bei 30°C inkubiert. Pro Plasmid wurden drei der auf DDO-Platten gewachsenen Klone weiter auf TDO- und QDO-Platten ausgestrichen, die Platten 3 d lang bei 30°C inkubiert und die Hefezellen anhand ihres Wachstum analysiert.

4.2.22.14 Bioinformatische Analyse der sequenzierten Klone

Alle nicht autoaktiven Kandidaten wurden mit den Computerprogrammen BLASTP, BLASTX und TBLASTX über die Internetseite des NCBI untersucht. Autoaktive Klone wurden nicht weiter untersucht. Stellte sich bei dieser Recherche heraus, dass cDNA-Klone beispielweise aufgrund der physiologischen Funktion des von ihnen codierten Proteins in der Zelle nicht als Interaktionspartner der pAK7 in Frage kamen, wurden diese Klone nicht weiter untersucht.

4.2.22.15 PCR zur Analyse der Transkription

Die nach 4.2.22.14 verbliebenen Klone wurden in einer PCR auf ihre Transkription in Ratten-EPK untersucht, um zu klären, ob diese Kandidaten als physiologische Interaktionspartner der pAK7 in Frage kommen würden. Da die zur Verpaarung verwendete cDNA-Bibliothek aus humanen Hoden hergestellt worden war, mussten die jeweiligen homologen Rattensequenzen gefunden werden. Für diese wurden dann geeignete PCR-“Primer“ ermittelt. Für die PCR wurden 2 μ l “Primermix“ mit 23 μ l “Mastermix“ gemischt, der außer H₂O_{dd,a} noch 10 μ l “HotStar Taq Polymerase Mastermix“ und 0.4 μ l cDNA (siehe 4.2.9) enthielt. Die Polymerase wurde durch 15minütige Erwärmung auf 95°C aktiviert. Es folgten 35 Zyklen (30 s bei 94°C, 30 s bei 56°C und 30 s bei 72°C). Die finale Elongation bei 72°C dauerte 10 min. Die entstandenen PCR-Produkte wurden gemäß 4.2.7.22 auf 1%igen (w/v) Agarosegelen analysiert. Zusätzlich wurden Hoden, Lunge, Hirn, Milz, Niere, Leber und Darm untersucht. Die jeweils zugehörige Negativkontrolle wurde ebenfalls wie unter 4.2.9 beschrieben hergestellt, wobei allerdings keine RT zugesetzt wurde.

Verwendete “Primer“-Sequenzen für die PCR zur Analyse der Transkription:

Klon 3 5'-CCGTTGTTCAATCAGAAAAAGAGGAAC-3'
5'-CTGGATTCACAGCTTCCCACGC-3'

Klon 11 5'-GAGGCCCTGGTGCCCGTG-3'
5'-CCATCCCGGATGGCCTGC-3'

Klon 25 5'-TCGAAACTGTGAGACTGACACGCTC-3'
5'-ACAGTTCTTTCTGTAACAGGCCAGGAT-3'

Klon 29 5'-CAAGCGGCAGACAGTCATCACC-3'
5'-ACATCAAACCTGGCCAGAAACCTCC-3'

4.2.23 Adenylatkinase-Test

Reaktionspuffer: 55 mM Tris; pH 7.9 mit 40 mM Glucose, 2 mM MgCl₂, 2.0 mM NADP

Etablierung und Durchführung des Tests Um die mögliche enzymatische Aktivität des pAK7-Proteins zu untersuchen, wurde der Adenylatkinase-Test nach Watanabe und Flavin (1976) in der Variante nach Wirschell *et al.* (2004) angewendet. Die Messungen der enzymatischen Aktivität wurden in Reaktionspuffer (55 mM Tris (pH 7.9) mit 40 mM Glucose, 2 mM MgCl₂, 2.0 mM NADP) unter Zusatz von je 1 U/ml Hexokinase und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 1 mM Natrium(meta)vanadat als Dynein-ATPasen-Inhibitor, sowie 1.5 mM ADP durchgeführt, stets als Dreifachbestimmungen. Die Zellhomogenate für die Messungen wurden aus HEK-Zellen (transfiziert oder nicht transfiziert) hergestellt, indem die in 200-2000 μ l Suspension enthaltenen Zellen im doppelten Volumen Trispuffer mittels Ultraschall aufgeschlossen wurden. Sodann wurde 3 \times 10 min lang bei 4°C und 14000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues passendes Zentrifugengefäß überführt und für die Messungen eingesetzt.

Der Reaktionsansatz wurde ohne Zellhomogenat 10 min lang bei RT vorinkubiert, um eventuell vorhandene, die Messung verfälschende Spuren von ATP zu beseitigen. Die Reaktion wurde mit 8 μ g Protein aus dem Zellhomogenat oder 0.5 U Myokinase (Positivkontrolle, ohne Zellhomogenat) gestartet. Die Zunahme der NADPH-Konzentration in allen Ansätzen wurde in einem temperierbaren Photometer bei 340 nm über insgesamt 10 min vermessen, wobei alle 30 s ein Messwert erhoben wurde.

Kapitel 5

Literaturverzeichnis

Afzelius B (2004) Cilia-related diseases. *J Pathol* 204: 470–477.

