

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Chemikerin
Susanne Schippling
aus Köln

Tag der mündlichen Prüfung: 1.12.2000

**Funktionelle Analyse von Dendrin:
Zellbiologische Untersuchungen und Inaktivierung des
Dendrin-Gens der Maus**

Gutachter: Prof. Dr. Peter H. Seeburg
Prof. Dr. Irmgard Sinning

Erklärung

Ich erkläre hiermit, daß ich die vorliegende Dissertation selbst verfaßt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Desweiteren erkläre ich hiermit, daß ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt, beziehungsweise die Dissertation in dieser oder anderen Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder an einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Heidelberg, den 11. September, 2000

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Peter H. Seeburg möchte ich mich für die interessante Themenstellung, die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen, sowie für seine hervorragende Unterstützung und engagierte Betreuung meiner Arbeit bedanken.

Frau Prof. Dr. Irmgard Sinning danke ich für ihre freundliche Bereitschaft, meine Arbeit zu begutachten.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Peter Mundel für sein Interesse an meiner Arbeit, für zahlreiche Ideen und Anregungen, sowie für die Möglichkeit, einen Teil meiner Experimente in seinem Labor durchführen zu dürfen.

Frau Dr. Miyoko Higuchi danke ich für viele wertvolle Anregungen und Ratschläge bei der Durchführung von Experimenten und für ihre stetige Hilfsbereitschaft.

Bei Herrn Dr. Frank Single bedanke ich mich für die praktische Einführung in die Stammzell-Kultivierung.

Herrn Frank Zimmermann danke ich für die exzellente Durchführung der Blastozysteninjektionen.

Bei Frau Ulla Amtmann bedanke ich mich für die hervorragende Durchführung der in-situ-Hybridisierungen.

Weiterhin bedanke ich mich bei Dr. Karin Schwarz, Jesse Lafreniere und Michael Cammer von Albert Einstein College of Medicine in New York für die praktische Einführung in die Methoden der Zellbiologie, sowie bei Dr. Sophie Chanabis für ihre Hilfsbereitschaft.

Mein Dank gilt ferner allen Mitarbeitern des Max-Planck-Instituts für medizinische Forschung in Heidelberg, die durch ihre professionelle Unterstützung und Hilfsbereitschaft zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1.	Dendritische Transportprozesse.....	1
1.1.1.	Proteintransport.....	1
1.1.2.	mRNS Transport.....	3
1.2.	Das Protein Dendrin.....	7
2.	Material und Methoden.....	10
2.1.	Kultivierung und Lipofektion von eukaryontischen Zelllinien.....	10
2.2.	Kultivierung und Lipofektion von hippokampalen Primärkultur-Neuronen.....	11
2.3.	<i>Time-lapse</i>-Mikroskopie.....	11
2.4.	Immunzytochemie transfizierter eukaryontischer Zelllinien.....	12
2.5.	Zerstörung des mikrotubulären Netzwerks durch Nocodazol.....	13
2.6.	Kultur, Transformation und Selektion von ES-Zellen.....	13
2.7.	Protein-Extraktion und Western Blots.....	14
2.8.	Molekularbiologische, zellbiologische und transgene Methoden.....	15
2.9.	Serviceleistungen.....	16
2.9.1.	Oligonukleotidsynthese.....	16
2.9.2.	Herstellung transgener Mäuse.....	16
2.9.3.	Haltung der transgenen Mäuse.....	16
2.9.4.	DNS-Sequenzierung.....	16
2.10.	Computerprogramme.....	16
3.	Ergebnisse	
3.1.	Zellbiologische Charakterisierung Dendrins.....	17
3.1.1.	Expression von EGFP-Dendrin Fusionsproteinen in diversen eukaryontischen Zelllinien.....	17
3.1.2.	Dendrin besitzt ein funktionelles "Nuclear Targeting Signal" (NLS).....	23

3.1.3.	Dendrin und Myopodin zeigen eine unterschiedliche intrazelluläre Verteilung.....	27
3.1.4.	Die EGFP-Dendrin-Vesikel bewegen sich in Fibroblasten in anterograder Richtung.....	29
3.1.5.	Die Bewegung der EGFP-Dendrin-Vesikel ist Mikrotubuli-abhängig.....	31
3.1.6.	Die EGFP-Dendrin-Vesikel kolokalisieren mit dem Motorprotein Dynein in Fibroblasten.....	37
3.1.7.	Expression des EGFP-Dendrin Fusionsproteins in hippokampalen Primärkultur-Neuronen der Ratte.....	43
3.2.	Inaktivierung des Dendrin-Gens durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen der Maus.....	45
3.2.1.	Isolierung des Dendrin-Gens.....	45
3.2.2.	Ermittlung der Exon/Intron-Struktur und Kartierung des Dendrin-Locus.....	45
3.2.3.	Aufbau des "Targeting-Vektors".....	46
3.2.4.	Klonierung des "Targeting-Vektors".....	48
3.2.5.	Homologe Rekombination	50
3.2.6.	Cre-Rekombination in einem homolog rekombinierten ES-Zellklon.....	56
3.2.7.	Etablierung der transgenen Mauslinien.....	60
3.3.	Bestimmung des Expressionsniveaus des rekombinanten Allels in heterozygoten Mäusen der 3Lox-Linie.....	62
3.4.	Vorläufige Analyse des Dendrin-defizienten Phänotyps.....	63
3.4.1.	Dendrin-RNS-Analyse.....	63
3.4.2.	Analyse des funktionellen Zusammenhangs zwischen Dendrin und Synaptopodin.....	68
4.	Diskussion.....	72
4.1.	Identifizierung eines funktionellen NLS am N-Terminus Dendrins.....	72
4.2.	Analyse des vesikulären Proteintransports Dendrins zwischen Soma und Zellperipherie.....	74
4.3.	Dendrin-"knock-out"-Mäuse.....	78
5.	Zusammenfassung.....	81
6.	Anhang.....	83
6.1.	Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der Dendrin cDNS der Ratte.....	83

6.2.	Abkürzungsverzeichnis.....	86
6.3.	Liste der verwendeten Oligonukleotide.....	87
7.	Literatur.....	89

1. Einleitung

1.1. Dendritische Transportprozesse

Das menschliche Gehirn ist ein Organ höchster Komplexität. Die Basiseinheit dafür stellen die Nervenzellen (Neuronen) und Gliazellen dar. Vorsichtige Schätzungen gehen von bis zu 10^{11} Neuronen aus, die sich eventuell in bis zu 10.000 verschiedene Typen einteilen lassen. Diese so enorm ausgeprägte Heterogenität beginnt schon mit der Nervenzelle, da ein typisches Neuron vier morphologisch definierte Bereiche aufweist: den Zellkörper (auch Soma genannt, bestehend aus Zellkern und Perikaryon), Dendriten, ein Axon und präsynaptische Nervenendigungen (Craig and Banker, 1994). Die Ausbildung und Aufrechterhaltung dieser Asymmetrie (auch Polarisierung genannt) gewährleistet damit so wichtige Prozesse wie gerichtete Reizweiterleitung, Informationsverarbeitung und in letzter Konsequenz unser Verhalten. Auf molekularer Ebene wird die Polarisierung der Zelle durch eine asymmetrische Verteilung von einigen Schlüsselproteinen in der Zelle verursacht und aufrecht erhalten und diese bedarf spezieller, sehr effizienter Mechanismen der Sortierung.

Besonders die Sortierungsmechanismen der empfangenden (dendritischen) Seite der Synapse sind seit kurzem in das Zentrum des wissenschaftlichen Interesses gerückt, da eine Modulation einzelner Synapsen durch einige Schlüsselproteine eventuell eine Form der molekularen Langzeitspeicherung an der Synapse darstellen könnte.

1.1.1. Proteintransport

Zahlreiche membranumhüllte Organellen wie Lysosomen, Endosomen und Mitochondrien, aber auch lösliche und membranständige Proteine in Transportvesikeln werden zwischen dem Soma und den Neuriten transportiert (Kaether und Kiebler, 1999). Die Bewegung dieser Vesikel kann einmal in anterograder Richtung (also zur Zellperipherie) erfolgen; so muß z.B. ein neusynthetisierter Ionenkanal vom Golgiapparat im Soma zu einem dendritischen Fortsatz gebracht werden. Daneben existiert ein retrograder vesikulärer Transport (zum Zellkörper), bei dem beispielsweise Proteine zu Abbaukompartimenten transportiert werden. In Axonen wie in Dendriten findet also eine Vielzahl von gegenläufigen Transportvorgängen auf engstem Raum statt.

Aufgrund ihrer leichteren experimentellen Zugänglichkeit wurden bisher hauptsächlich axonale Transportvorgänge näher untersucht. In einer Vielzahl von videomikroskopischen Studien wurden, oft an Riesenaxonen von Tintenfischen, Vesikel sowie größere Organellen wie Mitochondrien beobachtet und ihre

Geschwindigkeit gemessen. Diese bewegen sich dabei in beiden Richtungen entlang von Axonen mit Geschwindigkeiten von bis zu 5 $\mu\text{m/s}$, was als "schneller axonaler Transport" bezeichnet wird (Allen et al., 1982). Neben dem schnellen Transport gibt es den "langsamen axoplasmatischen Transport", bei dem zytosolische Proteine, Bausteine des Zytoskeletts und andere Strukturen mit einer Geschwindigkeit von 0,05-0,7 $\mu\text{m/s}$ bewegt werden. Weitere Untersuchungen des schnellen axonalen Transports ergaben, daß dieser entlang von Mikrotubuli verläuft, die in Axonen alle parallel mit ihrem Minusende in Richtung Zellkörper liegen (Kreis et al., 1989 und Morris et al., 1995). Kurze Zeit später wurden die Proteine identifiziert, die diesen Transport vermitteln. Bei diesen Proteinen handelt es sich um richtungsspezifische molekulare Motoren, die unter ATP-Verbrauch Fracht entlang der polarisierten Mikrotubuli transportieren. Kinesin ist der Motor, der in Richtung Plusende (also im Axon anterograd, Vale et al., 1985), Dynein der in Richtung Minusende (also im Axon retrograd, Hirokawa, 1997; Hirokawa, 1998) transportiert. Mittlererweile ist auch eine ganze Familie von kinesinähnlichen Motorproteinen, die KIFs, kloniert (Okada et al., 1995), ebenso wie eine Familie von Dyneinen und Motor-assoziierte Proteine (Hirokawa et al., 1998).

Bei den entsprechenden Protein-Transportprozessen in Dendriten sind bisher weder mechanistische Daten über Geschwindigkeiten noch daran beteiligte Motorproteine bekannt. Erste Studien zeigen, daß der Transport wie in Axonen Mikrotubuli-abhängig ist (Kiebler et al., 1999). Da in proximalen Dendriten die Mikrotubuli in beiden Orientierungen ausgerichtet sind (Burack et al., 2000), kommen für den anterograden Transport sowohl plusend- als auch minusendgerichtete Motoren in Frage, von denen aber keiner bisher identifiziert werden konnte. Möglicherweise ist die für die korrekte Zustellung der Vesikel nötige Maschinerie in Dendriten weitaus komplizierter als im Axon: da Dendriten viel verzweigter und in ihrem Feinbau heterogener sind, und eventuell Synapsen verschiedenen Transmittertyps besitzen, stellt sich die Frage, wie beispielsweise ein Glutamatrezeptor seinen Bestimmungsort in den weitverzweigten Dendriten findet, ohne an einer glyzinerigen Synapse zu landen. Werden verschiedene Proteine sortiert und in verschiedene Transportvesikel mit individuellen Adressenkodes verpackt, die sie an allen Verzweigungen der Dendriten richtig abbiegen lassen, bis sie ihre postsynaptische Bestimmung erreicht haben? Oder werden z.B. Membranproteine gemeinsam transportiert und irgendwo gemeinsam in die dendritische Plasmamembran inseriert? Dort könnten sie anschließend lateral in der Membran diffundieren und an ihren postsynaptischen Bestimmungsorten mit Hilfe des Zytoskeletts und spezieller Bindungsproteine konzentriert werden.

Seit ein paar Jahren sind Fusionsproteine mit dem Grün Fluoreszierenden Protein (GFP) ein weit verbreitetes Werkzeug der Zellbiologie geworden. Die Arbeitsgruppe um N. Hirokawa benutzte erstmalig GFP, um neuronale Membranproteine in Axonen

sichtbar zu machen und den Transport zu charakterisieren (Nakata et al., 1998). So wurde z.B. gezeigt, daß Proteine wie Synaptophysin, ein synaptisches Vesikelprotein, GAP 43, ein membranassoziertes Protein, SNAP-25, ein für die Fusion synaptischer Vesikel wichtiges Protein, und TrkA, ein Rezeptor für einen Nervenwachstumsfaktor, in tubulär-vesikulären Strukturen entlang von Axonen transportiert werden. Es ist zu erwarten, daß die Markierung von dendritisch lokalisierten Proteinen mit GFP bei der Aufklärung des dendritischen Protein-Transports eine wichtige Rolle spielen wird. In jüngster Zeit wurden Farbmутanten des GFP entwickelt, die es ermöglichen sollten, mehrere verschiedene Proteine unterschiedlich zu markieren und simultan zu beobachten, wie sie unterschiedlich sortiert und zu ihren individuellen Bestimmungsorten gebracht werden (Ellenberg et al., 1999 und Pepperkok et al., 1999).

1.1.2. mRNS Transport

Neben Proteinen werden auch einige spezielle mRNS-Moleküle in die Dendriten transportiert. Bahnbrechende Studien von Oswald Steward demonstrierten bereits vor fast 20 Jahren, daß in Neuronen des zentralen Nervensystems (ZNS) sowohl das endoplasmatische Retikulum (Steward und Reeves, 1988) wie auch die Translationmaschinerie, bestehend aus Polyribosomen (Steward und Levy, 1982), in Dendriten und speziell in der Nähe postsynaptischer "Dornen" ("spines") zu finden sind. In der Folge konnte auch von anderen Labors gezeigt werden, daß einige mRNS-Moleküle nicht nur im Soma, sondern tatsächlich auch in Dendriten vorkommen, wie z.B. die mRNS von Arc (Link et al., 1995 and Lyford et al., 1995), die der α -Untereinheit der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Kinase II (CaMKII; Burgin et al., 1990), die mRNS von MAP2 (Garner et al., 1988), GAP 43 (Landry et al., 1994), L7 (Bian et al., 1996), der Glyzinrezeptoren α_1 und α_2 (Racca et al., 1997), die mRNS des Neurotrophins BDNF und seines Rezeptors TrkB (Tongiorgi et al., 1997), die nicht-kodierende RNS BC1 (Muslimov et al., 1997) und die mRNS Dendrins (Herb et al., 1997; Neuner-Jehle et al., 1996). Es erscheint auf den ersten Blick unökonomisch, einige wenige mRNS-Moleküle in Dendriten zu senden und dort eventuell direkt an der Synapse mit der dort vorhandenen Translationsmaschinerie in Proteine zu translatieren. Eine zur Zeit stark favorisierte Interpretation dieses komplizierten Mechanismus wäre allerdings, daß die -möglicherweise als Antwort auf einen extrazellulären Stimulus- lokal neu hergestellten Proteine eine wichtige Rolle bei der Modulation einzelner Synapsen spielen könnten. Es wäre denkbar, daß solche orts- und stimulusabhängigen Modulationen eine Form der Langzeitspeicherung von Informationen an der Synapse repräsentieren und somit ein Modell für Gedächtnisbildung und Erinnerung darstellen könnten (Ouyang et al., 1997; Ouyang et al., 1999).

In der letzten Zeit war der Mechanismus der mRNS-Lokalisierung in Dendriten Gegenstand vieler Studien: handelt es sich hierbei um einen aktiven, gerichteten und zeitlich sowie lokal regulierten Prozeß oder um eine passive zytoplasmatische Strömung? Erste experimentelle Hinweise auf Lokalisierungssignale in dendritischen mRNS-Molekülen sprechen eher für einen aktiven Transport als für einen passiven Prozeß. Diese sogenannten cis-agierenden Signale ("Postleitzahlen" oder "zipcodes", Oleynikov und Singer, 1998), die für die Lokalisierung in bestimmte Regionen der Zelle verantwortlich sind, befinden sich häufig in der 3'-untranslatierten Region (3'UTR) der mRNS, wie z.B. bei α -CaMKII (Mayford et al, 1996) und bei MAP-2 (Blichenberg et al, 1999). Darüberhinaus sind in den 3'UTRs zahlreicher lokalisierter, nicht neuronaler mRNAs cis-agierende Lokalisierungssignale identifiziert worden, wie in *bicoid*, *oskar*, *nanos* (alle in *Drosophila*; Macdonald, 1990), *Vg1*, *Xcat2*, *VetT* (alle in *Xenopus*; Forristall et al., 1995; Kloc et al., 1995), β -Aktin (in Säuger-Fibroblasten; Kislauskis et al.; 1994) und MBP (in Maus-Oligodendrocyten; Ainger et al., 1997; Carson et al., 1998).

Im Gegensatz dazu ist in der nicht kodierenden RNA BC1 das 62 Nukleotide lange 5'-Ende für die Lokalisierung in Dendriten verantwortlich (Muslimov et al., 1997).

In vielen Fällen handelt es sich bei diesen Lokalisierungssignalen nicht um ein einfaches Sequenzmotiv in der Primärstruktur der mRNA, sondern um mehrfach vorkommende Elemente mit komplizierten Sekundärstrukturen, die oft mit Signalen überlappen, die die Translation dieser mRNAs regulieren.

Doch welche Proteine erkennen nun diese cis-agierenden Signale und sind eventuell für den Transport der lokalisierten mRNS-Moleküle verantwortlich?

Mittlererweile sind zahlreiche RNS-bindende Proteine in nicht-neuronalen Zellen identifiziert und deren Rolle bei der RNS-Lokalisierung charakterisiert worden.

Einige besonders gut charakterisierte Beispiele für RNS-Transportproteine oder sogenannte Trans-Faktoren spielen signifikante Rollen während der späten Oogenese und der frühen Embryonalentwicklung der Taufliege *Drosophila*. So führt z.B. eine Mutation in einem Protein namens *Staufen* zur Mißlokalisierung der *bicoid* mRNS und der *oskar* mRNS und infolgedessen zur fehlerhaften Kopf- und Schwanzentwicklung des Embryos (St Johnston, 1991). Das RNS-bindende Protein *Staufen* ist nämlich für die Fixierung der *bicoid* mRNS am künftigen Kopfe und für die Lokalisation zahlreicher mRNS-Moleküle, wie z.B. der *oskar* mRNS an das künftige Schwanzende zuständig. *Staufen* bindet dabei direkt an seine Ziel-mRNS-Moleküle und transportiert diese in Form von sogenannten Ribonukleoproteinpartikeln (RNPs) entlang der polarisierten Mikrotubuli (Ferrandon et al., 1994). Zudem ist *Staufen* nicht nur am Transport, sondern auch an der Translationskontrolle zumindest von *oskar* mRNS beteiligt, indem es eine Translation von *oskar* mRNS nur am künftigen Schwanzende zuläßt (Macdonald et al., 1996).

Aber auch in Oligodendrocyten konnte mit dem heterogenen nuklearen Ribonukleoprotein A2 (hnRNP A2) der Trans-Faktor identifiziert werden, der für die Lokalisation der mRNA des Myelin-basischen Proteins (MBP) in die peripheren Zellausläufer, in denen die Myelinisierung stattfindet, verantwortlich ist (Hoek et al., 1988; Krecic et al., 1999; Carson et al., 1998). HnRNP A2, ein überwiegend im Zellkern anzutreffendes Protein, könnte dabei MBP-mRNA schon im Kern binden, wo sie in RNPs verpackt wird; diese wären dann für den Transport, die korrekte Lokalisierung und eventuell sogar für die Translation der MBP-mRNA verantwortlich. Die Hypothese, daß RNPs nicht nur für die Lokalisation, sondern auch für die Translation der transportierten mRNA-Moleküle zuständig sein könnten, wird dadurch gestützt, daß bisher verschiedene Typen von RNPs identifiziert werden konnten, die zum Teil Komponenten wie Aminoacyl-tRNA-Synthasen, Elongationsfaktoren und sogar Polyribosomen enthielten (Barbarese et al., 1995).

Auch in *Xenopus* wurde mit dem Vg1 mRNA Lokalisierungselement-bindende Protein mit 60 kD (VgRBP60) der Trans-Faktor gefunden, der das Lokalisierungselement der Vg1-mRNA bindet (Yisraeli et al., 1990). VgRBP60 gehört ebenfalls in die Klasse der hnRNP1-Familie. Somit handelt es sich offensichtlich um ein generell gültiges Prinzip, das die initialen Schritte der mRNA-Lokalisierung bereits im Kern mit der Assemblierung der mRNA-Transportkomplexe stattfinden.