Afzelius BA (1999) Asymmetry of cilia and of mice and men. *Int J Dev Biol* 43: 283–286.

Ansley S, Badano J, Blacque O, Hill J, Hoskins B, Leitch C, Kim J, Ross A, Eichers E, Teslovich T, Mah A, Johnsen R, Cavender J, Lewis R, Leroux M, Beales P und Katsanis N (2003) Basal body dysfunction is a likely cause of pleiotropic Bardet-Biedl syndrome. *Nature* 425: 628–633.

Ausubel FM (1999) *Short Protocols in Molecular Biology*. Wiley-VCH, 10 / 41, Abb. 10.5.1.

Baas D, Meiniel A, Benadiba C, Bonnafe E, Meiniel O, Reith W und Durand B (2006) A deficiency in RFX3 causes hydrocephalus associated with abnormal differentiation of ependymal cells. *Eur J Neurosci* 24: 1020–1030.

Badano J, Ansley S, Leitch C, Lewis R, Lupski J und Katsanis N (2003) Identification of a novel Bardet-Biedl syndrome protein, BBS7, that shares structural features with BBS1 and BBS2. *Am J Hum Genet* 72: 650–658.

Banizs B, Pike M, Millican C, Ferguson W, Komlosi P, Sheetz J, Bell P, Schwiebert E und Yoder B (2005) Dysfunctional cilia lead to altered ependyma and choroid plexus function, and result in the formation of hydrocephalus. *Development* 132: 5329–5339.

Bartel P und Fields S (1997) *The Yeast Two-Hybrid System*. Advances in Molecular Biology Series, Oxford University Press, USA, 1. Aufl.

Bauer A und Kuster B (2003) Affinity purification-mass spectrometry. Powerful tools for the characterization of protein complexes. *Eur J Biochem* 270: 570–578.

- Beales P (2005) Lifting the lid on Pandora's box: the Bardet-Biedl syndrome. *Curr Opin Genet Dev* 15: 315–323.
- Bitsch P und Schiebler T (1979) Zur postnatalen Entwicklung der Eminentia mediana der Ratte. *Z Mikrosk Anat Forsch* 93: 1–20.
- Blacque O und Leroux M (2006) Bardet-Biedl syndrome: an emerging pathomechanism of intracellular transport. *Cell Mol Life Sci* 63: 2145–2161.
- Blacque OE, Reardon MJ, Li C, McCarthy J, Mahjoub MR, Ansley SJ, Badano JL, Mah AK, Beales PL, Davidson WS, Johnsen RC, Audeh M, Plasterk RHA, Baillie DL, Katsanis N, Quarmby LM, Wicks SR und Leroux MR (2004) Loss of *C. elegans* BBS-7 and BBS-8 protein function results in cilia defects and compromised intraflagellar transport. *Genes Dev* 18: 1630–1642.
- Bleier R (1971) The relations of ependyma to neurons and capillaries in the hypothalamus: a Golgi-Cox study. *J Comp Neurol* 142: 439–463.
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254.
- Brody S, Yan X, Wuerffel M, Song S und Shapiro S (2000) Ciliogenesis and left-right axis defects in forkhead factor HFH-4-null mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23: 45–51.
- Brownson C und Spencer N (1972) Kinetic studies on the two common inherited forms of human erythrocyte adenylate kinase. *Biochem J* 130: 805–811.
- Bruni J (1998) Ependymal development, proliferation, and functions: a review. *Microsc Res Tech* 41: 2–13.
- Buerckstuemmer T, Bennett K, Preradovic A, Schutze G, Hantschel O, Superti-Furga G und Bauch A (2006) An efficient tandem affinity purification procedure for interaction proteomics in mammalian cells. *Nat Methods* 3: 1013–1019.
- Burnette WN (1981) Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112: 195–203.
- Cameron R und Rakic P (1991) Glial cell lineage in the cerebral cortex: a review and synthesis. *Glia* 4: 124–137.

-
- Caspary F, Shevchenko A, Wilm M und Seraphin B (1999) Partial purification of the yeast U2 snRNP reveals a novel yeast pre-mRNA splicing factor required for pre-spliceosome assembly. *EMBO J* 18: 3463–3474.
- Cataldo A und Broadwell R (1986) Cytochemical identification of cerebral glycogen and glucose-6-phosphatase activity under normal and experimental conditions. II. Choroid plexus and ependymal epithelia, endothelia and pericytes. *J Neurocytol* 15: 511–524.
- Cavalier-Smith T (2002) The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 297–354.
- Chen Y, McNeill JR, Hajek I und Hertz L (1992) Effect of vasopressin on brain swelling at the cellular level: do astrocytes exhibit a furosemide–vasopressin-sensitive mechanism for volume regulation? *Can J Physiol Pharmacol* 70 Suppl: S367–S373.
- Colowick S (1951) *The Enzymes: Chemistry and Mechanism of action*, Bd. 2. New York: Academic Press, 114 ff.
- Colowick S und Kalckar H (1943) The role of myokinase in transphosphorylations - I. The enzymatic phosphorylation of hexoses by adenyl pyrophosphate. *J Biol Chem* 148: 117–126.
- Davenport J und Yoder B (2005) An incredible decade for the primary cilium: A look at a once-forgotten organelle. *Am J Physiol* 289: F1159–F1169.
- Davy B und Robinson M (2003) Congenital hydrocephalus in hy3 mice is caused by a frameshift mutation in Hydin, a large novel gene. *Hum Mol Genet* 12: 1163–1170.
- Del Bigio M (1995) The ependyma: a protective barrier between brain and cerebrospinal fluid. *Glia* 14: 1–13.
- Diatchenko L, Lukyanov S, Lau Y und Siebert P (1999) Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol* 303: 349–380.
- Diringer M, Kirsch J, Ladenson P, Borel C und Hanley D (1990) Cerebrospinal fluid atrial natriuretic factor in intracranial disease. *Stroke* 21: 1550–1554.
- Dirksen E (1991) Centriole and basal body formation during ciliogenesis revisited. *Biol Cell* 72: 31–38.
- Doetsch F (2003) The glial identity of neural stem cells. *Nat Neurosci* 6: 1127–1134.

- Doetsch F und Alvarez-Buylla A (1996) Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 14895–14900.
- Donaldson S, Picher M und Boucher R (2002) Secreted and cell-associated adenylylate kinase and nucleoside diphosphokinase contribute to extracellular nucleotide metabolism on human airway surfaces. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26: 209–215.
- Duguid JR und Dinauer MC (1990) Library subtraction of in vitro cDNA libraries to identify differentially expressed genes in scrapie infection. *Nucleic Acids Res* 18: 2789–2792.
- Durfee T, Becherer K, Chen P, Yeh S, Yang Y, Kilburn A, Lee W und Elledge S (1993) The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev* 7: 555–569.
- Dzeja PP und Terzic A (2003) Phosphotransfer networks and cellular energetics. *J Exp Biol* 206: 2039–2047.
- Fields S und Song O (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340: 245–246.
- Fishman R (1992) *CSF findings in diseases of the nervous system*. WB Saunders, Philadelphia, 2. Aufl., 253–343.
- Florea L, Francesco VD, Miller J, Turner R, Yao A, Harris M, Walenz B, Mobarry C, Merkulov GV, Charlab R, Dew I, Deng Z, Istrail S, Li P und Sutton G (2005) Gene and alternative splicing annotation with AIR. *Genome Res* 15: 54–66.
- Ford W (2006) Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round? *Hum Reprod Update* 12: 269–274.
- Frolenkov G, Belyantseva I, Friedman T und Griffith A (2004) Genetic insights into the morphogenesis of inner ear hair cells. *Nat Rev Genet* 5: 489–498.
- Frommer K (2003) *Identifizierung und Charakterisierung ependymspezifisch exprimierter Gene*. Diplomarbeit, Universität Tübingen.
- Fukami-Kobayashi K, Nosaka M, Nakazawa A und Go M (1996) Ancient divergence of long and short isoforms of adenylylate kinase: molecular evolution of the nucleoside monophosphate kinase family. *FEBS Lett* 385: 214–220.

-
- Garcia-Verdugo J, Ferron S, Flames N, Collado L, Desfilis E und Font E (2002) The proliferative ventricular zone in adult vertebrates: a comparative study using reptiles, birds, and mammals. *Brain Res Bull* 57: 765–775.
- Garfin DE (1990) One-dimensional gel electrophoresis. *Methods Enzymol* 182: 425–441.
- Geiger H, Bahner U, Palkovits M, Hugo C, Niklas E und Heidland A (1989) Atrial natriuretic peptide in brain preoptic areas: implications for fluid and salt homeostasis. *J Cardiovasc Pharmacol* 13 Suppl 6: S20–S23.
- Gilles A, Marliere P, Rose T, Sarfati R, Longin R, Meier A, Femandjian S, Monnot M, Cohen G und Barzu O (1988) Conservative replacement of methionine by norleucine in *Escherichia coli* adenylate kinase. *J Biol Chem* 263: 8204–8209.
- Gundlach A und Knobe K (1992) Distribution of preproatrial natriuretic peptide mRNA in rat brain detected by in situ hybridization of DNA oligonucleotides: enrichment in hypothalamic and limbic regions. *J Neurochem* 59: 758–761.
- Hamprecht B (1977) Structural, electrophysiological, biochemical, and pharmacological properties of neuroblastoma-glioma cell hybrids in cell culture. *Ind Rev Cytol* 49: 99–170.
- Hamprecht B, Glaser T, Reiser G, Bayer E und Propst F (1985) Culture and characteristics of hormone-responsive neuroblastoma X glioma hybrid cells. *Methods Enzymol* 109: 316–341.
- Hamprecht B und Löffler F (1985) Primary glial cultures as a model for studying hormone action. *Methods Enzymol* 109: 341–345.
- Haycraft C, Swoboda P, Taulman P, Thomas J und Yoder B (2001) The *C. elegans* homolog of the murine cystic kidney disease gene *Tg737* functions in a ciliogenic pathway and is disrupted in *osm-5* mutant worms. *Development* 128: 1493–1505.
- Hirschner W, Pogoda H, Kramer C, Thiess U, Hamprecht B, Wiesmuller K, Lautner M und Verleysdonk S (2007) Biosynthesis of *Wdr16*, a marker protein for kinocilia-bearing cells, starts at the time of kinocilia formation in rat, and *wdr16* gene knockdown causes hydrocephalus in zebrafish. *J Neurochem* 101: 274–288.
- Hirst R, Rutman A, Sikand K, Andrew P, Mitchell T und O’Callaghan C (2000) Effect of pneumolysin on rat brain ciliary function: comparison of brain slices with cultured ependymal cells. *Pediatr Res* 47: 381–384.