Auch bei der Identifikation von mRNA-bindenden Trans-Faktoren in Neuronen wurden in der letzten Zeit einige Fortschritte gemacht. So wurde z.B. eine neuronale Isoform des Zipcode-bindenden Proteins ZBP-2 (95 kDa) identifiziert, das wie sein aus Hühnerfibroblasten isoliertes Homologes, das ZBP-1 (65 kDa), ein Lokalisierungselement der β -Aktin mRNA bindet (Ross et al., 1997). Diese β -Aktin mRNA wird ebenfalls in RNPs verpackt und in dendritische wie auch axonale Wachstumskegel ("*growth cones*") versandt. Die Proteine der ZBP-Familie enthalten fünf RNS-bindende Domänen, eine vom Typ RRM (RNA-Recognition Motif) und vier KH-Domänen (Deshler et al., 1998; Havin et al., 1998). Zusätzlich findet man Kernexport- sowie auch Kernimportsignale in dessen Sequenz. Die Analyse der Abhängigkeit der ZBP-enthaltenden RNPs von den verschiedenen Komponenten des Zytoskeletts ist bislang widersprüchlich: während die Lokalisierung der β -Aktin mRNA durch ZBP-1 in Hühnerfibroblasten Aktin-abhängig erfolgt (Sundell et al., 1991), ist der analoge Prozess der β -Aktin mRNA-Lokalisation durch ZBP-2 in Neuronen -wie auch die meisten anderen Beispiele der mRNA-Lokalisierung-Mikrotubuli-abhängig (Bassell et al., 1994).

Als weiteres Beispiel für einen neuronal exprimierten Trans-Faktor wurde kürzlich ein menschliches Homolog von Staufin in HeLa-Zellen entdeckt (Wickham et al., 1999). Da die erste doppelsträngige RNS-bindende Domäne im Vergleich zum *Drosophila*-Homolog deletiert zu sein scheint, wie auch einige der zwischen diesen Domänen liegenden Sequenzen, ist das Säugerhomolog im Gegensatz zu Staufin aus

Drosophila nur noch 63 kDa groß. Das Säuger-Staufen hat die Fähigkeit, in vitro doppelsträngige RNS sowie Tubulin zu binden. Mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers konnte zudem gezeigt werden, daß sich Staufen in Säugerzellen am rauhen endoplasmatischen Retikulum (RER) befindet und biochemisch mit Polyribosomen fraktioniert. In hippokampalen Neuronen ist Staufen im Zellkörper und in Dendriten, nicht jedoch in Axonen zu finden. Eine ähnliche Verteilung im Soma und in Dendriten, aber nicht in Axonen konnte für Polyribosomen, ER und einige spezifische mRNS-Moleküle beobachtet werden (Steward und Levy, 1982; Steward und Reeves, 1988). Mittels Licht- und Elektronenmikroskopie konnte weiterhin gezeigt werden, daß Staufen in relativ großen Partikeln in Neuronen am ER und an polarisierte Mikrotubuli in Dendriten gebunden vorliegt (Marión et al., 1999). Bei diesen Partikeln handelt es sich voraussichtlich um RNPs, da sie neben Staufen auch mRNS enthalten, die durch den RNS-spezifischen Farbstoff SYTO-14 (Knowles et al., 1996) sichtbar gemacht wurde. Experimente, in denen Staufen als grün-fluoreszierendes GFP-Staufen-Fusionsprotein in Neuronen exprimiert wurde, zeigten, daß Staufen im Soma in diskreten Partikeln vorliegt (Köhrmann et al., 1999). Die meisten dieser Partikel befanden sich stationär um den Zellkern herum, einige andere jedoch bewegten sich in anterograder Richtung zu den Dendriten. Diese gerichtete, saltatorische Bewegung ließ sich durch Drogen inhibieren, die die Mikrotubuli der Zelle depolymerisieren. Leider war es jedoch bisher nicht möglich, herauszufinden, welche cis-agierenden Elemente der dendritisch lokalisierten RNS-Molekülen in Neuronen durch das humane Staufen erkannt werden, da Staufen in vitro jegliche doppelsträngige RNS bindet.

Die Identifizierung neuer dendritisch lokalisierter mRNS-Moleküle und ihrer Trans-Faktoren eröffnet die Möglichkeit, den Mechanismus und die Funktion der mRNS-Lokalisierung in Neuronen detaillierter zu analysieren. Nach den bisherigen Kenntnissen könnte nach der initialen Erkennung der lokalisierten mRNS-Moleküle, die möglicherweise im Kern stattfindet, eine Assemblierung der mRNS in RNPs im Zellkern erfolgen; diese würden als Transportkomplexe fungieren, um die darin enthaltenden mRNS-Moleküle an ihren Zielort in der dendritischen Zellperipherie zu senden. Nach ihrer erfolgreichen Lokalisation an ihre dendritischen -oder zum Teil synaptischen- Zielorte könnten diese RNS-Moleküle lokal und vermutlich stimulus-induziert translatiert werden und so zu einer örtlich und zeitlich exakt definierten Produktion von Schlüsselproteinen beitragen (Bailey et al., 1995; Elgersma et al., 1999; Frey und Morris, 1997; Schuman, 1999). Diese attraktive Hypothese wird gestützt durch die subsynaptische Präsenz von Polyribosomen und des endoplasmatischen Retikulums in Neuronen des ZNS, sowie auch durch die Anwesenheit von Elongationsfaktoren (EF1a), Aminoacyl-tRNS-Synthasen und Polyribosomen in einigen RNPs (Barbarese et al., 1995).

1.1.3. Das Protein Dendrin

Im Jahre 1990 nutzte J. Mallet ein differentielles cDNS-*Screening*-Protokoll zur Identifikation von Genen, deren Expression im Großhirn durch Schlafentzug induziert oder gedrosselt werden (Rhyner et al, 1990). Dabei konnten sechs Klone mit erhöhter Expression und fünf Klone mit reduzierter Expression nach Schlafentzug isoliert werden. Oligonukleotide, die mit den RNS-Molekülen dieser differentiell exprimierten Klone hybridisieren konnten, wurden hergestellt und als radioaktiv markierte Sonden für in-situ-Hybridisierungen von Hirnschnitten der Ratte eingesetzt. Für einen der Klone, deren Expression nach Schlafentzug zu 50% reduziert war, zeigte die in-situ-Hybridisierung ein besonders interessantes Expressionsmuster. Dieser Klon zeigte eine starke, auf Strukturen des Großhirns beschränkte Expression, vor allem im Neokortex, im Bulbus olfactorius, im Hippokampus, im Putamen und dem limbischen System (Herb et al., 1997 und Neuner-Jehle et al., 1996). In diesen Großhirn-Strukturen war die mRNA dieses Klons sowohl in den neuronalen Somata als auch in den Dendriten lokalisiert.

Die prominente dendritische Lokalisierung seiner mRNA gab dem Protein dieses Klons den Namen Dendrin. Besonders deutlich war die dendritische Lokalisation der Dendrin-mRNA im Hippokampus sichtbar: dort zeigte die Dendrin-mRNA eine besonders starke Expression in den Granulärzellen des Gyrus Dentatus, in deren dendritischen Schicht, der Stratum moleculare, in den CA1 Pyramidalzellen und in den dendritischen Schichten Stratum radiatum und Stratum oriens. Lediglich gering exprimiert war Dendrin hingegen in den CA3- und CA4-Regionen des Hippokampus. Mit diesem Expressionsmuster reihte sich Dendrin in die kleine Gruppe von Proteinen ein, deren mRNA-Moleküle in Neuronen dendritisch lokalisiert sind, möglicherweise lokal translatiert werden und daher Schlüsselfunktionen bei der Modulation von Synapsen, ihrer Ströme oder der Etablierung neuer synaptischer Verknüpfungen einnehmen könnten (siehe Kapitel 1.1.2.).

Aus diesem Grund wurde Dendrin Gegenstand neuer Untersuchungen. Eine Northern Blot-Analyse ließ vermuten, daß Dendrin hirnspezifisch exprimiert wird und zeigte eine Transkriptgröße für Dendrin von ca. 3,8 Kilobasen (kb). Schließlich wurde die gesamte, 3,6 kb umfassende cDNS Dendrins aus einer hippokampalen cDNS-Bank der Ratte isoliert und sequenziert (Herb et al., 1997; Neuner-Jehle et al., 1996). Das offene Leseraster der Nukleotidsequenz sagte für das Dendrin der Ratte ein 707 Aminosäuren langes Protein voraus. Dendrin ist ein hydrophiles, hochbasisches (Isoelektrischer Punkt ~11) und sehr prolinreiches Protein. Es umfaßt keine Signalsequenz und keine längeren hydrophoben Regionen, die es als membranständiges Protein auszeichnen würden. Ein Peptidantikörper, der gegen das Dendrin-Epitop der Aminosäuren 429 bis 447 hergestellt und affinitätsgereinigt worden war, zeigte in Immunfärbungen von Hirnschnitten, daß das Dendrin-Protein fast ausschließlich in dendritischen Schichten lokalisiert ist.

Um Interaktionspartner für Dendrin zu ermitteln, wurde ein "yeast two-hybrid screen" mit Dendrin als Köder ("*bait*") durchgeführt (T. Schulz, Diplomarbeit, 1997). Hierbei konnte einzig α -Aktinin als möglicher Interaktionspartner für Dendrin identifiziert werden.

Die Primärstruktur Dendrins zeigt keinerlei signifikante Homologien zu anderen Sequenzen der Datenbank. Dennoch gibt es ein Protein, das sogenannte Synaptopodin, das viele wichtige Eigenschaften mit Dendrin teilt (Mundel et al., 1997). Dendrin und Synaptopodin haben in etwa die gleiche Größe (Dendrin 707 Aminosäuren; Synaptopodin 685 Aminosäuren), beide sind stark basisch und sehr prolinreich, beide Gene umfassen eine ungewöhnlich geringe Anzahl an Introns (Dendrin: 1 Intron; Synaptopodin: kein Intron). Zudem zeigen in-situ-Hybridisierungen, daß beide Proteine im Gehirn in denselben Strukturen des Telencephalons exprimiert sind (im Hippokampus, Neokortex, Putamen, Bulbus olfactorius etc., nicht aber im Cerebellum). Weiterhin sind beide Proteine im Gehirn dendritisch lokalisiert, während allerdings die mRNA Synaptopodins nicht -wie die von Dendrin- dendritisch lokalisiert ist (Deller et al., 2000).

Neben seiner Expression im Gehirn ist Synaptopodin aber auch in der Niere exprimiert und dort vor allem in differenzierten Podozyten. Bei den Podozyten handelt es sich um hochspezialisierte Zellen des renalen Glomerulus, deren fußchenförmige Ausläufer eine wichtige Rolle bei der Filtration des Primärharns spielen. Mittels RT-PCR konnte gezeigt werden, daß offensichtlich auch Dendrin in geringem Maße in der Niere und in Podozyten exprimiert ist (unveröffentlichte Daten). Weiterhin konnten in den Aminosäuresequenzen von Dendrin und Synaptopodin sogenannte PPXY-Motive identifiziert werden, die häufig bei der Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen zwischen prolinreichen Proteinen und der in vielen Proteinen vorkommenden WW-Domäne eine Rolle spielen (Einbond und Sudol, 1996). Synaptopodin enthält zwei dieser PPXY-Motive (318 - 321 und 337 - 340), Dendrin enthält drei PPXY-Motive (201 - 204, 220 - 223, 226 - 229).

Da außerdem Synaptopodin als Aktin-bindendes Protein charakterisiert wurde und für Dendrin das Aktin-bindende α -Aktinin als möglicher Interaktionspartner identifiziert worden war, war ein funktionaler Zusammenhang zwischen diesen beiden ähnlichen Proteinen nicht auszuschließen.

Alle bis dahin zusammengetragenen Informationen über Dendrin sprachen dafür, daß es sich bei Dendrin um eines der Schlüsselproteine handeln könnte, das möglicherweise in Dendriten subsynaptisch translatiert werden könnte, um so zu synaptischen Modulationen beizutragen. Das wichtigste Argument für diese These war die in in-situ Hybridisierungen demonstrierte Präsenz der Dendrin mRNA in Dendriten. Auch die starke Expression Dendrins in Großhirn-Strukturen, wie z.B. im Hippokampus, der bekanntlich eine wichtige Rolle für das Lernen und die Gedächtnisbildung spielt, bestärkte diese These. Weitere Bestätigung erhielt die

Theorie durch die immunozytochemisch nachgewiesene Anwesenheit des Dendrin Proteins in Dendriten.

Die Gegenwart der Dendrin mRNA in dendritischen Schichten legte außerdem die Existenz eines aktiven, eventuell Mikrotubuli-abhängigen mRNA-Transports mit cis-agierenden Sequenzen in der Dendrin mRNA und einem spezifischen Trans-Faktor nahe (siehe Kapitel 1.1.2.). Ob jedoch neben dem mRNA-Transport und der anschließenden möglichen lokalen Translation der mRNA auch ein aktiver Transport des Dendrin Proteins in Dendriten stattfindet (siehe Kapitel 1.1.1.), war bis dahin noch nicht untersucht worden. Um diese Frage zu beantworten, bot es sich an, GFP-Dendrin-Fusionsproteine in kultivierten eukaryontischen Zelllinien oder idealerweise in neuronalen Primärkulturen zu exprimieren, weil dadurch ein eventueller dynamischer Transportprozess des GFP-markierten Dendrins in vivo über längere Zeit beobachtet und durch zytotoxische Reagenzien (wie z.B. Nocodazol) manipuliert und näher charakterisiert werden konnte. Im Gegensatz dazu sind immunchemische Experimente zur Aufklärung dynamischer Prozesse, wie dem Proteintransport, weniger geeignet, da hier lediglich die intrazelluläre Verteilung eines Proteins zu einem bestimmten Zeitpunkt konserviert, nicht aber in vivo über einen längeren Zeitraum verfolgt werden kann.

Eine weitere Möglichkeit, die Funktion und die physiologische Relevanz Dendrins einzuschätzen, bietet die Herstellung einer sogenannten "*knock-out*"-Maus (Capecchi et al., 1989). Die Inaktivierung des Dendrin-Gens durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen der Maus und die Analyse der physiologischen Defekte und Auffälligkeiten der daraus hervorgehenden "*knock-out*"-Mäuse könnte unter Umständen funktionelle Informationen über Dendrin liefern.

2. Material und Methoden

2.1. Kultivierung und Lipofektion von eukaryontischen Zelllinien

Zur Expression der EGFP-Dendrin-Fusionsproteine (Expressionsvektor *pEGFP-C1* (Clontech)) dienen die eukaryontischen Zelllinien NIH3T3, C2C12, Podozyten und MDCK-Zellen, deren Kultivierungsbedingungen in der folgenden Tabelle zusammengefaßt werden.

Name der Zelllinie	Ursprung/Typ der Zelllinie	Bedingungen der Kultivierung
NIH3T3	Fibroblasten	Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) mit 4 mM L-Glutamin, 1,0 mM Natriumpyruvat, 1,5 g/l Natriumbicarbonat, 10% fötales Kälberserum (FBS).
C2C12	Myoblasten (Bildungszellen für die Muskelfasern)	Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) mit 4 mM L-Glutamin, 1,0 mM Natriumpyruvat, 1,5 g/l Natriumbicarbonat, 10% fötales Kälberserum (FBS).
Podozyten (Mundel, 1997)	Zellen des renalen Glomerulus (immortalisierte Maus-Zelllinie)	RPMI 1640- Medium mit L-Glutamin (Gibco) mit 1% Penicillin-Streptomycin und 10% fötalem Kälberserum (FBS). Vor Gebrauch werden die Kulturschalen mit 0,1 mg/ml Kollagen A (Biochrom KG) für 60 min beschichtet. Nach dem Entfernen der Kollagen-Lösung und einem Waschschrift mit sterilem PBS wird die Kulturschale für 60 min bei 37°C getrocknet.
MDCK	Epitelzellen (Madin Darby Canine Kidney Cells)	Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) mit 2 mM L-Glutamin, 1,0 mM Natriumpyruvat, 1,5 g/l Natriumbicarbonat, 10% fötales Kälberserum (FBS).

Die Zellen der Linien NIH3T3, C2C12 und MDCK wurden bei 37°C und Podozyten bei 33°C kultiviert bis die Konfluenz der Zellen zwischen 60 und 80% lag. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen mit den verschiedenen EGFP-Dendrin-Fusionskonstrukten durch Lipofektion mit Hilfe des *GenePORTER Transfection Reagent* (Gene Therapy Systems) transfiziert. Hierzu wurden 7 µg der DNS in 1 ml

serumfreiem Kulturmedium der entsprechenden Zelllinie und 35 µl des *GenePORTER* Reagenzes in ebenfalls 1 ml serumfreiem Kulturmedium verdünnt. Anschließend wurde die verdünnte DNS zu dem verdünnten *GenePORTER* Reagenz hinzugefügt, durchmischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde das Kulturmedium der zu transfizierenden Zellen entfernt und durch das DNS/*GenePORTER*-Gemisch ersetzt. Nach einer 5stündigen Inkubation bei 37°C wurde den transfizierten Zellen 2 ml Kulturmedium mit 20% fötalem Kälberserum hinzugefügt, um die normalen Kulturbedingungen wieder herzustellen. Etwa 24 Stunden nach der Transfektion konnte die Expression der Fusionsproteine durch die Fluoreszenz EGFPs beobachtet und ausgewertet werden.

2.2. Kultivierung und Lipofektion von hippokampalen Primärkultur-Neuronen

Hippokampale Neuronen wurden von Ratten-Embryonen am 18. Tag der Embryonalentwicklung (E18) gewonnen.

Eine 11tägige Kultivierungsphase ermöglichte die Ausbildung weitverzweigter Neuriten durch Differenzierung. Anschließend wurden die primärkultivierten hippokampalen Neuronen mit Hilfe des Lipofektionsagens *Superfect* (*Qiagen*) transfiziert.

2.3. Time-lapse-Mikroskopie

Fibroblasten der Linie NIH3T3 wurden auf spezielle 6 cm-Kulturschalen mit einem in der Mitte der Schale fixierten Deckgläschen ausplattiert und bis zur 60 bis 80 %igen Konfluenz der Zellen bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Kulturschale mit dem zentralen Deckgläschen war zuvor mit 0,1%iger Gelatine-Lösung beschichtet worden, um die Adhäsion der Fibroblasten auf dem Deckgläschen zu gewährleisten. Die zu 60 bis 80% konfluenten Zellen wurden mit dem Konstrukt *EGFP-Dendrin* mit dem *GenePORTER* Lipofektionsreagenz transfiziert (siehe Kapitel 2.1.). Am darauf folgenden Tag standen die transfizierten Zellen zur Beobachtung der fluoreszierenden dendrinhaltigen Vesikel mittels *time-lapse*-Mikroskopie zur Verfügung.

Während der etwa 1stündigen Beobachtung durch *time-lapse*-Mikroskopie wurden die transfizierten Fibroblasten in ihrem Kulturmedium belassen und durch einen auf 37°C beheizten Plexiglas-Aufbau auf dem Mikroskoptisch temperiert. Die mit Hilfe einer gekühlten CCD-Kamera (*Photometrics PCI Sensys KAF1400-G1*) und dem Mikroskop *Olympus IX70* ("infinity corrected optics") aufgenommenen Bilder (CCD2; 60* N.A. 1,4 oil; 1*eyepiece, 2*2 binning 990327) wurden anschließend auf einem *Macintosh G3* mit dem Programm *IP Lab Spectrum* einer Dekonvulierung unterzogen und zu Filmen zusammengeschnitten. Dekonvulierungs-Programme

liefern finale Bilder, deren X-, Y- und axiale Auflösungen denen von konfokalen Aufnahmen ähneln.

Diese Experimente wurden mit Hilfe von Herrn Michael Cammer an der digitalen Station #2 der *Analytical Imaging Facility* des Albert-Einstein-College of Medicine, New York durchgeführt. Weitere Informationen über die technische Ausstattung der digitalen Station #2 sind unter www.aecom.yu.edu/aif/instructions/ccd2 im Internet nachzulesen.

2.4. Immunzytochemie transfizierter eukaryontischer Zellen

Nach der Kultivierung eukaryontischer Zelllinien auf Deckgläschen und ihrer Lipofektion mit EGFP-Dendrin-Fusionskonstrukten mit *GenePORTER* wurden diese Deckgläser nach folgendem Protokoll mit verschiedenen Antikörpern (anti-Dynein oder anti-Kinesin) gefärbt.

Nach der Entfernung des Mediums aus der Kulturschale wurden die Zellen 5 Minuten lang mit einem auf Paraformaldehyd basierenden Fixierungspuffer inkubiert (2% Paraformaldehyd und 4% Sucrose in 1*PBS pH 7,5). Danach wurde der Fixierungspuffer gegen die Permeabilisierungslösung (0,3% Triton X-100 in 1*PBS) ausgetauscht und darin 10 Minuten inkubiert. Nach der Entfernung der Permeabilisierungslösung wurden die Deckgläschen 3 mal jeweils für 3 Minuten mit 1*PBS gewaschen. Die darauf folgenden Inkubationsschritte erfolgten in einer Feuchtkammer. Eine solche Feuchtkammer bestand aus einer flachen, bedeckten Schale, deren Boden von einem mit Wasser befeuchteten Filterpapier bedeckt war. Parafilm, der auf dem feuchten Filterpapier auflag, diente dabei als Unterlage für die Deckgläschen. Alle zu färbenden Deckgläschen wurden mit der Zellseite nach oben auf den Parafilm in der Feuchtkammer plaziert und für eine Stunde mit etwa 150 µl Blockierlösung pro Deckglas inkubiert (Blockierlösung: 2% fötales Kälberserum; 2% BSA; 0,2% Fisch-Gelatine in 1*PBS). Nach dem Abziehen der Blockierlösung mit der Wasserstrahlpumpe wurde der erste Antikörper in der Blockierlösung verdünnt (Maus-anti-Dynein (intermediate chain) IgM-Antikörper: 1:10-Verdünnung; Maus-anti-Kinesin IgM-Antikörper: 1:200-Verdünnung), auf die Deckgläser gegeben und eine Stunde inkubiert. Es folgten drei 3minütige Waschschrte mit 1*PBS und anschließend die 1stündige Inkubation in der Dunkelheit mit dem Zweitantikörper, einem Maus-anti-IgM-Antikörper, der mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff *cy3* gekoppelt war. Nach drei jeweils 3minütigen Waschschrten mit 1*PBS und zwei weiteren 3minütigen Waschschrten mit bidestilliertem Wasser zur Entfernung von auskristallisierenden Salzen wurden die Deckgläschen in Mowiol auf Objektträgern eingebettet und über Nacht bei 4°C getrocknet.