- Horstmann E (1954) Die Faserghia des Selachiergehirns. *Z Zellforsch* 39: 588–617.
- Hsu DR, Chuang PT und Meyer BJ (1995) DPY-30, a nuclear protein essential early in embryogenesis for *Caenorhabditis elegans* dosage compensation. *Development* 121: 3323–3334.
- Hsu DR und Meyer BJ (1994) The dpy-30 gene encodes an essential component of the *Caenorhabditis elegans* dosage compensation machinery. *Genetics* 137: 999–1018.
- Ibañez-Tallon I, Heintz N und Omran H (2003) To beat or not to beat: roles of cilia in development and disease. *Hum Mol Genet* 12 Review Issue 1: R27–R35.
- Ibañez-Tallon I, Pagenstecher A, Fliegau M, Olbrich H, Kispert A, Ketelsen U, North A, Heintz N und Omran H (2004) Dysfunction of axonemal dynein heavy chain Mdnah5 inhibits ependymal flow and reveals a novel mechanism for hydrocephalus formation. *Hum Mol Gen* 13: 2133–2141.
- Irons MJ und Clermont Y (1982) Kinetics of fibrous sheath formation in the rat spermatid. *Am J Anat* 165: 121–130.
- Ito H, Fukuda Y, Murata K und Kimura A (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* 153: 163–168.
- Johansson C, Momma S, Clarke D, Risling M, Lendahl U und Frisen J (1999) Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96: 25–34.
- Jung J, Bhat R, Preston G, Guggino W, Baraban J und Agre P (1994) Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 13052–13056.
- Kahle W, Leonhardt H und Platzner W (1990) *Taschenatlas der Anatomie*, Bd. Nervensystem und Sinnesorgane. Thieme Verlag, Stuttgart, 6. Aufl., 262–263.
- Khoo JC und Russell PJ (1972) Isoenzymes of adenylate kinase in human tissue. *Biochim Biophys Acta* 268: 98–101.
- Kim J, Badano J, Sibold S, Esmail M, Hill J, Hoskins B, Leitch C, Venner K, Ansley S, Ross A, Leroux M, Katsanis N und Beales P (2004) The Bardet-Biedl protein BBS4 targets cargo to the pericentriolar region and is required for microtubule anchoring and cell cycle progression. *Nat Genet* 36: 462–470.
- Knigge K und Scott D (1970) Structure and function of the median eminence. *Am J Anat* 129: 223–243.

-
- Kobayashi Y, Watanabe M, Okada Y, Sawa H, Takai H, Nakanishi M, Kawase Y, Suzuki H, Nagashima K, Ikeda K und Motoyama N (2002) Hydrocephalus, situs inversus, chronic sinusitis, and male infertility in DNA polymerase I-deficient mice: possible implication for the pathogenesis of immotile cilia syndrome. *Mol Cell Biol* 22: 2769–2776.
- Koh L, Zakharov A und Johnston M (2005) Integration of the subarachnoid space and lymphatics: is it time to embrace a new concept of cerebrospinal fluid absorption? *Cerebrospinal Fluid Res* 2: 6.
- Kuchler S, Graff MN, Gobaille S, Vincendon G, Roche AC, Delaunoy JP, Monsigny M und Zanetta JP (1994) Mannose dependent tightening of the rat ependymal cell barrier. In vivo and in vitro study using neoglycoproteins. *Neurochem Int* 24: 43–55.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
- Lehtreck K und Witman G (2007) *Chlamydomonas reinhardtii* hydin is a central pair protein required for flagellar motility. *J Cell Biol* 176: 473–482.
- Lehmann G, Gradilone S und Marinelli R (2004) Aquaporin water channels in central nervous system. *Curr Neurovasc Res* 1: 293–303.
- Leonhardt H (1980) *Ependym und circumventriculäre Organe*, Bd. 4. Springer Verlag, Berlin, 10. Aufl., 177–655.
- Lois C und Alvarez-Buylla A (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264: 1145–1148.
- Luban J, Bossolt K, Franke E, Kalpana G und Goff S (1993) Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B. *Cell* 73: 1067–1078.
- Luo Y, Vijaychander S, Stile J und Zhu L (1996) Cloning and analysis of DNA-binding proteins by yeast one-hybrid and one-two-hybrid systems. *Biotechniques* 20: 564–568.
- Luskin M (1993) Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 11: 173–189.
- Maekawa F, Toyoda Y, Torii N, Miwa I, Thompson R, Foster D, Tsukahara S, Tsukamura H und Maeda K (2000) Localization of glucokinase-like immunoreactivity in the rat lower brain stem: for possible location of brain glucose-sensing mechanisms. *Endocrinology* 141: 375–384.