Phasenbilder und Fluoreszenzbilder des grünen EGFP-Dendrin-Fusionsproteins und der *cy3*-detektierten Dynein- bzw. Kinesin-Verteilung wurden mit einer gekühlten

CCD-Kamera (CCD2; 60* N.A. 1,4 oil; 1*eyepiece, 2*2 binning 990327) aufgenommen.

2.5. Zerstörung des mikrotubulären Netzwerks durch Nocodazol

Auf Deckgläsern kultivierte Fibroblasten der Linie NIH3T3 wurden mit dem Konstrukt *EGFP-Dendrin* durch Lipofektion mit dem *GenePORTER* Lipofektionsreagenz transfiziert. Am darauf folgenden Tag wurden drei Deckgläser mit transfizierten Zellen als unbehandelte Kontrollen fixiert und mit einer Fixierungslösung permeabilisiert, die Mikrotubuli-stabilisierende Eigenschaften besaß (0,1 M PIPES pH 6,9; 5 mM EGTA; 1 mM MgCl₂; 4% Polyethylenglykol 6000; 0,5% Triton-X100; 2% Paraformaldehyd; 4% Sucrose). Nach diesem speziellen Protokoll zur Fixierung und Permeabilisierung wurden die Zellen nach dem in Kapitel 2.4. beschriebenen Standardprotokoll für Immunozytochemie mit einem monoklonalen Maus-anti- α -Tubulin IgG-Antikörper in einer 1:150-Verdünnung gefärbt. Als Zweitantikörper diente hierbei ein anti-Maus IgG-Antikörper, der an den rot emittierenden Fluoreszenzfarbstoff *cy3* gekoppelt war und in einer 1:100-Verdünnung eingesetzt wurde.

Dem Kulturmedium der noch unfixierten transfizierten Zellen auf den restlichen Deckgläsern wurde Nocodazol in einer Konzentration von 10 μ M zugefügt. Nach einer zweistündigen Inkubation mit Nocodazol-haltigem Medium bei 37°C wurden wiederum drei Deckgläser entnommen, mit der Mikrotubuli-stabilisierenden Fixierungslösung fixiert, permeabilisiert und mit dem monoklonalen anti- α -Tubulin IgG-Antikörper und dem entsprechenden Sekundärantikörper gefärbt. Von den übrigen Deckgläsern wurde das Nocodazol-haltige Medium zur Rückbildung des mikrotubulären Netzwerkes entfernt und verbleibendes Nocodazol wurde durch mehrmaliges Spülen mit normalen Kulturmedium ausgewaschen. Nach einer zwei- bzw. zwanzigstündigen Erholungsphase bei 37°C wurden wieder jeweils drei Deckgläser entnommen, nach den oben beschriebenen Protokollen fixiert, permeabilisiert und mit anti- α -Tubulin IgG-Antikörper und dem Sekundärantikörper gefärbt. Bilder des grün fluoreszierenden EGFP-Dendrin-Fusionsproteins und der rot fluoreszierenden α -Tubulin-Färbung wurden mit einer gekühlten CCD-Kamera (CCD2; 60* N.A. 1,4 oil; 1* eyepiece, 2*2 binning 990327) aufgenommen.

2.6. Kultur, Transformation und Selektion von ES-Zellen

Pluripotente embryonale Stammzellen (R1 ES-Zelllinie) der Maus wurden in ES-Zellmedium ("Dulbecco's modified Eagle medium" mit hohem Glukoseanteil, 2 mM Glutamin, 0,1 mM nicht essentiellen Aminosäuren, 1 mM Natriumpyruvat, 0,1 mM β -Mercaptoethanol, 20% fötalem Kälberserum, 50 μ g/ml Penicillin/Streptomycin, 1000

U/ml Leukämie Inhibitionsfaktor (LIF) kultiviert. Dies geschah entweder auf mitotisch inaktivierten (Mitomycin C) primären Maus-Fibroblasten oder auf mit Gelatine (0,1%) überzogenen Kulturplatten. Für die Transformation wurden die "gene targeting"-Vektoren zunächst durch einen KpnI-Restriktionsverdau linearisiert und nach Ethanolprecipitation in 75 µl PBS gelöst. Um eine Phenolisierung zu vermeiden, wurde die DNS über eine mit PBS umgepufferte Gelfiltrationssäule (Chroma-Spin TE-1000) aufgereinigt. Für die Elektroporation (BioRad Genepulser mit 500 µFD und 240 V) der vereinzelt ES-Zellen in einer PBS-Suspension wurden 40 µg des linearisierten "gene targeting"-Vektors eingesetzt. Die transformierten Zellen wurden für 8 bis 10 Tage mit G418 (250 mg/ml) selektiert. Resistente Klone wurden isoliert und zur Expansion auf Muldenplatten überführt. Ein Teil der Zellen wurde für die DNS-Analyse durch PCR verwendet, wobei jeweils 6 Einzelklone zur Analyse vereinigt wurden und positive Mischklone ("Pools") anschließend auf Einzelklonebene getestet wurden.

Für die *Cre*-Rekombination in den ES-Zellen wurden 10 µg ungeschnittenes *pMC-Cre*-Plasmid zur Elektroporation eingesetzt. Die isolierten ES-Zell-Kolonien wurden sowohl in Muldenplatten mit normalem Kulturmedium als auch in Muldenplatten mit G418-haltigem Medium übertragen. Kolonien, die aufgrund ihrer Expression der *Cre*-Rekombinase das *neo*-Gen und damit ihre *G418*-Resistenz verloren hatten, wurden mittels PCR analysiert. PCR-positive Klone wurden anschließend nochmals im *Southern Blot* überprüft. Die als positiv identifizierten Klone wurden expandiert, tiefgefroren ($5 \cdot 10^6$ Zellen/ml; 1 Stunde bei -20°C , dann 12 Stunden bei -70°C) und dann bis zur Injektion in *C57/Bl6*-Mausblastozysten in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.7. Protein-Extraktion und Western Blots

Die frisch isolierten Organe der Maus (Gehirn, Herz, Skelettmuskel) wurden gewogen und in einem 1:10-Verhältnis (Masse:Volumen) zu EP-Extraktionspuffer gegeben (20 mM Tris; 500 mM NaCl; 0,5% Chaps pH 7,5; 2 µM Pepstatin; 2µM Leupeptin; 200 µM Pefabloc; 5 mM EDTA). Der recht salzreiche EP-Extraktionspuffer ermöglichte auch Extraktionen von Proteinen in die lösliche Phase, die mit Komponenten des Zytoskeletts interagieren.

Die Organe im Extraktionspuffer wurden durch mehrere langsame Stöße mit einem auf 4°C vorgekühlten Protein Homogenisator bei 1400 rpm zerkleinert und danach mit weiteren 15 Stößen bei 1400 rpm homogenisiert. Die Proben wurden dann bei 20.000 rpm ($50.000 \cdot g$) für 35 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen, 600µl des Überstandes wurden mit 200µl Probenpuffer (40 mM Tris/HCl pH 6,8; 10% Glycerin; 0,1% Bromphenolblau; 25% SDS) und 40 µl β-Mercaptoethanol gemischt, fünf Minuten bei 95°C denaturiert und kurz herunterzentrifugiert. Jeweils 10 µl dieser Präparationen wurden durch SDS-

Polyacrylamidgel-Elektrophorese (8% Polyacrylamid) aufgetrennt. Der Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran erfolgte elektrophoretisch. Anschließend wurden die Membranen mit Block-Puffer (5% Magermilchpulver in TBST) für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt und im Waschpuffer TBST gewaschen (TBST: 0,2 M Tris, 5 M NaCl, 0,5% Triton X100 pH 7,5). Schließlich erfolgte die 1stündige Inkubation mit dem ersten Antikörper in einer geeigneten Verdünnung mit dem Blockpuffer (monokl. Maus-anti- α -Aktinin-Antikörper: 1:1000; monokl. Maus-anti-Paxillin-Antikörper: 1:1000; polykl. Kaninchen-anti-Synaptopodin-Antikörper: 1:500). Die Detektion der spezifischen Antikörperbindung erfolgte durch Chemilumineszenz (*ECL*, *Amersham-Pharmacia*) mit an die Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Zweitantikörpern als 1:20.000-Verdünnung in Block-Puffer (anti-Maus-IgG-Antikörper oder anti-Kaninchen-IgG-Antikörper, jeweils gekoppelt an die Meerrettich-Peroxidase).

2.8. Molekularbiologische, zellbiologische und transgene Methoden

Standardverfahren, sowie die dafür verwendeten Reaktionspuffer und Enzyme sind folgenden Nachschlagewerken zu entnehmen und werden daher nicht in diesem Methodenteil aufgeführt:

- Current Protocols in Molecular Biology
F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl
Wiley Interscience, 1989
- Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition
J. Sambrook, E. F. Fritschy, T. Maniatis
Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- Gene Targeting: A Practical Approach
A. L. Joyner
Oxford University Press, 1993.

2.9. Serviceleistungen

2.9.1. Oligonukleotidsynthese

Synthetische Oligonukleotide wurden von der Arbeitsgruppe Dr. R. Frank am ZMBH nach der Phosphotriestermethode auf einem DNS-Synthesizer der Fa. ABI (*Applied Biosystems*) hergestellt.

2.9.2. Herstellung transgener Mäuse

Mausblastozysten-Injektionen wurden in der transgenen Einheit des ZMBH von Frank Zimmermann durchgeführt. Die Methodik ist folgender Literatur zu entnehmen:

Manipulating the Mouse Embryo
B. Hogan, R. Beddington, F. Costantini, E. Lacy
Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994.

2.9.3. Haltung der transgenen Mäuse

Versuchstiere wurden entsprechend dem Tierschutzgesetz in dafür vorgesehenen Räumen in der Versuchstierhaltung des ZMBH gehalten.

2.9.4. DNS-Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmide oder von DNS-Fragmenten erfolgte nach dem "Dye Terminator Cycle Sequencing"-Protokoll (96°C, 15 sec; 55°C, 15 sec; 60°C, 4 min; 25 Zyklen) von ABI (Applied Biosystems), durch den Einbau von vier unterschiedlichen fluoreszenzmarkierten Dideoxynukleotiden (Dye Terminator). Die automatische Sequenzierung wurde in unserem Labor zentral von H. Großkurth durchgeführt.

2.10. Computerprogramme

Adobe Photoshop5.0.2	<i>Adobe Systems</i>
Canvas 6	<i>Deneba Systems</i>
Microsoft Office 6.0	<i>Microsoft</i>
PRISM Auto Assembler	<i>ABI</i>
DNS Strider	<i>CEA</i>

3. Ergebnisse

3.1. Zellbiologische Charakterisierung Dendrins

3.1.1. Expression von EGFP-Dendrin Fusionsproteinen in diversen eukaryontischen Zelllinien

Seit einigen Jahren ist das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) zu einem weitverbreiteten Werkzeug der Zellbiologie geworden. Die Herstellung von Fusionsproteinen aus GFP bzw. seinem Derivat EGFP ("Enhanced Green Fluorescent Protein") mit dem Protein von Interesse hat in vielen Fällen zu neuen Einsichten geführt.

Immunhistochemische Voruntersuchungen und *in-situ*-Hybridisierungen (Herb et al., 1997; Neuner-Jehle et al., 1996) haben gezeigt, daß das Protein Dendrin ausschließlich in Dendriten zu finden ist, während seine mRNA sowohl im Soma als auch dendritisch vorkommt. Dies spricht für die Existenz eines Dendrin-mRNA Transports vom Soma in die dendritische Peripherie. Ob die dendritische Lokalisation des Proteins nur der lokalen Translation der dendritischen mRNA zuzuschreiben ist, oder -eventuell auch zusätzlich- auf einen aktiven Dendrin-Proteintransport zurückzuführen ist, war bislang unklar.

Die Expression von EGFP-markiertem Dendrin in verschiedenen eukaryontischen Zelllinien ermöglicht es, die Verteilung des Dendrin-Proteins in der Zelle einzuschätzen und die Existenz eines Protein-Transports in die Zellperipherie zu bestätigen oder auszuschließen.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, die EGFP-Dendrin exprimierenden Zellen mit Antikörpern gegen diverse andere Proteine zu färben, so daß eventuelle Kollokalisierungen von EGFP-Dendrin mit anderen Proteinen auf mögliche Bindungspartner oder gewisse Funktionen Dendrins hinweisen könnten.

Zur Markierung Dendrins mit EGFP wurde die Dendrin cDNA der Ratte über die Restriktionsschnittstellen EcoRI und NotI in den Expressionsvektor *pEGFP-C1* (Clontech) so inkloniert, daß das Leseraster der cDNA des N-terminalen EGFPs in das Leseraster der C-terminalen Dendrin cDNA übergeht. Die dazu benötigte Restriktionsschnittstelle NotI wurde zuvor durch die Einklonierung eines Adaptors mit den Schnittstellen NotI, SmaI und MluI in die mit dem Klenow-Enzym aufgefüllte KpnI-Schnittstelle des *pEGFP-C1*-Vektors generiert. Nach der Einklonierung der 3,6 Kilobasen (kb) cDNA für Dendrin an den C-Terminus von EGFP erfolgte die Deletion der ca. 1,5 kb 3' untranslatierten Region (3'UTR) durch Restriktionsschnitte mit XbaI

und NotI, Glättung der kohäsiven Enden mit dem *Klenow*-Fragment der DNS-Polymerase I und anschließender Religation.

Dieses Konstrukt wurde mit Lipofektion in diverse eukaryontische Zelllinien transfiziert, wie z. B. in Fibroblasten (NIH3T3), in Podozyten, in Myoblasten (C2C12) und Epithelzellen (MDCK). Die Verteilung des mit EGFP markierten Dendrins (*EGFP-Dendrin*) zeigt Abbildung 2: in Fibroblasten (Abb. 2 A, B und C), sowie in Myoblasten (Abb. 2G), Podozyten (Abb. 2 D, E und F) und MDCK Zellen (Abb. 2 H und I) ist Dendrin eindeutig im Nukleus lokalisiert. Weiterhin findet man in allen Zelllinien -außer in Podozyten- häufig zusätzlich zur Kernfärbung auch EGFP-Dendrin-Vesikel, die sich im Soma und entlang der Zellfortsätze befinden. Als Kontrolle zu diesem Experiment wurden Fibroblasten auch mit dem leeren *pEGFP-C1*-Vektor transfiziert, um sicherzustellen, daß EGFP selbst gleichmäßig in der Zelle verteilt ist und nicht schon alleine zu gewissen Sortierungen oder Agglomerationen in der Zelle führen kann. Abbildung 1 zeigt eine sehr gleichmäßige Verteilung für das vom Vektor *pEGFP-C1* exprimierte EGFP. Die bei *EGFP-Dendrin* beobachtete intrazelluläre Verteilung ist daher ausschließlich auf Sortierungssignale in der Dendrin-Sequenz zurückzuführen.

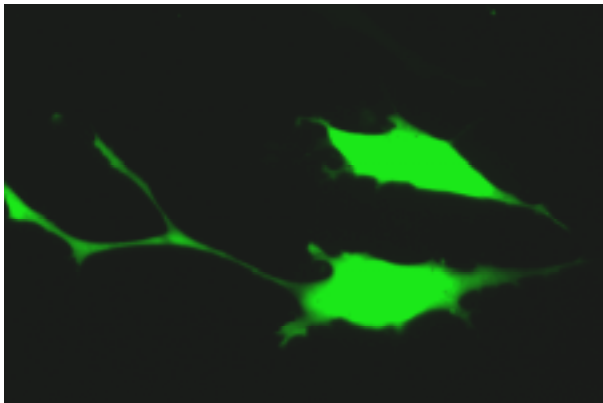


Abb. 1: Fibroblasten (NIH3T3) wurden mit dem Vektor *pEGFP-C1* durch Lipofektion transfiziert.

Analysiert man die Aminosäuresequenz Dendrins mit Hilfe des Programms *pSort*, das durch die Detektion primärstruktureller Sortierungssignale den wahrscheinlichen Aufenthaltsort eines Proteins in der Zelle voraussagen soll, so werden zwei Regionen mit nukleären Sortierungssignalen ("nuclear targeting signals" oder NLS) detektiert: RKRR, KRRK und das zweiteilige "nuclear

targeting"-Signal RKAASQER EAKETERKR in der Region von Aminosäure 113 bis 131 und PRRR und PRRRWDR in der Region von Aminosäure 217 bis 223. Alle diese nukleären Sortierungssignale befinden sich demnach in der Nähe des N-Terminus des 707 Aminosäuren umfassenden Proteins. Um die Funktionalität dieser durch das Programm *pSort* vorhergesagten NLS-Sequenzen nachzuweisen, wurde die kodierende Region der Dendrin cDNS in zwei überlappende Fragmente geteilt und beide Fragmente wurden einzeln als Fusionen mit EGFP in den *pEGFP-C1* Vektor kloniert. Das Fragment der cDNS, das für die N-terminalen 570 Aminosäuren kodiert, wurde hierfür mit Hilfe von *pfu-DNS-Polymerase* und den Oligonukleotiden *NDEN*

Eco 1s und *DEN Sal 2as* durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) synthetisiert, mit den Restriktionsenzymen EcoRI und SalI geschnitten und in den ebenso geschnittenen Vektor *pEGFP-C1* einkloniert, wodurch sich ein für EGFP und Dendrin durchgängiges Leseraster ergab (Konstrukt *EGFP-N-term*). Das C-terminale Dendrin Fragment (Aminosäuren 402 -707) wurde ebenfalls mit *pfu-DNS-Polymerase* und den Oligonukleotiden *DEN Eco 3s* und *CDEN Sal 4as* durch PCR generiert, mit EcoRI und SalI geschnitten und in den ebenso geschnittenen Vektor *pEGFP-C1* im EGFP-Leseraster einkloniert (Konstrukt *EGFP-C-term*). Die intrazelluläre Verteilung für das EGFP-markierte N-terminale Fragment von Dendrin (Abb. 3) ähnelt der Verteilung des *EGFP-Dendrin* Konstruktes mit der gesamten kodierenden Dendrin cDNS: sowohl in Fibroblasten, wie auch in Podozyten ist die N-terminale Region eindeutig kernlokalisiert und in Fibroblasten, nicht aber in Podozyten, sind zusätzlich häufig Dendrin-Vesikel im Soma und entlang der Zellfortsätze zu beobachten. Da das N-terminale Fragment alle vom Programm *pSort* vorhergesagten NLS-Signale enthält, spricht dieses Ergebnis für die Funktionalität dieser Signale. Das EGFP-markierte C-terminale Fragment von Dendrin, das keines der vorausgesagten NLS-Signale enthält, zeigt dagegen eine vollkommen andere intrazelluläre Verteilung, wie Abbildung 4 zeigt: hier erkennt man keine vesikulären Strukturen mehr, sondern eine gleichmäßige zytoplasmatische Verteilung im Soma und in den Zellfortsätzen, eine Kernlokalisation ist jedoch eindeutig nicht mehr zu erkennen. Offenbar befinden sich demnach die für Dendrin wirksamen NLS-Signale im N-terminalen, aber nicht im C-terminalen Teil, was mit der Lage der von *pSort* identifizierten NLS-Signale übereinstimmt. Auch die Signale, die für die Sortierung Dendrins in vesikuläre Strukturen (z.B. eine Interaktionsregion mit einem Motorprotein) verantwortlich sind, scheinen im C-terminalen Fragment zu fehlen und somit zu einer für das native Protein untypischen gleichmäßigen zytoplasmatischen Verteilung zu führen.