- Manley G, Fujimura M, Ma T, Noshita N, Filiz F, Bollen A, Chan P und Verkman A (2000) Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nat Med* 6: 159–163.
- Margulis L und Bermudes D (1985) Symbiosis as a mechanism of evolution: status of cell symbiosis theory. *Symbiosis* 1: 101–124.
- Meinzel A (2007) The secretory ependymal cells of the subcommissural organ: which role in hydrocephalus? *Int J Biochem Cell Biol* 39: 463–468.
- Millhouse O (1971) A Golgi study of third ventricle tanycytes in the adult rodent brain. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 121: 1–13.
- Mitro A und Schiebler T (1972) Über die Entwicklung regionaler Unterschiede im Ependym des 3. Ventrikels der Ratte. *Anat Anz* 132: 1–9.
- Müller CW und Schulz GE (1992) Structure of the complex between adenylate kinase from *Escherichia coli* and the inhibitor Ap5A refined at 1.9 Å resolution. A model for a catalytic transition state. *J Mol Biol* 224: 159–177.
- Mykytyn K, Nishimura D, Searby C, Beck G, Bugge K, Haines H, Cornier A, Cox G, Fulton A, Carmi R, Iannaccone A, Jacobson S, Weleber R, Wright A, Riise R, Hennekam R, Luleci G, Berker-Karauzum S, Biesecker L, Stone E und Sheffield V (2003) Evaluation of complex inheritance involving the most common Bardet-Biedl syndrome locus (BBS1). *Am J Hum Genet* 72: 429–437.
- Mykytyn K, Nishimura D, Searby C, Shastri M, Yen H, Beck J, Braun T, Streb L, Cornier A, Cox G, Fulton A, Carmi R, Luleci G, Chandrasekharappa S, Collins F, Jacobson S, Heckenlively J, Weleber R, Stone E und Sheffield V (2002) Identification of the gene (BBS1) most commonly involved in Bardet-Biedl syndrome, a complex human obesity syndrome. *Nat Genet* 31: 435–438.
- Nakamura K, Iitsuka K und Fujii T (1999) Adenylate kinase is tightly bound to axonemes of *Tetrahymena* cilia. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 124: 195–199.
- Nakamura Y und Sato K (1993) Role of disturbance of ependymal ciliary movement in development of hydrocephalus in rats. *Child's Nerv Syst* 9: 65–71.
- Nguyen T, Chin W, O'Brien J, Verdugo P und Berger A (2001) Intracellular pathways regulating ciliary beating of rat brain ependymal cells. *J Physiol* 531: 131–140.
- Nicholson C (1999) Signals that go with the flow. *Trends Neurosci* 22: 143–145.

-
- Nilsson C, Lindvall-Axelsson M und Owman C (1992) Neuroendocrine regulatory mechanisms in the choroid plexus-cerebrospinal fluid system. *Brain Res Brain Res Rev* 17: 109–138.
- Noda L (1973) *Adenylate kinase*, Bd. The Enzymes Vol. III. Academic Press, New York, 279–305.
- Noda L und Kuby S (1957) Adenosine triphosphate-adenosine monophosphate transphosphorylase (myokinase). II. Homogeneity measurements and physicochemical properties. *J Biol Chem* 226: 551–558.
- Noguchi M, Sawada T und Akazawa T (2001) ATP-regenerating system in the cilia of *Paramecium caudatum*. *J Exp Biol* 204: 1063–1071.
- Nualart F, Hein S, Rodriguez E und Oksche A (1991) Identification and partial characterization of the secretory glycoproteins of the bovine subcommissural organ-Reissner's fiber complex. Evidence for the existence of two precursor forms. *Brain Res Mol Brain Res* 11: 227–238.
- O'Callaghan C, Sikand K und Rutman A (1999) Respiratory and brain ependymal ciliary function. *Pediatr Res* 46: 704–707.
- Oksche A (1961) Vergleichende Untersuchungen über die sekretorische Aktivität des Subkommissuralorgans und den Gliacharakter seiner Zellen. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 54: 549–612.
- Oksche A (1969) The subcommissural organ. *J Neurovisc Relat* 31: Suppl 9:111+.
- Oldfield B, Allen A, Hards D, McKinley M, Schlawe I und Mendelsohn F (1994) Distribution of angiotensin II receptor binding in the spinal cord of the sheep. *Brain Res* 650: 40–48.
- Ostrowski L, Andrews K, Potdar P, Matsuura H, Jetten A und Nettlesheim P (1999) Cloning and characterization of KPL2, a novel gene induced during ciliogenesis of tracheal epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20: 675–683.
- Pai E, Sachsenheimer W, Schirmer R und Schulz G (1977) Substrate positions and induced-fit in crystalline adenylate kinase. *J Mol Biol* 114: 37–45.
- Papadopoulos M, Krishna S und Verkman A (2002) Aquaporin water channels and brain edema. *Mt Sinai J Med* 69: 242–248.

- Pfeiffer B, Elmer K, Roggendorf W, Reinhart P und Hamprecht B (1990) Immunohistochemical demonstration of glycogen phosphorylase in rat brain slices. *Histochemistry* 94: 73–80.
- Picher M und Boucher R (2003) Human airway ecto-adenylate kinase. A mechanism to propagate ATP signaling on airway surfaces. *J Biol Chem* 278: 11256–11264.
- Pilgrim C (1978) Transport function of hypothalamic tanycyte ependyma: how good is the evidence? *Neuroscience* 3: 277–283.
- Prothmann C, Wellard J, Berger J, Hamprecht B und Verleysdonk S (2001) Primary cultures as a model for studying ependymal functions: glycogen metabolism in ependymal cells. *Brain Res* 920: 74–83.
- Puig O, Caspary F, Rigaut G, Rutz B, Bouveret E, Bragado-Nilsson E, Wilm M und Seraphin B (2001) The tandem affinity purification (TAP) method: A general procedure of protein complex purification. *Methods* 24: 218–229.
- Pullen T, Ginger M, Gaskell S und Gull K (2004) Protein targeting of an unusual, evolutionarily conserved adenylylase to a eukaryotic flagellum. *Mol Biol Cell* 15: 3257–3265.
- Purkinje J (1836) Über Flimmerbewegungen im Gehirn. *Müller Arch Anat Physiol* 289: 289–290.
- Radonic A, Thulke S, Mackay I, Landt O, Siegert W und Nitsche A (2004) Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 313: 856–862.
- Ramsdell AF und Yost HJ (1998) Molecular mechanisms of vertebrate left-right development. *Trends Genet* 14: 459–465.
- Reichenbach A (1989) Attempt to classify glial cells by means of their process specialization using the rabbit retinal Muller cell as an example of cytotopographic specialization of glial cells. *Glia* 2: 250–259.
- Reichenbach SR A und Robinson (1995) *Neuroglia, Ependymoglia and Ependymoglia-like Cells*. Oxford University Press, 58–84.
- Ren H, Wang L, Bennett M, Liang Y, Zheng X, Lu F, Li L, Nan J, Luo M, Eriksson S, Zhang C und Su X (2005) The crystal structure of human adenylylase 6: An adenylylase localized to the cell nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 303–308.

-
- Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M und Seraphin B (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat biotechnol* 17: 1030–1032.
- Rodriguez E, Rodriguez S und Hein S (1998) The subcommissural organ. *Microsc Res Tech* 41: 98–123.
- Rosenbaum J und Witman G (2002) Intraflagellar transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 813–825.
- Rosenberg G, Kyner W, Fenstermacher J und Patlak C (1986) Effect of vasopressin on ependymal and capillary permeability to tritiated water in cat. *Am J Physiol* 251: F485–F489.
- Ross A, May-Simera H, Eichers E, Kai M, Hill J, Jagger D, Leitch C, Chapple J, Munro P, Fisher S, Tan P, Phillips H, Leroux M, Henderson D, Murdoch J, Copp A, Eliot M, Lupski J, Kemp D, Dollfus H, Tada M, Katsanis N, Forge A und Beales P (2005) Disruption of Bardet-Biedl syndrome ciliary proteins perturbs planar cell polarity in vertebrates. *Nat Genet* 37: 1135–1140.
- Roth Y, Kimhi Y, Edery H, Aharonson E und Priel Z (1985) Ciliary motility in brain ventricular system and trachea of hamsters. *Brain Res* 330: 291–297.
- Russell J PJ, Horenstein J, Goins L, Jones D und Laver M (1974) Adenylate kinase in human tissue. I. Organ specificity of adenylate kinase isoenzymes. *J Biol Chem* 249: 1874–1879.
- Saitou N und Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406–425.
- Sapiro R, Kostetskii I, Olds-Clarke P, Gerton G, Radice G und Strauss III J (2002) Male infertility, impaired sperm motility, and hydrocephalus in mice deficient in sperm-associated antigen 6. *Mol Cell Biol* 22: 6298–6305.
- Sapiro R, Tarantino L, Velazquez F, Kiriakidou M, Hecht N, Bucan M und Strauss III J (2000) Sperm antigen 6 is the murine homologue of the *Chlamydomonas reinhardtii* central apparatus protein encoded by the PF16 locus. *Biol Reprod* 62: 511–518.
- Sargent TD und Dawid IB (1983) Differential gene expression in the gastrula of *Xenopus laevis*. *Science* 222: 135–139.

- Sarnat H (1995) Ependymal reactions to injury. A review. *J Neuropathol Exp Neurol* 54: 1–15.
- Sawamoto K, Wichterle H, Gonzalez-Perez O, Cholfin J, Yamada M, Spassky N, Murcia N, Garcia-Verdugo J, Marin O, Rubenstein J, Tessier-Lavigne M, Okano H und Alvarez-Buylla A (2006) New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science* 311: 629–632.
- Schachenmayr W (1967) On the development of ependyma and plexus choriodeus of the rat. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 77: 25–63.
- Schlauderer G und Schulz G (1996) The structure of bovine mitochondrial adenylate kinase: comparison with isoenzymes in other compartments. *Protein Sci* 5: 434–441.
- Schoebitz K, Garrido O, Heinrichs M, Speer L und Rodríguez EM (1986) Ontogenetical development of the chick and duck subcommissural organ. An immunocytochemical study. *Histochemistry* 84: 31–40.
- Schoff P, Cheetham J und Lardy H (1989) Adenylate kinase activity in ejaculated bovine sperm flagella. *J Biol Chem* 264: 6086–6091.
- Scott DE, Dudley GK und Knigge KM (1974) The ventricular system in neuroendocrine mechanisms. II. In vivo monoamine transport by ependyma of the median eminence. *Cell Tissue Res* 154: 1–16.
- Segal M (1993) Extracellular and cerebrospinal fluids. *J Inherit Metab Dis* 16: 617–638.
- Segal M (2000) The choroid plexuses and the barriers between the blood and the cerebrospinal fluid. *Cell Mol Neurobiol* 20: 183–196.
- SenGupta DJ, Zhang B, Kraemer B, Pochart P, Fields S und Wickens M (1996) A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 8496–8501.
- Sheng X, Li X und Pan X (1999) An iso-random Bi Bi mechanism for adenylate kinase. *J Biol Chem* 274: 22238–22242.
- Sinev M, Sineva E, Ittah V und Haas E (1996) Towards a mechanism of AMP-substrate inhibition in adenylate kinase from *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 397: 273–276.
- Sleigh MA (1981) Primary ciliary dyskinesia. *Lancet* 2: 476.