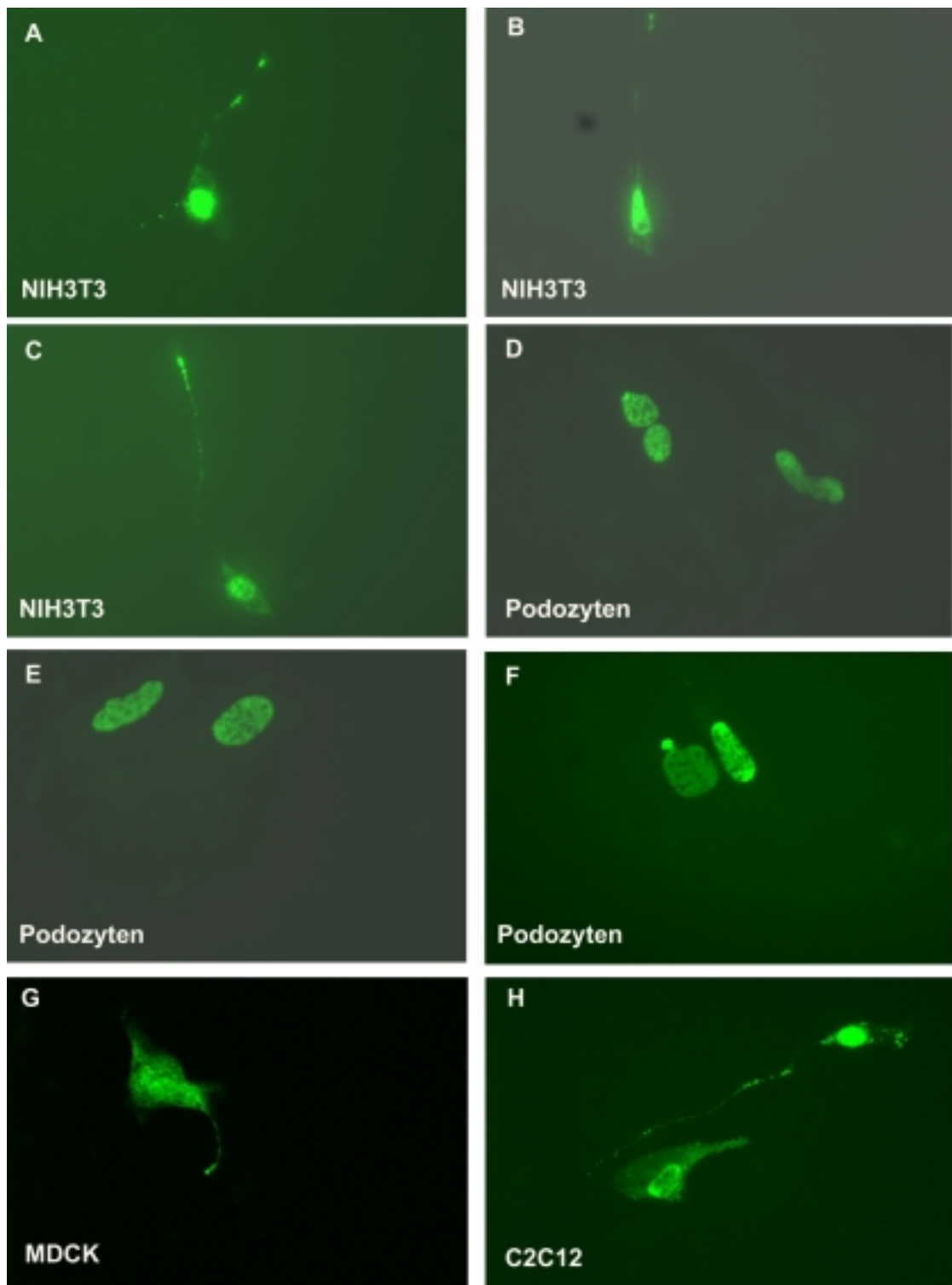


Abb. 2: Verschiedene eukaryontische Zelllinien wurden mit dem Konstrukt für EGFP-Dendrin, das die Expression eines Fusionsproteins aus EGFP und dem vollständigen Dendrin (707 Aminosäuren) steuert, durch Lipofektion transfiziert. Deutlich sichtbar ist die Kernlokalisierung (in allen Abb.) und die Anwesenheit von vesikulären Strukturen im Soma und entlang der Zellfortsätze (2 A-C und 2 G-H).

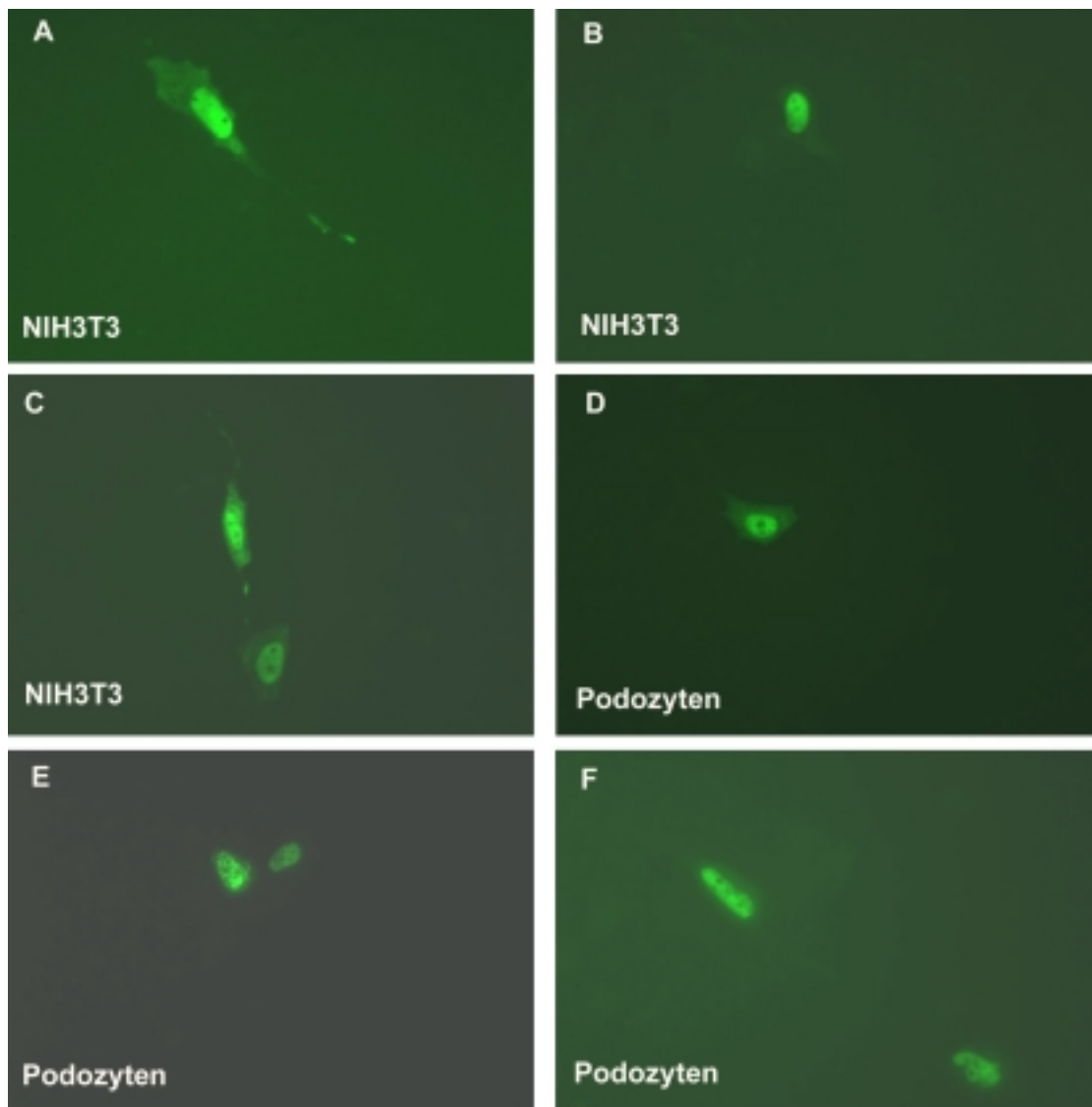


Abb. 3: Fibroblasten und Podozyten wurden mit dem Konstrukt für EGFP-N-term, das die Expression des Fusionsproteins aus EGFP und den N-terminalen 570 Aminosäuren Dendrins steuert, durch Lipofektion transfiziert. Deutlich sichtbar ist auch hier die Kernlokalisierung des Fusionsproteins und die Anwesenheit vesikulärer Strukturen entlang der Zellfortsätze der Fibroblasten.

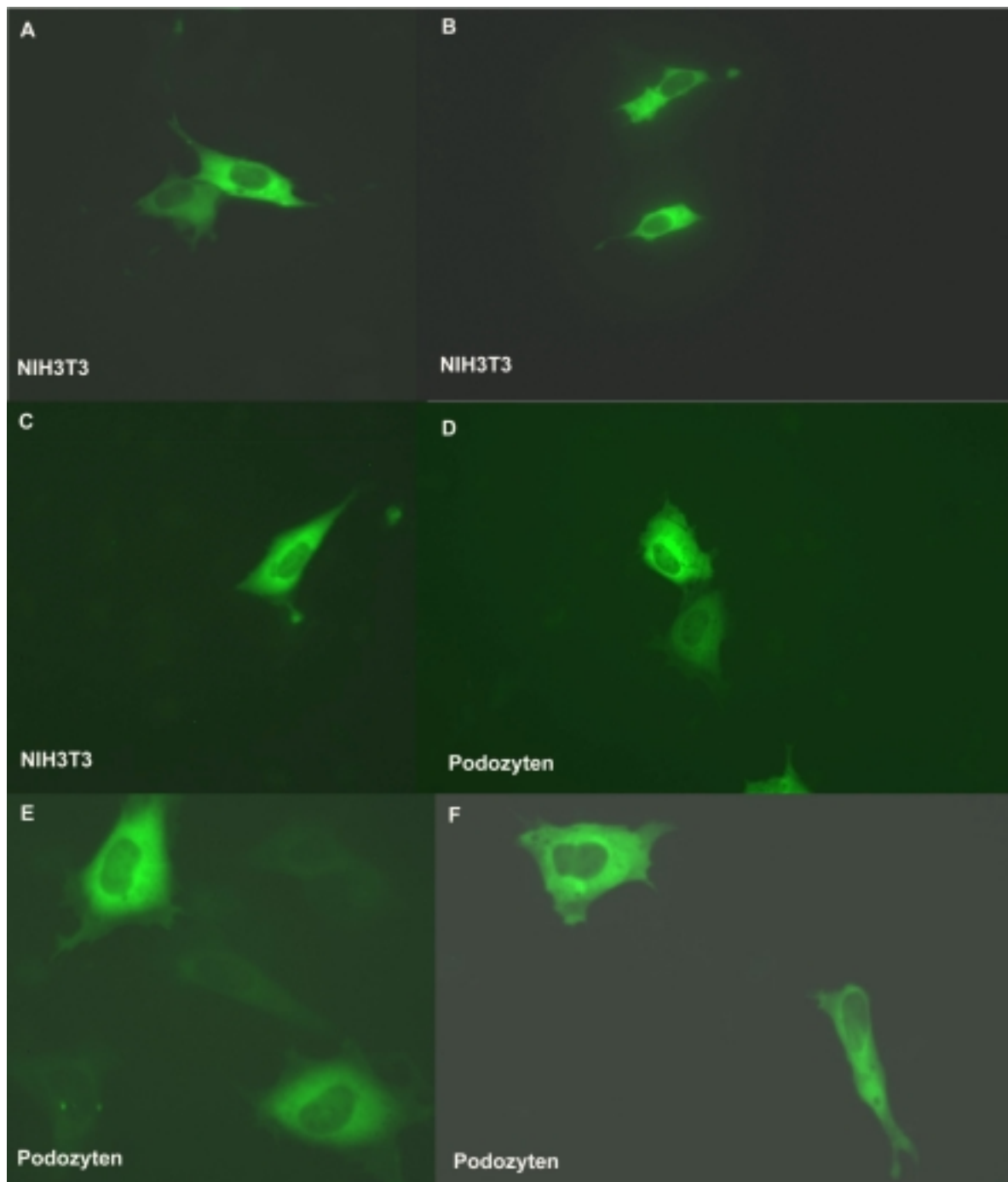


Abb. 4: Fibroblasten und Podozyten wurden mit dem Konstrukt für EGFP-C-term, das die Expression eines Fusionsproteins aus EGFP und den C-terminalen 305 Aminosäuren Dendrins steuert, durch Lipofektion transfiziert. Dieses C-terminale Fragment Dendrins zeigt aufgrund der fehlenden NLS-Signale keine Kernlokalisation mehr, sondern eine gleichmäßige zytoplasmatische Verteilung.

3.1.2. Dendrin besitzt ein funktionelles "Nuclear Targeting Signal" (NLS)

Um die Region Dendrins weiter einzugrenzen, die für die Kernlokalisierung verantwortlich ist, wurden neue Fragmente Dendrins im EGFP-Leseraster in den *pEGFP-C1* Vektor kloniert. Zur Herstellung dieser Konstrukte wurden Oligonukleotide des Sinn-DNS-Strangs hergestellt, die jeweils die Restriktionsschnittstelle EcoRI enthielten, und Oligonukleotide des Gegensinn-DNS-Strangs, die die Schnittstelle SalI beinhalteten. Nach der Herstellung eines PCR-Produktes des jeweiligen Dendrin Fragments mit Hilfe von *pfu-DNS-Polymerase* und den jeweiligen Oligonukleotiden wurden die PCR-Produkte wie auch der *pEGFP-C1* Vektor mit den Enzymen EcoRI und SalI geschnitten und anschließend ligiert. Die Oligonukleotide des Sinn-Stranges wurden hierbei so gewählt, daß sich nach der Ligation ein durchgehendes Leseraster von EGFP zu dem jeweiligen Dendrin-Fragment ergab. Weiterhin wurde die Durchgängigkeit des Leserasters für alle Konstrukte auch durch DNS-Sequenzierung bestätigt.

Das Konstrukt *EGFP-5s/4as* wurde mit Hilfe der Oligonukleotide *mDEN Eco 5s* und *mDEN Sal 4as* hergestellt und umfaßt ein cDNS-Fragment Dendrins, das für die C-terminalen Aminosäuren 234 - 707 kodiert und damit keines der von *pSort* vorhergesagten NLS-Signale enthält. Das NLS, das laut *pSort* am weitesten C-terminal liegt, hat die Sequenz PRRRWDR und liegt in den Aminosäurepositionen 218 - 224. Für das Konstrukt *EGFP-5s/4as DEN* wäre also zu erwarten, daß es nach der Lipofektion in eukaryontische Zellen eine ähnliche Verteilung zeigen sollte wie das Konstrukt *EGFP-C-term*, nämlich keine Kernlokalisierung aufgrund der fehlenden NLS-Sequenzen, keine vesikulären Strukturen, sondern eine gleichmäßige zytoplasmatische Verteilung. Wie in Abbildung 5 zu sehen ist, entspricht diese erwartete Verteilung für dieses Konstrukt den Tatsachen und beweist eindeutig die Abwesenheit funktioneller NLS-Signale im C-terminalen Fragment Dendrins (entsprechend der Aminosäuren 1 - 233).

Das Dendrin-Fragment für das Konstrukt *EGFP-6s/4as* wurde mit den Oligonukleotiden *mDEN Eco 6s* und *cDEN Sal 4as* generiert. Das von *EGFP-6s/4as* exprimierte Fusionsprotein umfaßt die Aminosäureregion 137 - 707 und somit die C-terminalen 570 Aminosäuren Dendrins. Dieser Teil Dendrins beinhaltet außerdem die durch *pSort* identifizierten NLS-Sequenzen PRRR und PRRRWDR (Aminosäureregion 218 - 224), nicht aber die zweite, größere Akkumulation von NLS-Sequenzen in der Aminosäureregion 113 bis 131 (RKRR, KRRK und das zweiteilige Signal RKAASQEREAETERKR). Wie Abbildung 6 zeigt, ist die intrazelluläre Verteilung des so trunkierten Dendrins nicht eindeutig: in Abb. 6 A und D scheint eine Kernlokalisierung des Dendrin Proteinfragments vorhanden zu sein, sowie eine schwache diffuse zytoplasmatische Lokalisation; in Abb. 6 B und C hingegen ist eine starke gleichmäßige Lokalisation im Zytoplasma, jedoch keine eindeutige Kernlokalisierung zu sehen. Dies läßt darauf schließen, daß die NLS-

Sequenzen PRRR und PRRRWDR (Aminosäureregion 218 - 224) möglicherweise eine untergeordnete Rolle bei der nukleären Dendrin-Lokalisation spielen.

Für das Konstrukt *EGFP-7s/4as* wurde ein C-terminales cDNS-Fragment Dendrins mit den Oligonukleotiden *mDEN Eco 7s* und *cDEN Sal 4as* generiert, das für die Aminosäureregion 106 - 707 kodiert und daher beide von *pSort* identifizierten NLS-Signale enthält. Abbildung 7 zeigt für dieses Konstrukt eine eindeutige Kernlokalisierung, die sich allerdings optisch von der Kernlokalisierung des *EGFP-Dendrin*-Konstruktes unterscheidet. Das Dendrin-Fragment aus *EGFP-7s/4as* zeigt innerhalb des Nukleus Akkumulationen, die als intensiv grüne Punkte deutlich in Abb. 7 A und C zu erkennen sind, während die Kernverteilung für die komplette DEN cDNS auch nicht völlig homogen, jedoch etwas gleichmäßiger aussieht (siehe Abb. 1 D, E und F). Weiterhin konnte das Dendrin-Fragment des Konstruktes *EGFP-7s/4as* niemals in vesikulären Strukturen im Soma oder entlang der Zellfortsätze detektiert werden wie für die gesamte cDNS Dendrins (Abb. 1 A, B, C, G, H, I). Da für das Konstrukt *EGFP-N-term* jedoch EGFP-Dendrin-Vesikel detektiert wurden, wäre es möglich, daß das Sortierungssignal oder die Interaktionsdomäne, die für die Sortierung Dendrins in die vesikulären Strukturen verantwortlich ist, in den N-terminalen 105 Aminosäuren Dendrins zu finden ist, die bei Konstrukt *EGFP-7s/4as* fehlen.

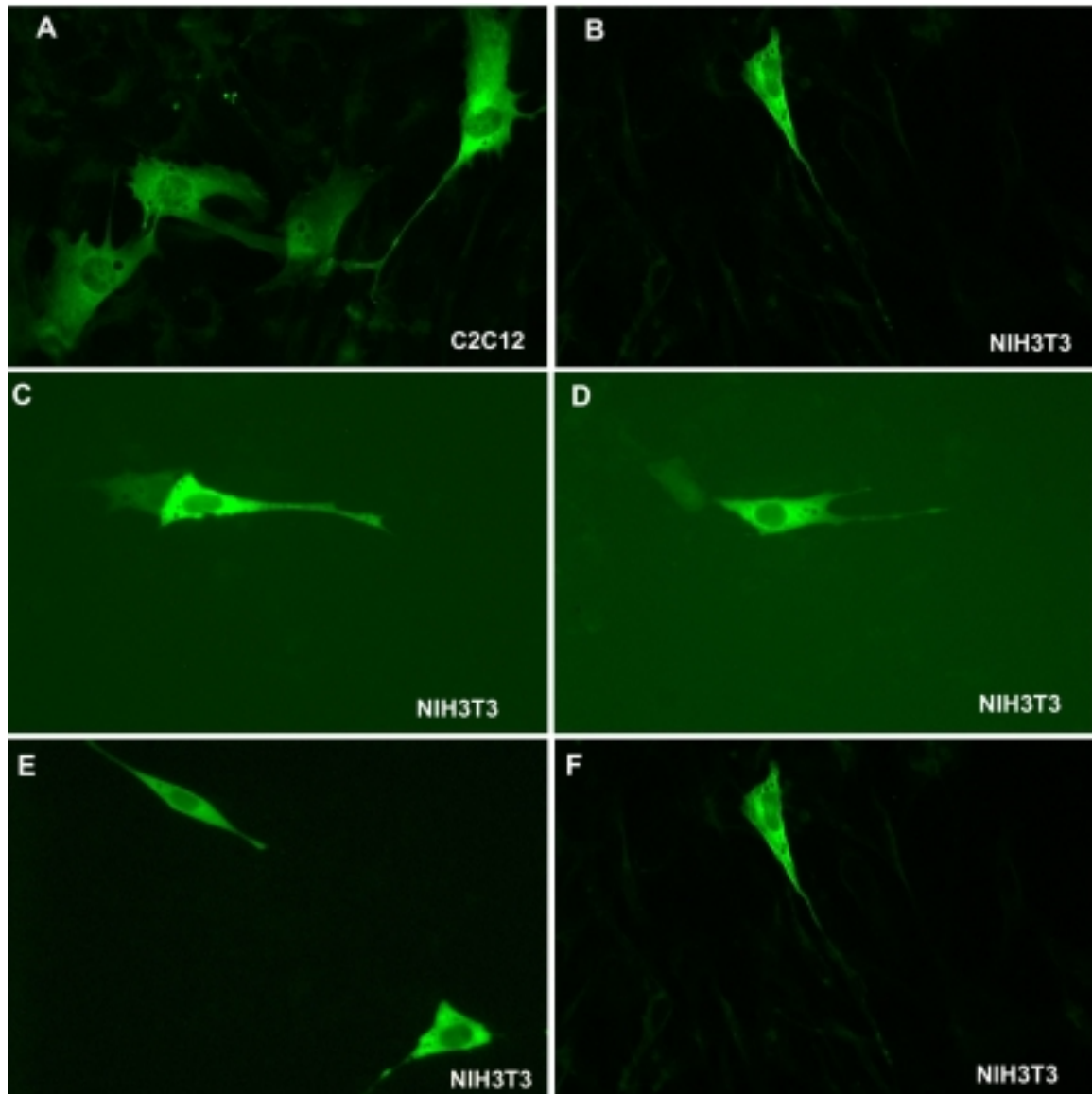


Abb. 5: Fibroblasten (NIH3T3) und Myoblasten (C2C12) wurden mit dem Konstrukt für EGFP-5s/4as, das die Expression eines Fusionsproteins aus EGFP und den C-terminalen 473 Aminosäuren Dendrins steuert, durch Lipofektion transfiziert. Da auch dieses Fusionsprotein keine Kernlokalisierung zeigt, scheinen die C-terminalen 473 Aminosäuren Dendrins kein funktionelles NLS zu enthalten.