-
- Spassky N, Merkle F, Flames N, Tramontin A, Garcia-Verdugo J und Alvarez-Buylla A (2005) Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J Neurosci* 25: 10–18.
- Sterba G und Wolf G (1969) Occurrence and function of sialic acid in Reissner's fiber. *Histochemie* 17: 57–63.
- Szulc J, Wiznerowicz M, Sauvain M, Trono D und Aebischer P (2006) A versatile tool for conditional gene expression and knockdown. *Nat Methods* 3: 109–116.
- Tanabe T, Yamada M, Noma T, Kajii T und Nakazawa A (1993) Tissue-specific and developmentally regulated expression of the genes encoding adenylate kinase isozymes. *J Biochem (Tokyo)* 113: 200–207.
- Tomasselli AG, Schirmer RH und Noda LH (1979) Mitochondrial GTP-AMP phosphotransferase. 1. Purification and properties. *Eur J Biochem* 93: 257–262.
- Tritschler F, Murin R, Birk B, Berger J, Rapp M, Hamprecht B und Verleysdonk S (2007) Thrombin causes the enrichment of rat brain primary cultures with ependymal cells via protease-activated receptor 1. *Neurochem Res* 32: 1028–1035.
- Verleysdonk S (1994) *Herstellung homogener astroglialer Zellkulturen aus Rattenhirn durch ein Mangelmedium und deren Charakterisierung*. Diplomarbeit, Universität Tübingen.
- Verleysdonk S (2006) *The ependyma: Biochemical and molecular characterisation*. Dissertation, Habilitationsschrift. Universität Tübingen.
- Verleysdonk S, Hirschner W, Wellard J, Rapp M, de los Angeles GM, Nualart F und Hamprecht B (2004) Regulation by insulin and insulin-like growth factor of 2-deoxyglucose uptake in primary ependymal cell cultures. *Neurochem Res* 29: 127–134.
- Verleysdonk S, Kistner S, Pfeiffer-Guglielmi B, Wellard J, Lupescu A, Laske J, Lang F, Rapp M und Hamprecht B (2005) Glycogen metabolism in rat ependymal primary cultures: regulation by serotonin. *Brain Res* 1060: 89–99.
- Vojtek A, Hollenberg S und Cooper J (1993) Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* 74: 205–214.
- Ward CJ, Yuan D, Masyuk TV, Wang X, Punyashthiti R, Whelan S, Bacallao R, Torra R, LaRusso NF, Torres VE und Harris PC (2003) Cellular and subcellular localization of the ARPKD protein; fibrocystin is expressed on primary cilia. *Hum Mol Genet* 12: 2703–2710.

KAPITEL 5. LITERATURVERZEICHNIS

- Watanabe T und Flavin M (1976) Nucleotide-metabolizing enzymes in *Chlamydomonas* flagella. *J Biol Chem* 251: 182–192.
- Wehner W R und Gehring (1995) *Zoologie*. Thieme Verlag, 23. Aufl., 449–453.
- Weibel M, Pettmann B, Artault J, Sensenbrenner M und Labourdette G (1986) Primary culture of rat ependymal cells in serum-free defined medium. *Brain Res* 390: 199–209.
- Wellard J, DeVente J, Hamprecht B und Verleysdonk S (2006) Natriuretic peptides, but not nitric oxide donors, elevate levels of cytosolic guanosine 3',5'-cyclic monophosphate in ependymal cells ex vivo. *Neurosci Lett* 392: 187–192.
- Wellard J, Rapp M, Hamprecht B und Verleysdonk S (2003) Atrial natriuretic peptides elevate cyclic GMP levels in primary cultures of rat ependymal cells. *Neurochem Res* 28: 225–233.
- Wirschell M, Pazour G, Yoda A, Hirono M, Kamiya R und Witman G (2004) Oda5p, a novel axonemal protein required for assembly of the outer dynein arm and an associated adenylate kinase. *Mol Biol Cell* 15: 2729–2741.
- Wood B (1997) Left-right asymmetry in animal development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 53–82.
- Yaffe MP und Schatz G (1984) Two nuclear mutations that block mitochondrial protein import in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 4819–4823.
- Yamadori T und Nara K (1979) The directions of ciliary beat on the wall of the lateral ventricle and the currents of the cerebrospinal fluid in the brain ventricles. *Scan Electron Microsc* 1: 335–340.
- Zhang H und Mitchell D (2004) Cpc1, a *Chlamydomonas* central pair protein with an adenylate kinase domain. *J Cell Sci* 117: 4179–4188.
- Zhang Z, Sapiro R, Kapfhamer D, Bucan M, Bray J, Chennathukuzhi V, McNamara P, Curtis A, Zhang M, Blanchette-Mackie EJ und Strauss JF (2002) A sperm-associated WD repeat protein orthologous to *Chlamydomonas* PF20 associates with Spag6, the mammalian orthologue of *Chlamydomonas* PF16. *Mol Cell Biol* 22: 7993–8004.
- Zhengwei Y, Wreford N und de Kretser D (1990) A quantitative study of spermatogenesis in the developing rat testis. *Biol Reprod* 43: 629–635.