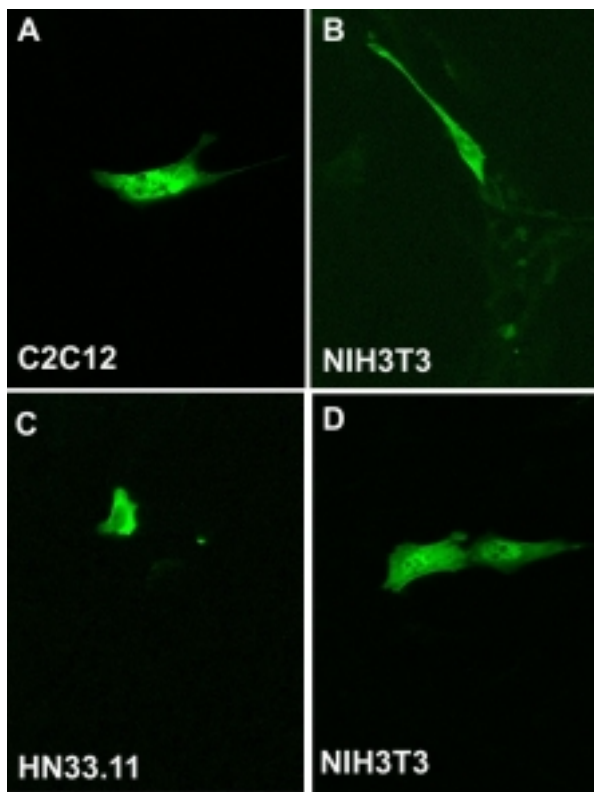


Abb. 6:
 Verschiedene Zelllinien (C2C12, NIH3T3, die neuronale Zelllinie HN33.11) wurden mit dem Konstrukt für EGFP-6s/4as durch Lipofektion transfiziert. Eine Kernlokalisierung ist hier nicht eindeutig zu erkennen.

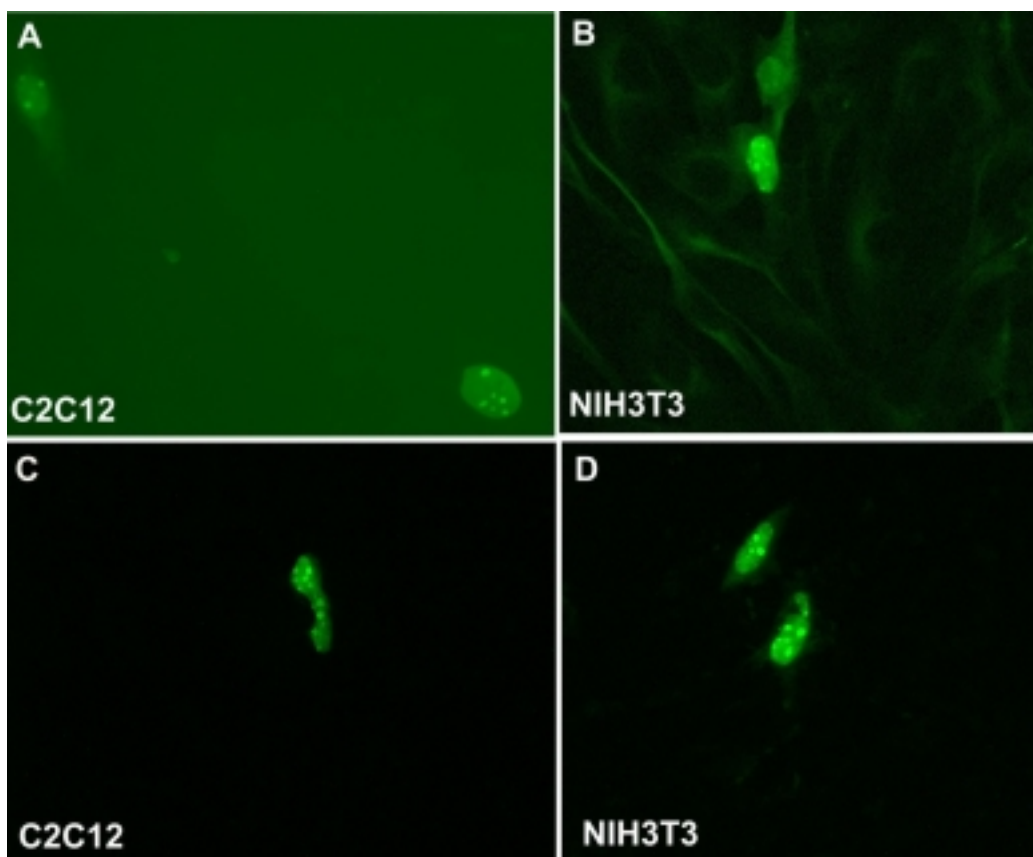


Abb. 7: Fibroblasten und Myoblasten wurden mit dem Konstrukt für EGFP-7s/4as durch Lipofektion transfiziert. Eine eindeutige Kernlokalisierung des Fusionsproteins ist erkennbar, es fehlen jedoch die vesikulären Strukturen entlang der Zellfortsätze, die bei dem Konstrukt für EGFP-Dendrin beobachtet werden konnten.

3.1.3. Dendrin und Myopodin zeigen unterschiedliche intrazelluläre Verteilung

Die Dendrin-Sequenz zeigt keinerlei signifikante Homologien zu anderen Datenbanksequenzen. Synaptopodin und das zu Synaptopodin stark homologe Myopodin weisen jedoch - wie schon in der Einleitung erwähnt - einige dem Dendrin sehr ähnliche Eigenschaften auf. Alle drei Proteine sind sehr hydrophil, stark basisch, prolinreich und haben etwa die gleiche Länge. Weiterhin werden Dendrin und Synaptopodin in Podozyten und in den gleichen Hirnstrukturen (Telencephalon) exprimiert und beide Proteine zeigen im Hirn eine dendritische Lokalisierung. Synaptopodin (Mundel et al., 1997) und Myopodin (unpublizierte Daten, P. Mundel) kolokalisieren beide mit Aktin-Filamenten. Abbildung 8 zeigt die intrazelluläre Verteilung von EGFP-markiertem MP2, einem Fragment Myopodins: deutlich ist die für Myopodin (und auch für Synaptopodin) typische Verteilung entlang der Aktin-Filamente ("stress fibres") zu sehen. Auch für Dendrin wurde zunächst eine Kolokalisation und eventuell Interaktion mit Aktin-Filamenten erwartet, denn in einem *yeast two-hybrid screen* konnte α -Aktinin als Protein-Interaktionspartner für Dendrin identifiziert werden (Diplomarbeit, T. Schulz, 1997). Der Vergleich der völlig unterschiedlichen intrazellulären Verteilungen von Myopodin (Abb. 8) und Synaptopodin (Mundel et al., 1997) gegenüber Dendrin (Abb. 2) läßt jedoch eine physiologisch relevante Interaktion zwischen dem Aktin-bindenden α -Aktinin und Dendrin eher unwahrscheinlich erscheinen.

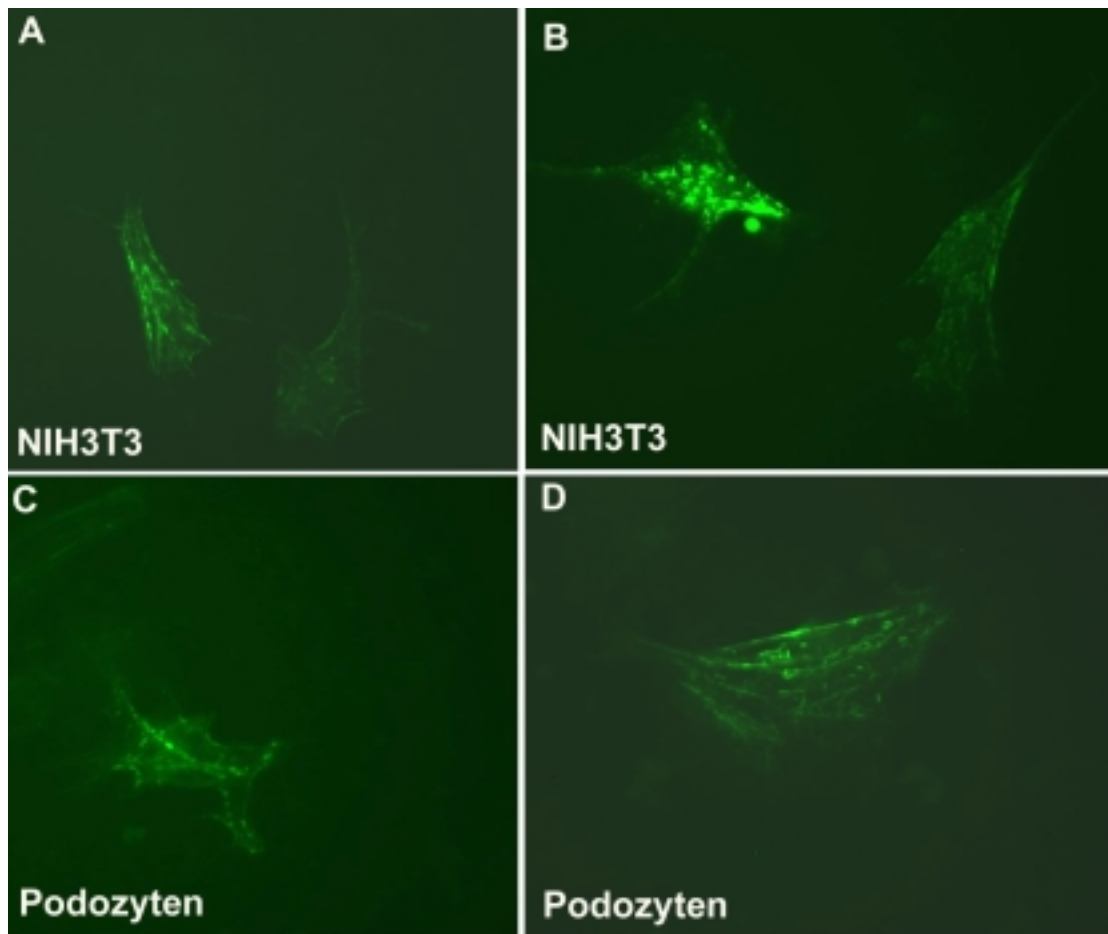


Abb. 8: Fibroblasten und Podozyten wurden mit dem Konstrukt für EGFP-MP2 durch Lipofektion transfiziert. Dieses Konstrukt steuert die Expression eines Fusionsproteins aus EGFP und MP2, einem Fragment des zu Synaptopodin homologen Proteins Myopodin.

3.1.4. EGFP-Dendrin-Vesikel bewegen sich in Fibroblasten in anterograder Richtung

Neben der klaren Kernlokalisation zeigt das *EGFP-Dendrin* Fusionsprotein in allen getesteten Zelllinien - mit Ausnahme der Podozyten - eine vesikuläre Verteilung im Soma und in den Zellfortsätzen. Es stellt sich daher die Frage, ob diese EGFP-Dendrin-Vesikel stationär sind oder sich gerichtet - retrograd oder anterograd - bewegen. Um dieser Frage nachzugehen, wurden Fibroblasten der Linie NIH3T3 mit dem Konstrukt *EGFP-Dendrin* durch Lipofektion transfiziert und anschließend durch "time lapse microscopy" mit einer gekühlten CCD-Kamera in vivo beobachtet. Hierzu wurden im Abstand von jeweils etwa 1 Sekunde FITC-Fluoreszenzbilder von Zellfortsätzen mit EGFP-Dendrin-Vesikeln aufgenommen und anschließend als Film hintereinandergeschnitten, um gerichtete Bewegungen der fluoreszierenden Vesikel im Zeitraffer zu detektieren. Dabei erwies sich die hohe Motilität der Fibroblastenlinie NIH3T3 auf der Oberfläche der Petrischale als problematisch, die häufig zu einer Fokusverschiebung der anvisierten Vesikel führte. Dennoch konnte in einem aufgenommenen Film eine anterograde saltatorische Bewegung von EGFP-Dendrin-Vesikeln beobachtet werden. Zur Demonstration dieser anterograden Bewegung wurden in Abbildung 9 vier in beliebigem Zeitabstand aufeinanderfolgende FITC-Aufnahmen des fraglichen Zellfortsatzes dargestellt. Die mit einem Pfeilkopf markierten Vesikel blieben stationär, während der mit einem Pfeil versehene Vesikel sich in anterograder Richtung (vom Soma in die Zellperipherie) bewegte. Ob neben der anterograden Bewegung der Vesikel auch ein retrograder Transport der EGFP-Dendrin-Vesikel existiert, ist bisher noch nicht mit ausreichender Sicherheit zu beantworten.

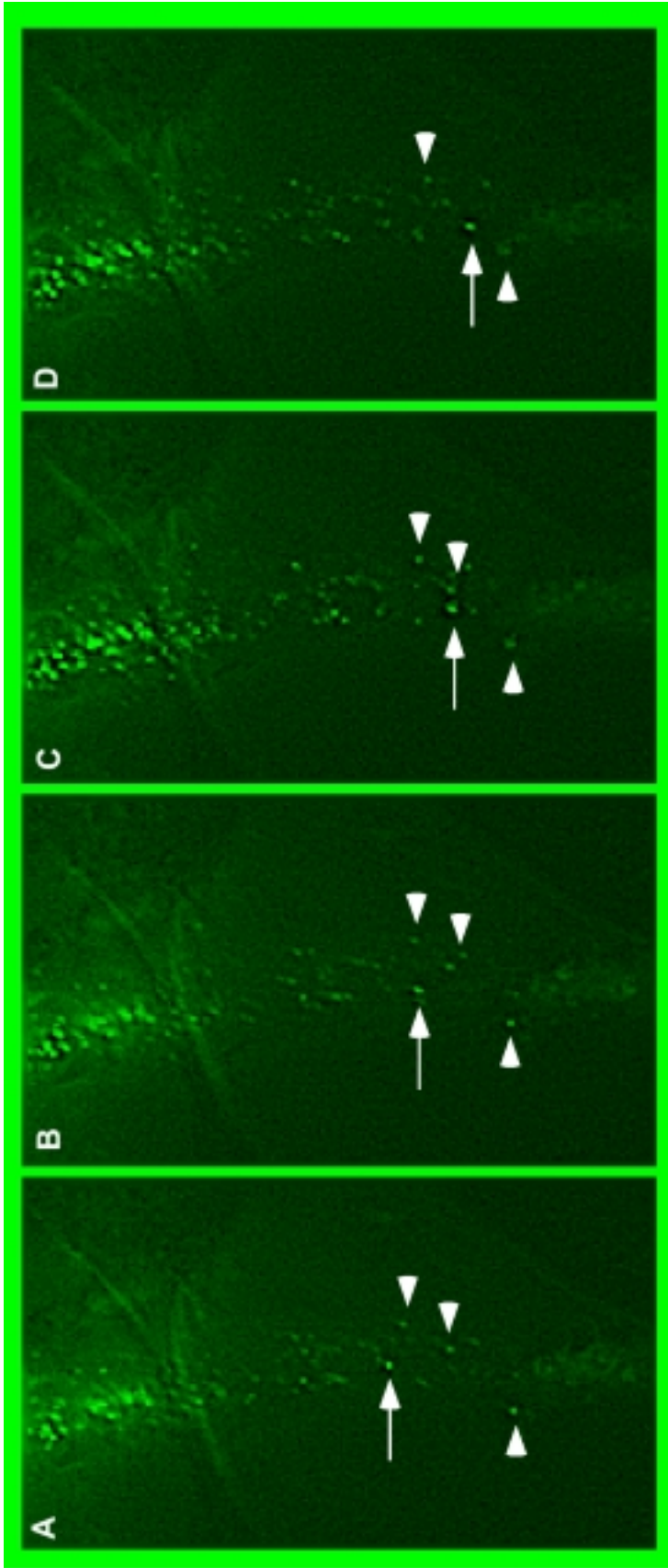


Abb. 9 A-D: Es sind vier in beliebigem zeitlichen Abstand aufeinander folgende FITC-Aufnahmen eines Zellfortsatzes eines Fibroblasten zu sehen, der zuvor mit dem Konstrukt für EGFP-Dendrin transfiziert worden war. Die mit einem Pfeilkopf markierten Vesikel blieben stationär, während der mit einem Pfeil versehene Vesikel sich in anterograder Richtung fortbewegte.

3.1.5. Die Bewegung der EGFP-Dendrin-Vesikel ist Mikrotubuli-abhängig

Da in vielen bisher untersuchten Fällen der vesikuläre Proteintransport entlang der Mikrotubuli verläuft bzw. mit Hilfe Mikrotubuli-assoziiertes Motor-Proteins erfolgt, ergibt sich auch hier die Frage, ob das Auftreten der EGFP-Dendrin-Vesikel abhängig von der Existenz intakter Mikrotubuli ist. In einem weiteren Experiment sollten daher die Mikrotubuli von Fibroblasten der Linie NIH3T3, die am Tag zuvor mit dem Konstrukt *EGFP-Dendrin* transfiziert worden waren, durch Depolymerisation zerstört werden. Ließen sich fluoreszierende EGFP-Dendrin-Vesikel auch noch nach der Zerstörung der Mikrotubuli beobachten, so wären diese wahrscheinlich Mikrotubuli-unabhängig. Wären die Vesikel jedoch nach der Depolymerisation der Mikrotubuli verschwunden, so spräche dies für eine Mikrotubuli-abhängige Existenz der EGFP-Dendrin-Vesikel.

Heute stehen diverse Chemikalien zur Depolymerisation von Mikrotubuli zur Verfügung, wie z.B. Colchicin oder Nocodazol. Um die Mikrotubuli-Abhängigkeit eines zellulären Prozesses nachzuweisen, empfiehlt sich besonders Nocodazol, da die Depolymerisation der Mikrotubuli mit Nocodazol im Gegensatz zu Colchicin reversibel ist.

Auf Deckgläsern kultivierte Fibroblasten der Linie NIH3T3 wurden mit dem Konstrukt *EGFP-Dendrin* durch Lipofektion transfiziert. Am darauf folgenden Tag wurden drei Deckgläser mit transfizierten Zellen als unbehandelte Kontrollen fixiert, permeabilisiert und mit einem monoklonalen anti- α -Tubulin IgG Antikörper gefärbt. Als Zweitantikörper diente ein anti-Maus-IgG Antikörper, der mit dem im roten Bereich emittierenden Fluoreszenzfarbstoff *cy3* gekoppelt ist. Dem Kulturmedium der noch unfixierten transfizierten Zellen auf den restlichen Deckgläsern wurde Nocodazol in einer Konzentration von 10 μ M zugefügt. Nach einer zweistündigen Inkubation mit Nocodazol-haltigem Medium bei 37 °C wurden wiederum drei Deckgläser entnommen, fixiert und mit dem monoklonalen anti- α -Tubulin IgG Antikörper gefärbt. Von den übrigen Deckgläsern wurde das Nocodazol-haltige Medium entfernt und verbleibendes Nocodazol wurde durch mehrmaliges Spülen mit normalem Kulturmedium ausgewaschen. Nach zwei- bzw. zwanzigstündiger Inkubation bei 37°C wurden wieder jeweils drei Deckgläser entnommen, fixiert und mit monoklonalen anti- α -Tubulin IgG Antikörper gefärbt.

In Abbildung 10 sind EGFP-Dendrin exprimierende Zellen der unbehandelten Kontroll-Deckgläser dargestellt: der FITC-Kanal zeigt neben der für EGFP-Dendrin typischen Kernfärbung deutlich vesikuläre Strukturen und der *cy3*-Kanal zeigt die α -Tubulin-Färbung intakter Mikrotubuli. Abbildung 11 zeigt EGFP-Dendrin exprimierende Zellen unmittelbar nach der zweistündigen Depolymerisation mit Nocodazol: hier sind im FITC-Kanal ausschließlich Zellen mit Kernfärbung, nicht aber mit vesikulärer Färbung zu sehen. Die mit *cy3* detektierte α -Tubulin-Immunfärbung zeigt deutlich die Zerstörung der Mikrotubuli durch Depolymerisation. Eine

Zerstörung der Mikrotubuli scheint demnach tatsächlich mit dem Verlust der EGFP-Dendrin-Vesikel einherzugehen. Nach einer 2stündigen (Abb. 12) und einer 20stündigen (Abb. 13) Erholungsphase wird die im *cy3*-Kanal sichtbare Rückbildung der Mikrotubuli begleitet von einer allmählichen Rückbildung der EGFP-Dendrin-Vesikel neben der EGFP-Dendrin Kernfärbung.

Das Ergebnis dieses Experiments spricht daher für eine Assoziation der Dendrin-Transportvesikel mit Mikrotubuli.