Kapitel 6

Zusammenfassung

1. Ziel vorliegender Arbeit war, Gene zu finden, die spezifisch in Ependymzellen exprimiert werden. Gegebenenfalls sollte deren Charakterisierung zur Aufklärung der Funktionen von Ependymzellen beitragen.
2. Zur Identifizierung ependymzell-spezifischer Transkripte wurde eine subtraktive cDNA-Bibliothek durchsucht, die mittels Subtraktion von Gehirn-cDNA von Ependym-cDNA erzeugt worden war. Dabei konnte das pAK7-Gen als Kandidat eines ependymzell-spezifisch transkribierten Gens identifiziert werden.
3. Primär- und Sekundärstruktur von pAK7 wurden bioinformatisch charakterisiert, wobei als markantes Merkmal das Motiv katalytisch aktiver Adenylatkinase-Domänen in der Aminosäuresequenz ausgemacht wurde.
4. Zur Ermittlung des pAK7-Transkriptionsprofils wurden verschiedene Gewebe und Zellkultursysteme mit Hilfe konventioneller und quantitativer Polymerase-Kettenreaktion ("Real-time PCR") untersucht. pAK7-mRNA konnte ausschließlich in Geweben und Kultursystemen nachgewiesen werden, die kinocilientragende Zellen enthielten.
5. Die Abhängigkeit der pAK7-Transkription von der Kulturdauer wurde in Hoden und Ependymzellkulturen mit Hilfe von "Real-time PCR" analysiert. Die Spiegel der pAK7-mRNA zeigten den selben zeitlichen Verlauf wie diejenigen bestimmter Transkripte kinocilienassoziierter Gene.
6. Um die Gewebeexpression von pAK7 studieren zu können, wurde ein Antiserum gegen ein C-terminales Peptid von pAK7 hergestellt. Affinität des Antiserums zum und Spezifität für das Antigen wurden mittels ELISA, mittels immunocytochemischer

Anfärbung pAK7-exprimierender HEK-Zellen und mittels “Western blot“ nachgewiesen. Die Intensität des pAK7-Signals konnte in “Western blots“ durch Verwendung partiell gereinigten Antiserums optimiert werden.

7. Mit Hilfe des für Immunanfärbungen eingesetzten Antiserums wurde das pAK7-Protein in Zellkulturen und Gewebeschnitten zellulär lokalisiert. pAK7 konnte dabei nur in kinocilientragenden Zellen nachgewiesen werden.
8. Allerdings konnte die für möglich gehaltene Adenylatkinase-Aktivität in einem Adenylatkinase-Test nicht gefunden werden.
9. Der Auffindung möglicher Interaktionspartner von pAK7 mittels des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems war kein Erfolg beschieden.
10. Die Ergebnisse der Anwendung dieser diversen Methoden erlauben somit, pAK7 als ependymspezifisches Protein zu bezeichnen, das ausschließlich in kinocilientragenden Ependymzellen exprimiert wird. pAK7 kann daher als ein “marker“-Protein für diesen Zelltyp im Gehirn angesehen werden.
11. Die physiologische Funktion von pAK7 konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Zukünftige Untersuchungen unter Verwendung von RNAi oder morpholino-substituierten Oligonucleotiden sollten Aufschlüsse über die Bedeutung des Proteins ergeben, beispielweise bei der Erzeugung des Cilienschlags.

Auflistung der Akademischen Lehrer

Prof. Dr. H.P.T. Ammon	Pharmakologie
Dr. C. Beyer	Pharmazeutische Analytik
Prof. Dr. G. Drews	Pharmakologie
Prof. Dr. G. Gauglitz	Physikalische Chemie
Prof. Dr. B. Hamprecht	Biochemie
Prof. Dr. L. Heide	Pharmazeutische Biologie
Prof. Dr. K.-A. Kovar	Pharmazeutische Analytik
Prof. Dr. S. Laufer	Pharmazeutische Chemie
Prof. Dr. E. Lindner	Chemie
Dr. E. Mechler	Pharmazeutische Biologie
Dr. H. Pommer	Mathematik
Prof. Dr. P. Ruth	Pharmakologie
Dr. H. Safayhi	Pharmakologie
Prof. Dr. P.C. Schmidt	Pharmazeutische Technologie
Prof. Dr. J. E. Schultz	Pharmazeutische Biochemie
PD Dr. S. Verleysdonk	Biochemie
PD Dr. K. Wagner	Pharmazeutische Technologie
Prof. Dr. M.A. Wahl	Pharmazeutische Technologie
Prof. Dr. A. Wankmüller	Terminologie
Dr. W. Zimmermann	Pharmazeutische Chemie

(alle Universität Tübingen)