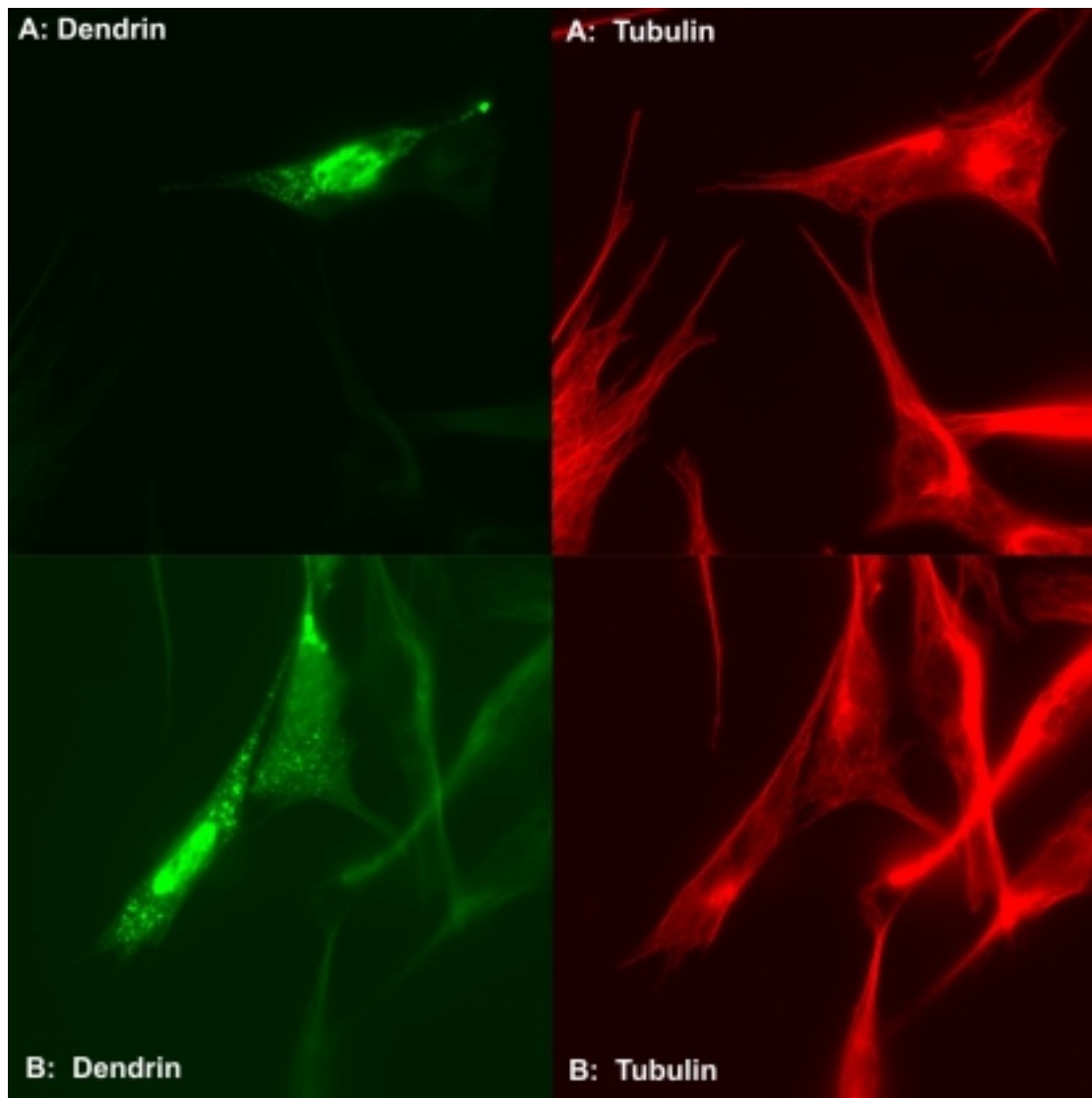


Abb. 10: A und B zeigen Fluoreszenzbilder von Fibroblasten, die mit dem Konstrukt für EGFP-Dendrin transfiziert und ohne vorherige Nocodazol-Inkubation anschließend fixiert, permeabilisiert und mit einem anti- α -Tubulin Antikörper gefärbt worden waren. Neben der Kernlokalisierung Dendrins sind im grünen Fluoreszenzkanal (Dendrin) deutlich auch vesikuläre dendrinhaltige Strukturen zu erkennen. Im roten Fluoreszenzkanal sind die durch den anti- α -Tubulin Antikörper angefärbten intakten Mikrotubuli erkennbar.

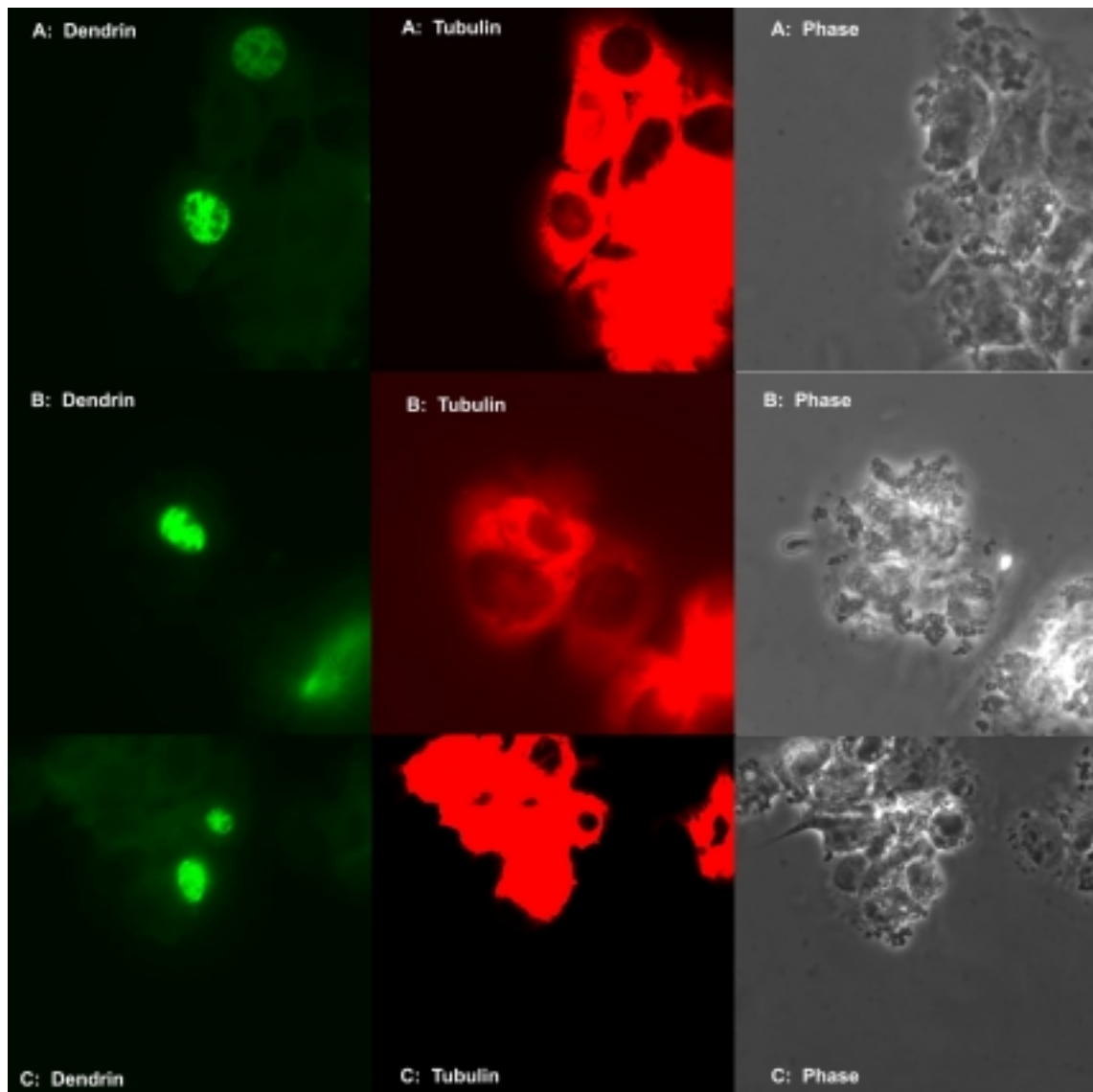


Abb. 11: A, B und C zeigen Fluoreszenz- und Phasenbilder von Fibroblasten, die mit dem Konstrukt für EGFP-Dendrin transfiziert und am nächsten Tag einer 2stündigen Inkubation mit Nocodazol ausgesetzt worden waren.

Die Zellen wurden anschließend fixiert und permeabilisiert und mit einem anti- α -Tubulin Antikörper gefärbt. Im roten Fluoreszenzkanal ist die Zerstörung der mikrotubulären Strukturen durch Nocodazol deutlich sichtbar. Der grüne Fluoreszenzkanal zeigt nach der Zerstörung der Mikrotubuli lediglich die Kernlokalisierung Dendrins, jedoch keine EGFP-Dendrin-Vesikel mehr.

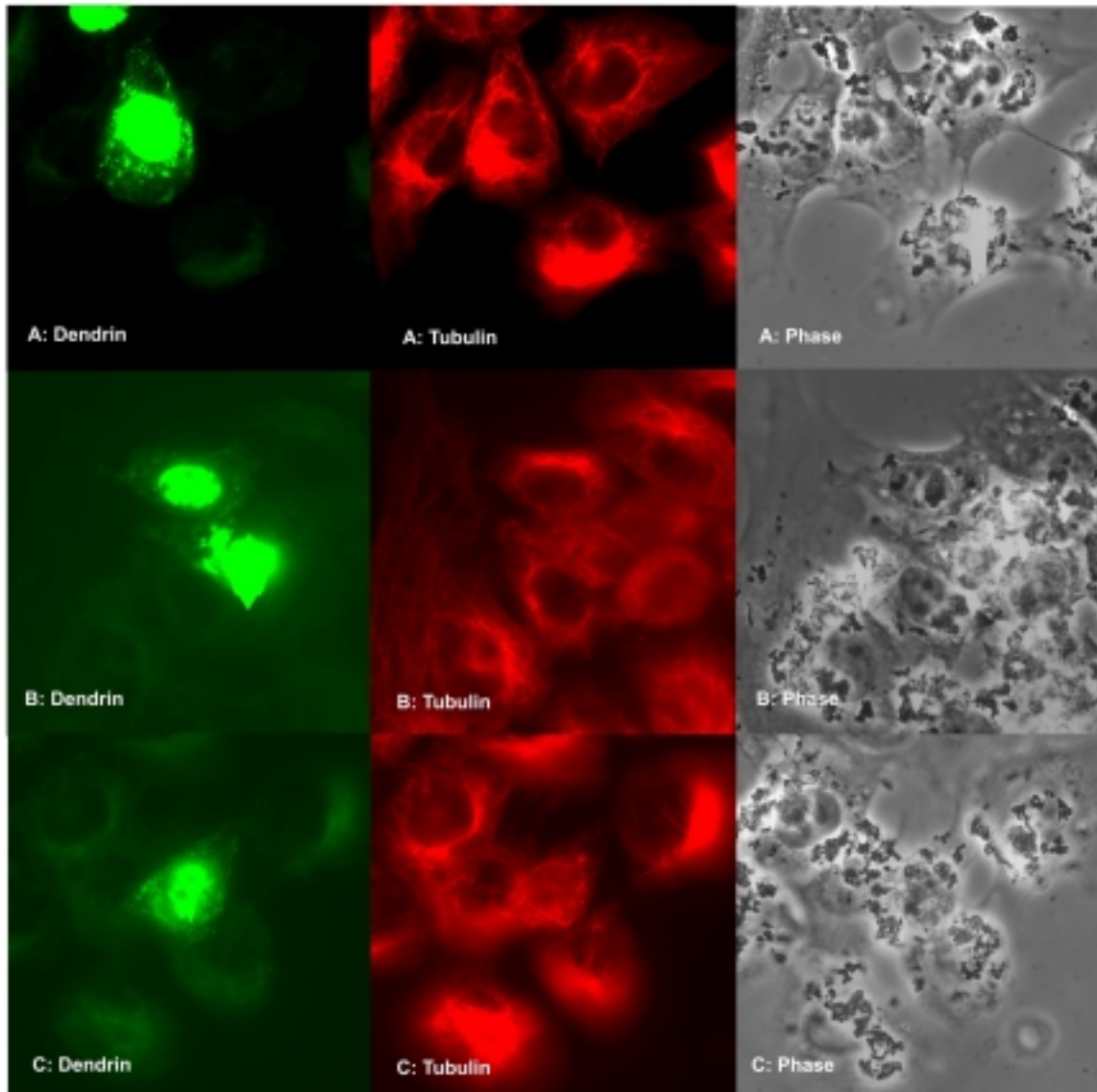


Abb. 11: A, B und C zeigen Fluoreszenz- und Phasenbilder von Fibroblasten, die mit dem Konstrukt für EGFP-Dendrin transfiziert und am nächsten Tag einer 2stündigen Inkubation mit Nocodazol ausgesetzt waren.

Die Zellen wurden anschließend fixiert und permeabilisiert und mit einem anti- α -Tubulin Antikörper gefärbt. Im roten Fluoreszenzkanal ist die Zerstörung der mikrotubulären Strukturen durch Nocodazol deutlich sichtbar. Der grüne Fluoreszenzkanal zeigt nach der Zerstörung der Mikrotubuli lediglich die Kernlokalisierung Dendrins, jedoch keine EGFP-Dendrin-Vesikel mehr.

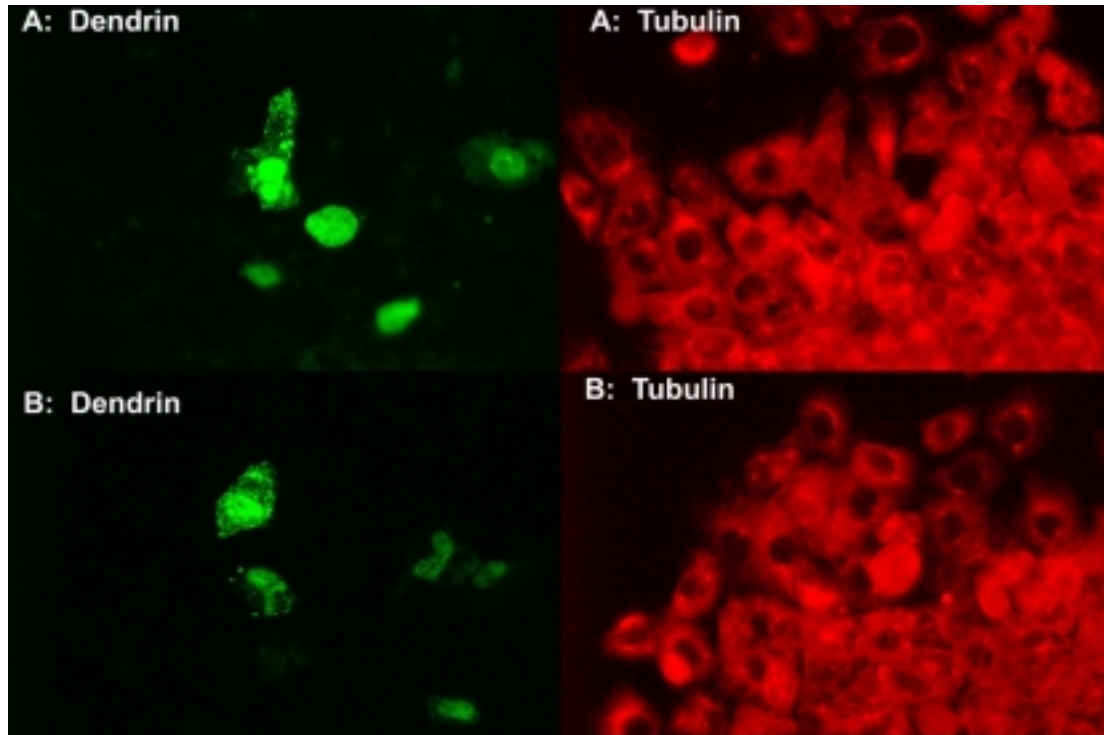


Abb. 13: A und B zeigen Fluoreszenzbilder von Fibroblasten, die mit dem Konstrukt für EGFP-Dendrin transfiziert und am nächsten Tag einer 2stündigen Inkubation mit nocodazol-haltigem Medium ausgesetzt worden waren. Durch den anschließenden Ersatz des nocodazolhaltigen Mediums durch normales Medium wurde dem mikrotubulären Netzwerk 20 Stunden Zeit gegeben, sich zu regenerieren. Der rote Fluoreszenzkanal zeigt deutlich regenerierte Mikrotubuli und im grünen Fluoreszenzkanal sind neben der Kernlokalisierung wieder vesikuläre EGFP-Dendrin-Strukturen zu erkennen.

3.1.6 EGFP-Dendrin-Vesikel kolokalisieren mit dem Motorprotein Dynein in Fibroblasten

Nach der Demonstration der gerichteten Bewegung und der Mikrotubuli-Abhängigkeit der beobachteten EGFP-Dendrin-Vesikel ist immer noch die Frage offen, ob sich die Vesikel entlang der Mikrotubuli mit Hilfe eines der bekannten Motorproteine bewegen, wie z.B. Dynein, Kinesin oder der Familie der KIF-Proteine. Daher wurden Fibroblasten (NIH3T3), die am Tag zuvor mit dem Konstrukt *EGFP-Dendrin* durch Lipofektion transfiziert worden waren, fixiert, permeabilisiert und jeweils mit monoklonalem anti-Maus-Dynein (intermediate chain) IgM- bzw. anti-Maus-Kinesin IgM-Primärantikörpern gefärbt. Als Zweitantikörper diente in diesen Fällen ein anti-Maus IgM-Antikörper, der mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff *cy3* gekoppelt war. Abbildungen 14 zeigt *EGFP-Dendrin* exprimierende Fibroblasten, die mit dem anti-Kinesin-Antikörper gefärbt sind (*cy3*-Fluoreszenz). Aufgrund der sehr starken endogenen Expression von Kinesin in der gesamten Zelle läßt sich schwer entscheiden, ob zwischen den EGFP-Dendrin-Vesikeln und Kinesin eine Kolokalisation und somit mögliche Assoziation miteinander vorliegt. Es sieht jedoch mit größerer Wahrscheinlichkeit nicht nach einer Kolokalisation von Dendrin und Kinesin in der Zelle aus. Die Abbildungen 15, 16, 17, 18 und 19 zeigen *EGFP-Dendrin* exprimierende Fibroblasten, die hingegen mit einem *cy3*-detektierten anti-Dynein-Primärantikörper gefärbt sind. Wie die Abbildungen demonstrieren, ergeben sich hier zwischen den EGFP-Dendrin-Transportvesikeln und endogen exprimiertem Dynein sehr eindeutige Kolokalisationen, was eine funktionelle Interaktion zwischen Dendrin und dem Motorprotein Dynein zu Transportzwecken recht wahrscheinlich macht. Besonders Abb. 16, die einen vergrößerten Ausschnitt aus Abb. 15 beinhaltet, zeigt, daß die meisten EGFP-Dendrin-Vesikel (16A, in grün) und Dynein-Vesikel (16B, in rot) eindeutig kolokalisieren (16C, in gelb). Dennoch sind in Abb. 16 auch einige Dynein-Vesikel in rot zu erkennen, die nicht mit Dendrin kolokalisieren, was nicht überraschen sollte, da das Motorprotein Dynein außer dem hier stark überexprimierten Dendrin auch noch zahlreiche andere Ziel-Moleküle besitzt. Abbildung 16C zeigt allerdings auch einige wenige EGFP-Dendrin-Vesikel in grün, die nicht mit Dynein kolokalisieren, was möglicherweise darauf hinweisen könnte, daß Dynein nicht das einzige Motorprotein sein könnte, das beim Dendrin-Transport eine Rolle spielt.

Dynein ist ein Motorprotein, das unter ATP-Verbrauch Proteine in Richtung Minusende der Mikrotubuli transportiert. Da die Mikrotubuli in Axonen polarisiert sind, d.h. alle parallel mit ihrem Minusende in Richtung Zellkörper liegen, ist Dynein in Axonen für den retrograden Proteintransport zuständig. Ob Dynein also den anterograden oder retrograden Dendrin-Transport unterstützt, hängt von der Orientierung der Mikrotubuli in den Zellfortsätzen der Fibroblasten ab.

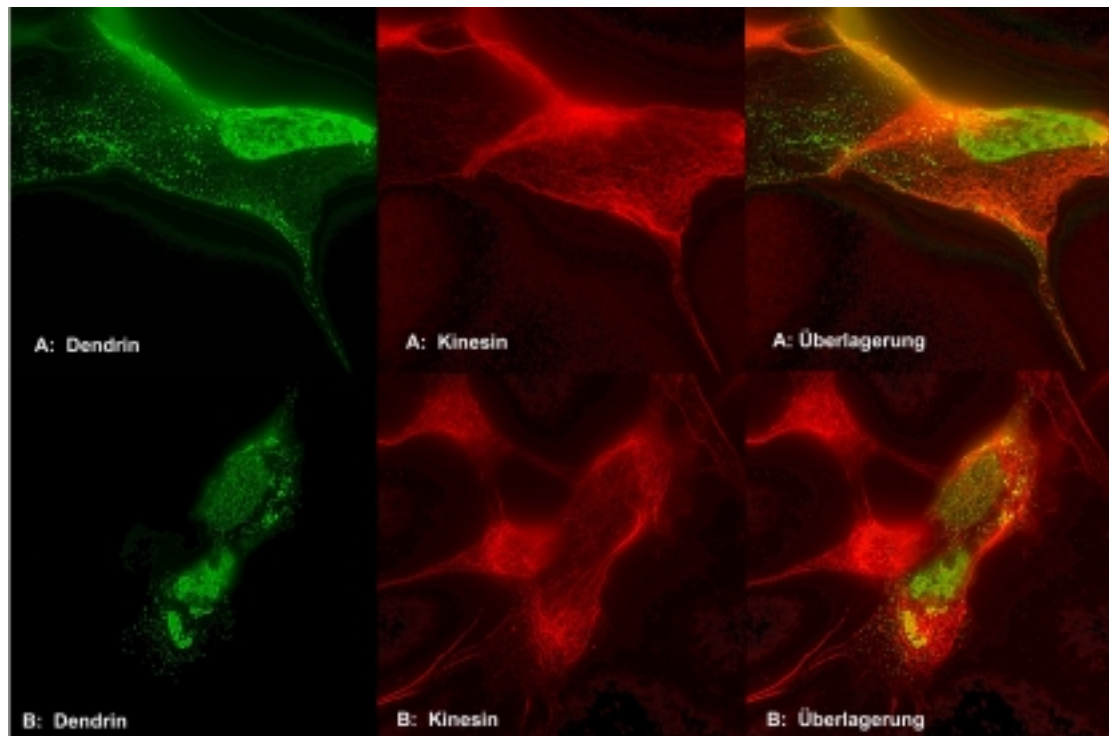


Abb. 14: Die Bilderserien A und B zeigen unterschiedliche Fibroblasten, die mit dem Konstrukt für EGFP-Dendrin transfiziert und anschließend mit einem anti-Kinesin-Antikörper gefärbt wurden. Eine Kolokalisation von Kinesin mit den EGFP-Dendrin-Transportvesikeln kann in der überlagerten Darstellung beider Fluoreszenzkanäle nicht festgestellt werden.

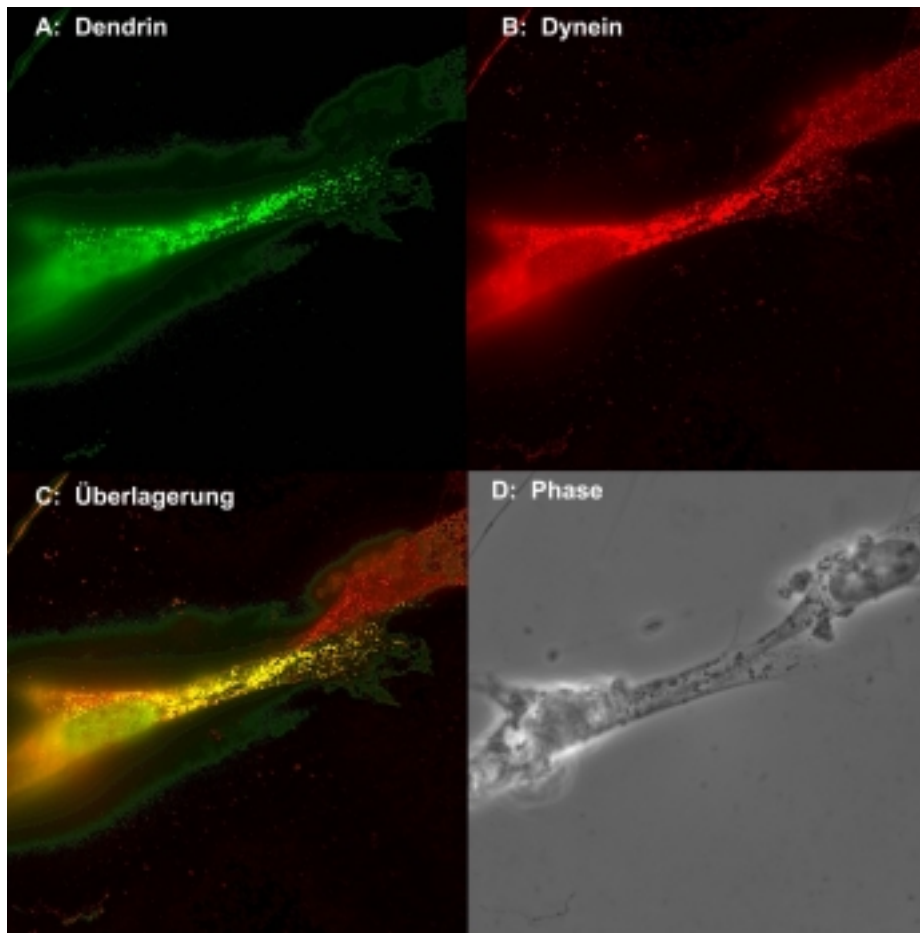


Abb. 15: Fibroblasten wurden mit dem Konstrukt für EGFP-Dendrin transfiziert und anschließend mit einem anti-Dynein-Antikörper gefärbt. Die Überlagerung der Fluoreszenzbilder zeigt deutlich die Kolokalisation der meisten EGFP-Dendrin-Vesikel mit Dynein.

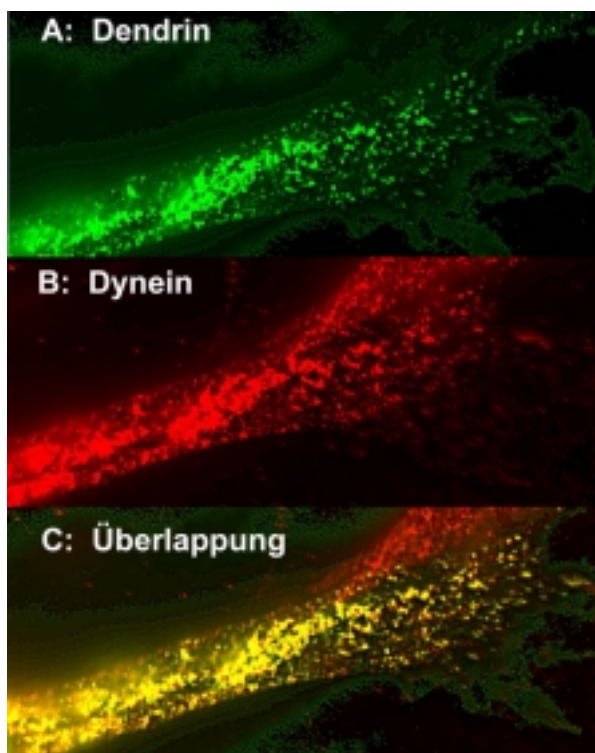


Abb. 16:
Vergrößerter Ausschnitt aus den Abb. 15 A-C.

Der Hauptanteil der dyneinhaltigen Transportvesikel kolokalisiert eindeutig mit den beobachteten EGFP-Dendrin-Vesikeln. Nicht kolokalisierende Dynein-Vesikel sind wahrscheinlich am Transport anderer Zielproteine beteiligt. Die sehr wenigen nicht mit Dynein kolokalisierenden dendrinhaltigen Vesikel könnten auf eine Beteiligung eines weiteren Motorproteins am vesikulären Proteintransport Dendrins hinweisen.

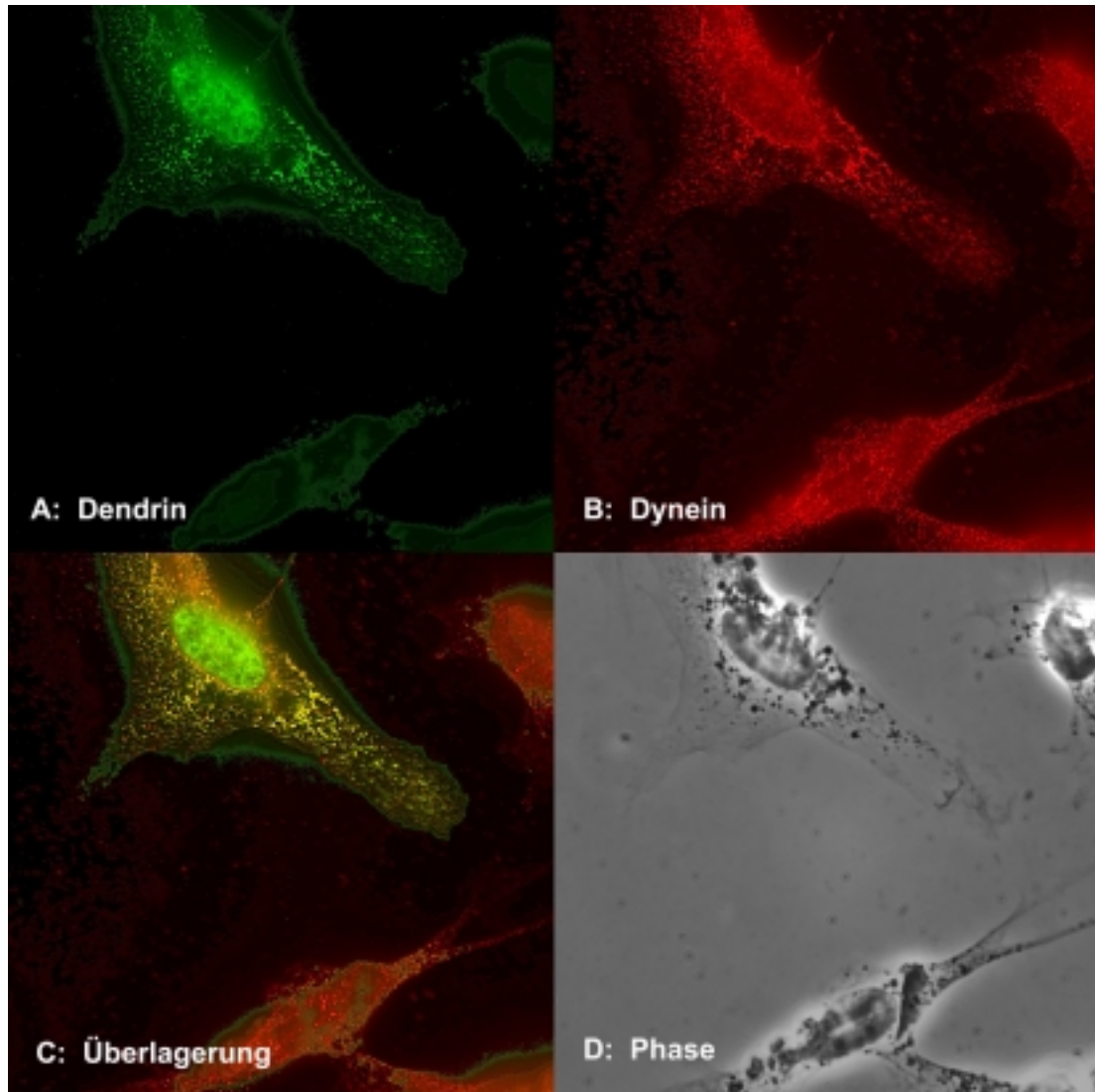


Abb. 17: Fibroblasten wurden mit dem Konstrukt für EGFP-Dendrin transfiziert und anschließend mit einem anti-Dynein-Antikörper gefärbt. Die Überlagerung der Fluoreszenzbilder (17 C) zeigt eine Kolo-kalisation der meisten EGFP-Dendrin-Vesikel mit Dynein.

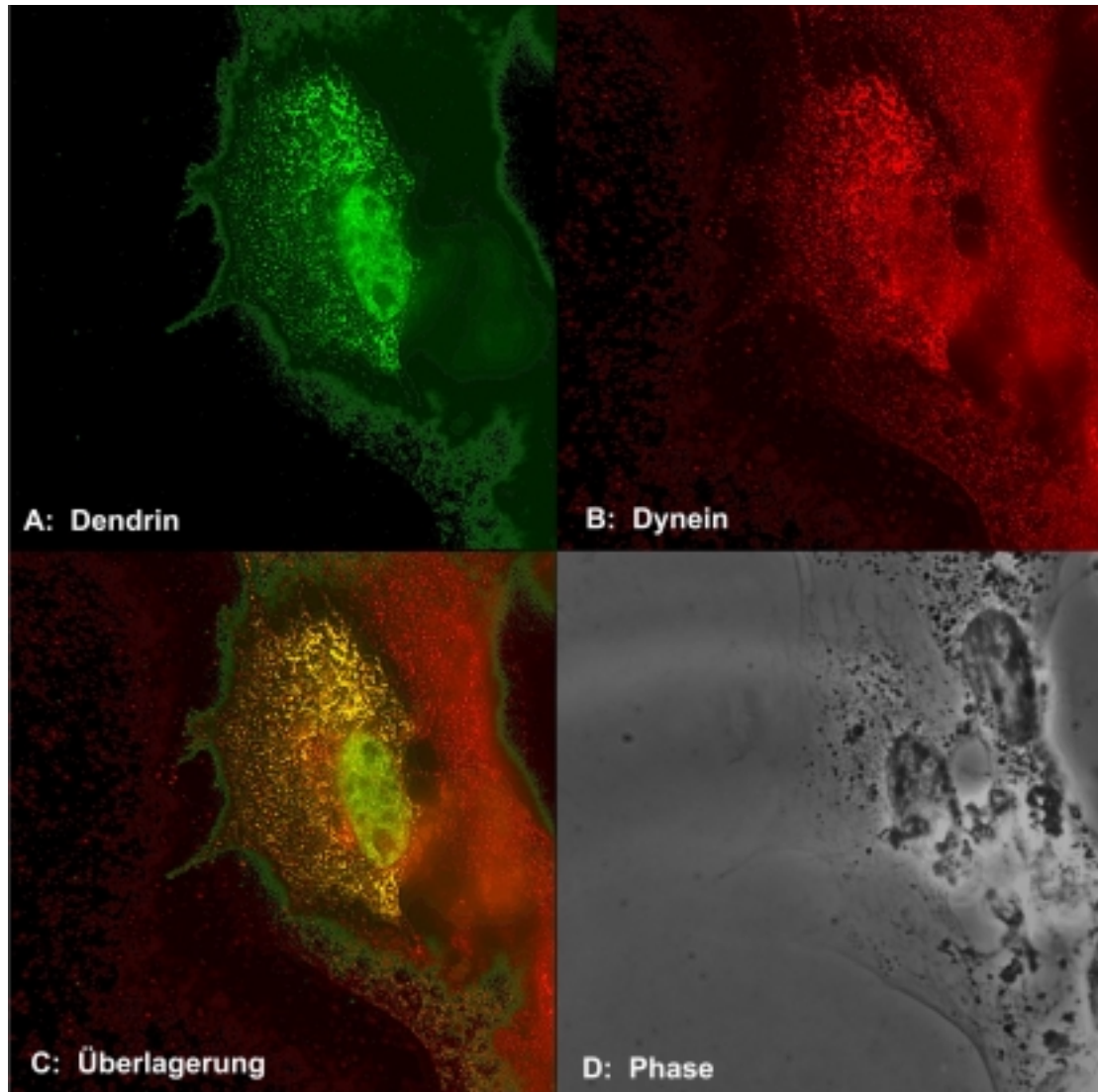


Abb. 18: Fibroblasten wurden mit dem Konstrukt für EGFP-Dendrin transfiziert und anschließend mit einem anti-Dynein-Antikörper gefärbt. Die Überlagerung der Fluoreszenzbilder (18 C) zeigt eine Kolokalisation der meisten EGFP-Dendrin-Vesikel mit Dynein.

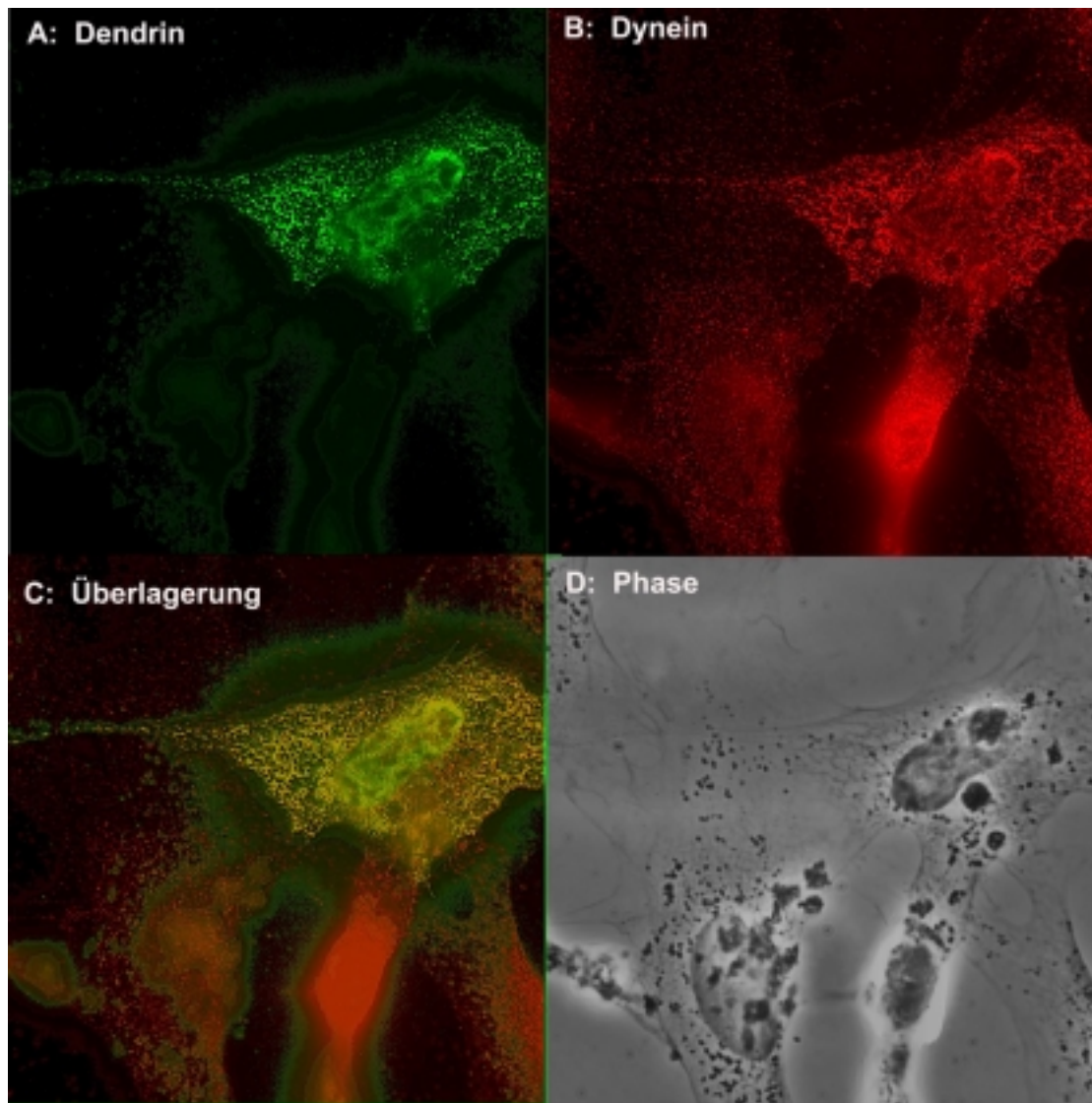


Abb. 19: Fibroblasten wurden mit dem Konstrukt für EGFP-Dendrin transfiziert und anschließend mit einem anti-Dynein-Antikörper gefärbt. Die Überlagerung der Fluoreszenzbilder (19 C) zeigt eine Kolokalisation der meisten EGFP-Dendrin-Vesikel mit Dynein.

3.1.7. Expression des EGFP-Dendrin-Fusionsproteins in hippokampalen Primärkultur-Neuronen der Ratte

Da alle zuvor beschriebenen Expressionsanalysen von EGFP-markiertem Dendrin in nicht-neuronalen Zellen wie Fibroblasten, Myoblasten und Podozyten durchgeführt wurden, war es notwendig, zumindest die intrazelluläre Verteilung des EGFP-Dendrin Fusionsproteins (Aminosäuren 1 bis 707) in neuronalen Primärkulturen zu bestätigen. Hierfür boten sich vor allem Primärkulturen aus Ratten-Hippokampus an, denn Dendrin ist in vivo gerade im Hippokampus stark exprimiert (Kapitel 3.4.1.).

Nach der Lipofektion des Konstrukts für EGFP-Dendrin in hippokampale Primärkulturen der Ratte zeigte sich in allen transfizierten Zellen die eindeutige Kernlokalisierung des Fusionsproteins, die schon zuvor in nicht-neuronalen Zellen beobachtet wurde (Abb. 20). Neben der Kernlokalisierung konnten in ca. zwei Drittel der transfizierten Neuronen dendrinhaltige, vesikuläre Strukturen im Soma und in den Neuriten beobachtet werden (Pfeile in Abb. 20 B und 20 C, Ausschnitt). In den restlichen transfizierten Neuronen war das EGFP-markierte Dendrin lediglich kernlokalisiert. Damit entspricht die in hippokampalen Neuronen beobachtete Verteilung Dendrins genau der Verteilung, die zuvor auch in nicht-neuronalen Zellen beobachtet wurde. Die in so vielen verschiedenen nicht-neuronalen Zelllinien (NIH3T3, C2C12, Podozyten, MDCK) sowie auch in hippokampalen Primärkulturen übereinstimmende Verteilung des EGFP-Dendrin-Fusionsproteins spricht für die Richtigkeit und die physiologische Relevanz dieser beobachteten intrazellulären Verteilung.

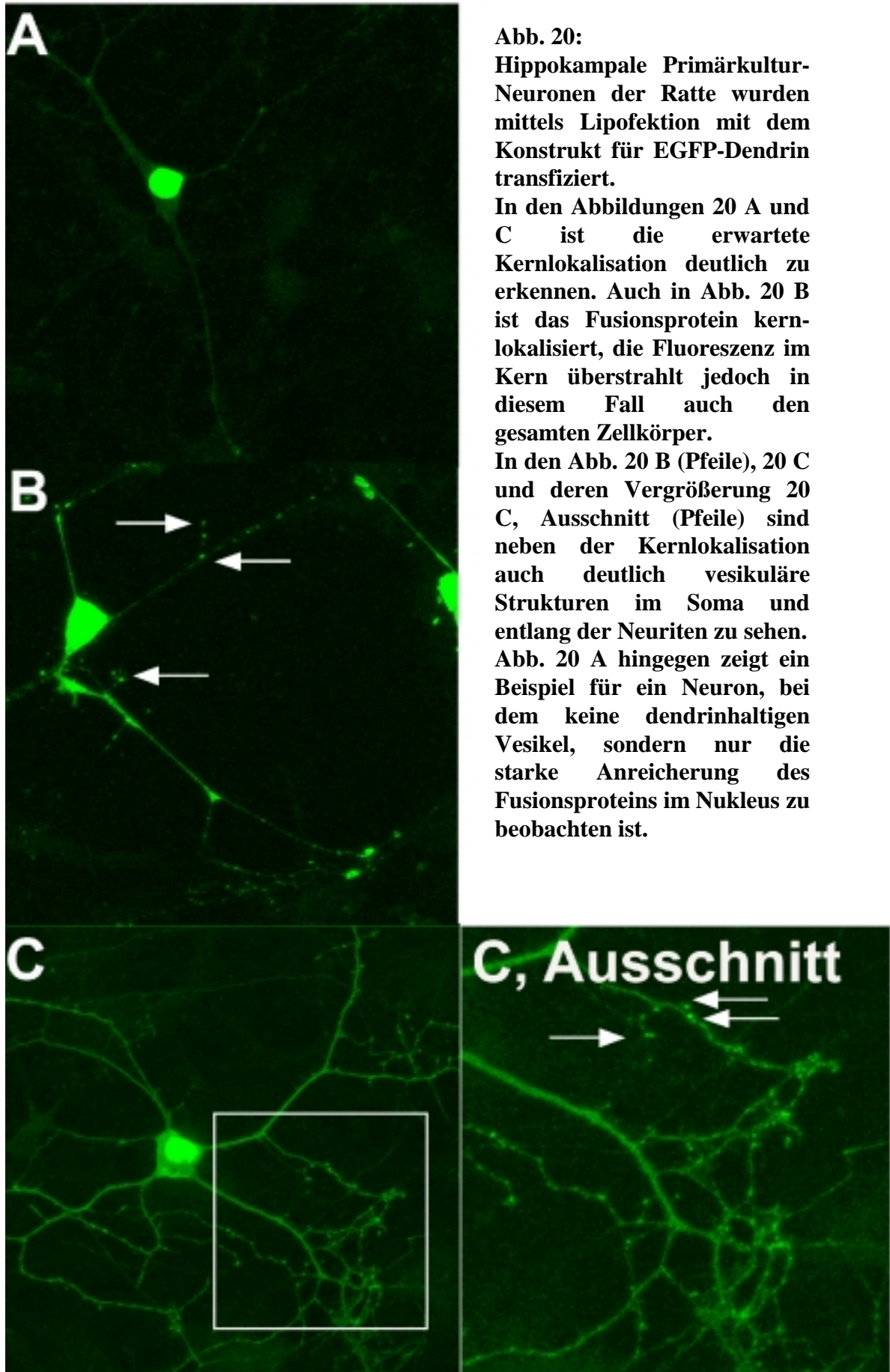


Abb. 20:

Hippokampale Primärkultur-Neuronen der Ratte wurden mittels Lipofektion mit dem Konstrukt für EGFP-Dendrin transfiziert.

In den Abbildungen 20 A und C ist die erwartete Kernlokalisierung deutlich zu erkennen. Auch in Abb. 20 B ist das Fusionsprotein kern-lokalisiert, die Fluoreszenz im Kern überstrahlt jedoch in diesem Fall auch den gesamten Zellkörper.

In den Abb. 20 B (Pfeile), 20 C und deren Vergrößerung 20 C, Ausschnitt (Pfeile) sind neben der Kernlokalisierung auch deutlich vesikuläre Strukturen im Soma und entlang der Neuriten zu sehen. Abb. 20 A hingegen zeigt ein Beispiel für ein Neuron, bei dem keine dendrinhaltigen Vesikel, sondern nur die starke Anreicherung des Fusionsproteins im Nukleus zu beobachten ist.

3.2. Inaktivierung des Gens Dendrin durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen der Maus

3.2.1. Isolierung des Dendrin-Gens

Die Konstruktion eines "*Targeting*"-Vektors für die homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen der Maus erfordert Kenntnisse über den Genabschnitt, der in der transgenen Maus verändert werden soll. Um diesen Genabschnitt manipulieren zu können, müssen Exon-Intron-Organisation und die Lage der vorhandenen Restriktionsenzymstellen bekannt sein.

Zur Isolierung möglichst großer Teile des Dendrin-Gens der Maus wurde eine genomische DNS-Bank von 129SV-Mäusen mit zwei verschiedenen Dendrin-cDNS-Sonden der Ratte nach homologen genomischen Maus-Sequenzen durchmustert (*Homologie-Screening*). Die beiden Ratten-cDNS-Sonden wurden ausgehend von einem *Blueskript*-Plasmid, in das die gesamte Dendrin-cDNS der Ratte inkloniert worden war, durch Polymerase Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Die erste Ratten-cDNS-Sonde (5'-Sonde), die die ersten 720 bp der Dendrin-cDNS umfaßte, wurde mit Hilfe der Oligonukleotide *DEN-2HS-1a* und *DEN seq 13* durch PCR hergestellt. Zur Amplifikation der zweiten Ratten-cDNS-Sonde (3'-Sonde), die aus den letzten translatierten 390 bp der Dendrin-cDNS bestand, dienten die Oligonukleotide *rDEN19s* und *DEN-2HS-1c*. Mit diesen beiden Sonden, die zu dem 5'-Ende (5'-Sonde) bzw. zu dem 3'-Ende (3'-Sonde) des kodierenden Bereiches des Dendrin-Gens homolog waren, wurden im *Homologie-Screening* sechs genomische λ -Klone isoliert (Klone 1 bis 6), die mit beiden Sonden hybridisierten und demnach den gesamten kodierenden Bereich des Dendrin-Gens umfaßten.

3.2.2. Ermittlung der Exon-Intron-Struktur und Kartierung des Dendrin-Gens

Aus den mit beiden Sonden hybridisierenden genomischen λ -Klonen 1,3,4 und 5 wurde jeweils λ -DNS isoliert und die genomische DNS über einen *Sall*-Restriktionsenzymchnitt in den *pBlueskript SKII*-Vektor umkloniert. Durch Restriktionsschnitte, *Southern Blot*-Analyse und Sequenzanalyse von Sub- und Deletionsklonen dieser verschiedenen Plasmide wurden die aus den verschiedenen λ -Klonen erhaltenen Genabschnitte des Dendrin-Gens in groben Zügen kartiert. Zur Feinkartierung und zur Ermittlung der Exon-Intron Organisation des Gens wurden diverse Oligonukleotide synthetisiert, deren Sequenzen über die gesamte kodierende Region und die 3'UTR verteilt waren. Mit Hilfe dieser Oligonukleotide konnten ausgehend von der cDNS oder der genomischen DNS kleinere cDNS- bzw. Genfragmente durch PCR amplifiziert werden. Durch Vergleich der Fragmentgrößen

der amplifizierten cDNS- und Genfragmente wurde schließlich ermittelt, in welchen Genregionen sich Exon-Intron-Übergänge befinden. So führte z. B. eine PCR mit den Oligonukleotiden *DEN-2HS-1a* und *den 11* ausgehend von Dendrin-cDNS bzw. ausgehend von genomischer Dendrin-DNS, sowie eine DNS-Sequenzierung mit denselben Oligonukleotiden zur Identifikation des einzigen Introns des Dendrin-Gens, eines 403 bp langen Introns, dessen Position exakt auf die Nukleotide 209/210 der cDNS (AC/GT....AG/GT) lokalisiert wurde.

Um weitere Sequenzinformationen über Genabschnitte in 5'-Richtung der kodierenden Region bzw. in 3'-Richtung der 3' UTR zu erhalten, wurden über die entsprechenden Genabschnitte PCR-Produkte von jeweils etwa 4 kb generiert, anschließend durch Beschallung und Behandlung mit der Nuklease *Bal 31* stochastisch in Fragmente mit Größen zwischen 1 kb und 300 bp zerlegt, die DNS-Strangenden wurden mit *T4-DNS-Polymerase* geglättet (Generierung von "blunt ends") und die Fragmente wurden in einen mit *EcoRV* linearisierten *pBlueskript SKII*-Vektor subkloniert. Schließlich wurden PCR-Produkte der einzelnen zufälligen Fragmente im *pBlueskript*-Vektor durch Kolonie-PCRs hergestellt und mit den *Blueskript*-Oligonukleotiden *T3* und *T7* sequenziert. Durch das Überlappen der sequenzierten Regionen der primären PCR-Produkte wurde die gesamte Nukleotidsequenz von insgesamt 12 kb des Dendrin-Gens ermittelt.

3.2.3. Aufbau des "Targeting-Vektors"

Als Vektor für das "gene targeting"-Konstrukt diente das Plasmid *pBlueskript SKII*. Für das Konstrukt wurde ein asymmetrischer Aufbau mit einem kurzen und einem langen rekombinogenen Arm gewählt, um eine PCR-Analyse für homologe Rekombinationsereignisse zu ermöglichen.

Als positiver Selektionsmarker für Rekombinationsereignisse im Genom der *R1* ES-Zellen (Nagy et al., 1993) wurde das Gen für die *Neomycin Phosphotransferase (neo)*, das eine Resistenz gegenüber *G418* (Geneticin) vermittelt, unter der Transkriptionskontrolle des *pgk*-Promoters verwendet. Um die Entfernung des *neo*-Gens nach der homologen Rekombination zu ermöglichen, wurde es von zwei gleich orientierten *LoxP*-Elementen flankiert, die als Erkennungssequenz für die *Cre*-Rekombinase des *E.coli*-Phagen *P1* dienen ("gefloxtes" *neo*-Gen, Gu et al., 1993). Nach Eliminierung des DNS-Bereichs zwischen den beiden *LoxP*-Elementen bleibt ein *LoxP*-Element (34 bp) zurück -inklusive der in diesem Falle ca. 50 bp Klonierungssequenzen, die in 5'-Richtung des *LoxP*-Elements eine diagnostische *EcoRI*-Schnittstelle für die *Southern Blot* -Analyse der Rekombinationsereignisse enthalten. Für den Einbau des "gefloxten" *neo*-Gens wurde das einzige, 403 bp Intron des *DEN*-Gens ausgewählt. Ein zusätzliches *LoxP*-Element wurde in eine endogene *PstI*-Restriktionsschnittstelle kloniert, die etwa 1,5 kb vom Transkriptionsende der

DEN-mRNS lokalisiert ist. Auf diese Weise flankieren dieses *LoxP*-Element und das nach Entfernung des "geflochten" *neo*-Gens zurückgebliebene *LoxP*-Element das gesamte zweite, 3,4 kb große Exon des DEN-Gens einschließlich der kompletten 3'UTR.

Nach Kreuzung der durch *gene targeting* manipulierten Mäuse mit einer Mauslinie, die die *Cre*-Rekombinase des *E.coli*-Phagen *P1* (Gu et al., 1993) unter der Transkriptionskontrolle eines zellspezifischen Promoters exprimiert, sollte das zweite, 3,4 kb Exon im DEN-Genlocus der Nachkommen zeit- und zellspezifisch entfernt werden und so zur Expression eines C-terminal stark trunkierten und mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht funktionsfähigem DEN-Protein führen. Ein solcher sogenannter "*konditionaler knock-out*", d.h. zeit- und zellspezifischer *knock-out* wird der klassischen *knock-out*-Strategie immer dann vorgezogen, wenn zu befürchten ist, daß die Gen-Inaktivierung pränatal oder im frühen postnatalen Stadium einen lethalen Phänotyp zur Folge hat und daher eine Analyse der transgenen Tiere mit der klassischen *knock-out*-Strategie nicht möglich wäre. Dies trifft vor allem dann zu, wenn embryonal exprimierte Gene ausgeschaltet werden sollen. Da die Rolle Dendriten bei der Embryonalentwicklung nicht bekannt ist, wurde eine konditionale *knock-out*-Strategie gewählt, um Schwierigkeiten bei der Phänotypen-Analyse durch einen möglicherweise lethalen Phänotyp auszuschließen.

Der "*gene targeting*"-Vektor enthielt, relativ zum *neo*-Gen gesehen, ungefähr 9 kb 5'-Sequenzen als langen und, relativ zum einzelnen *LoxP*-Element gesehen, ca. 1 kb 3'-Sequenzen als kurzen rekombinogenen Arm. Die Nähe des einzelnen *LoxP*-Elements zum Ende des kurzen rekombinogenen Arms ermöglichte eine PCR-Identifizierung der homolog rekombinierten Klone, in denen nicht nur der *neo*-Selektionsmarker, sondern auch das einzelne *LoxP*-Element homolog rekombiniert wurde.

Zur Erleichterung der *Southern Blot*-Analysen wurden diverse diagnostische Restriktionsenzymstellen in das *Targeting*-Konstrukt eingeführt, wie z.B. EcoRI-Schnittstellen unmittelbar stromaufwärts (in 5'-Richtung) des "geflochten" *neo*-Gens und in unmittelbarer Nähe des einzelnen *LoxP*-Elements. Eine weitere diagnostische HindIII-Schnittstelle wurde durch Einklonierung eines HindIII-Adapters in eine endogene SacI-Schnittstelle in der Mitte des kurzen rekombinogenen Arms des Konstruktes geschaffen und sollte zur schnellen Identifikation von spezifischen PCR-Produkten homolog rekombinierter ES-Zellklone dienen.

Zusätzlich wurde im *Targeting*-Vektor ein 364 bp PstI/PstI-Fragment der Mausequenz aus dem zweiten Exonbereich gegen die entsprechende Sequenz der Ratte ausgetauscht, wobei eine der dadurch eingeführten, meist stillen Mutationen eine neue SacI-Schnittstelle im mutierten DEN-Allel erzeugt. Diese Mutationen sollten in heterozygoten transgenen Mäusen dazu dienen, die Höhe des Expressionsniveaus des mutierten DEN-Allels im direkten Vergleich zum Expressionsniveau des Wildtyp-Allels auf mRNA-Ebene quantifizieren zu können.

Sämtliche kodierende, PCR-generierte und zur Klonierung verwendete Sequenzbereiche wurden abschließend durch Sequenzanalyse überprüft, um unerwünschte Veränderungen festzustellen.

3.2.4. Klonierung des "*Targeting*-Vektors"

Als Ausgangsprodukt für die Klonierung des *Targeting*-Vektors diente der etwa 12 kb lange und völlig sequenzierte DEN-Genabschnitt, der aus dem λ -Phagenklon 4 in beiden möglichen Orientierungen in den Vektor *Blueskript SKII* über Sal I-Schnittstellen inkloniert worden war (Subklone 9 und 13, Abb. 21). Aus diesen beiden DEN-Subklonen 9 und 13 wurden die entsprechenden 5'-und 3'-Genabschnitte durch zwei aufeinander folgende Restriktionsenzymsschnitte mit Xho I und SpeI und jeweils anschließender Selbstligation deletiert. Nach diesen Deletionen umfaßte Subklon 9 nur noch den DEN-Genabschnitt, der mit der SpeI-Schnittstelle im Intron Dendrins begann und mit der XhoI-Schnittstelle in der 3'UTR Dendrins endete. Anschließend wurde in Subklon 9 ein 364 bp PstI/PstI-Fragment aus der kodierenden Region von Exon 2 herausgeschnitten und durch das entsprechende Fragment der Ratte ausgetauscht zur Einführung stiller Mutationen im kodierenden Bereich des mutierten Allels. Mit der Klonierung eines Adaptors mit den Schnittstellen SpeI-EcoRI-MluI in die mit dem *Klenow-Fragment* der *DNS-Polymerase I* (*E. coli*) geglättete SpeI-Schnittstelle des Introns wurde die spätere Einklonierung der "geflochten" *neo*-Kassette vorbereitet. Dieser so manipulierte Genabschnitt aus Subklon 9 wurde schließlich über die SpeI-Schnittstelle im Intron und die XhoI-Schnittstelle in der 3'UTR Dendrins in den Phagenklon 3 (Subklon 5, Abb. 21) kloniert, wodurch diesem Genabschnitt ein etwa 9 kb umfassender rekombinogener 5'-Arm zugefügt wurde. Danach erfolgte die Einklonierung der "geflochten" *pgk-neo*-Kassette über die EcoRI- und die MluI-Schnittstellen des Adaptors in das Intron Dendrins. Die Klonierung der 5'-Region des *Targeting*-Vektors war damit abgeschlossen.

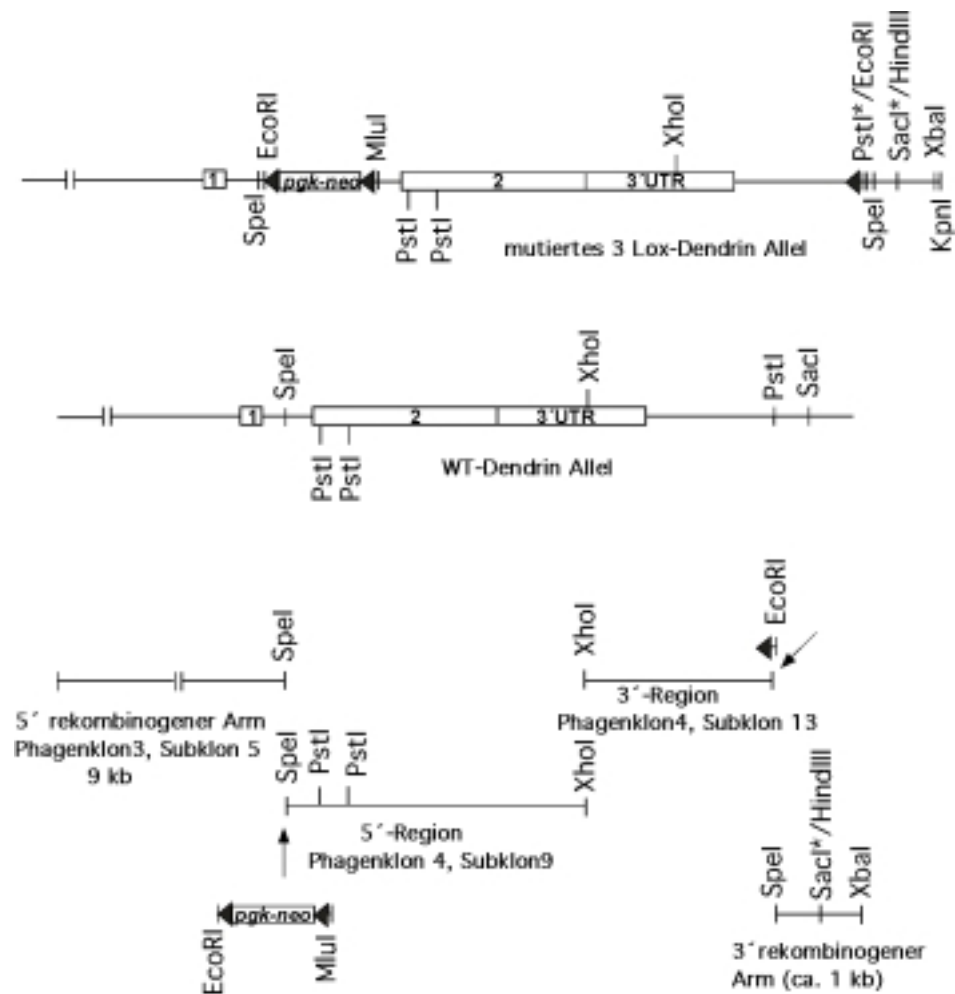


Abb.21: Darstellung des mutierten Dendrin-Allels, des WT-Dendrin-Allels und der Phagensubklone, die zur Klonierung des mutierten 3 *Lox*-Dendrin-Allels genutzt wurden.

Der zur Klonierung der 3'-Region verwendete Subklon 13 des Phagenklons 4 umfaßte nach den oben erwähnten Deletionen einen Genabschnitt, der an der *Xho*I-Schnittstelle in der 3'UTR begann und an einer *Pst*I-Schnittstelle endete, die sich 1,5 kb in 3'-Richtung des Transkriptionsendes befand. Da das einzelne *LoxP*-Element in diese *Pst*I-Schnittstelle kloniert werden sollte, wurde zunächst ein *Eco*RI-Adaptor in die der *Pst*I-Schnittstelle unmittelbar benachbarten *Sma*I-Schnittstelle kloniert. Diese artifizielle *Eco*RI-Schnittstelle sollte als diagnostische Schnittstelle zur Überprüfung der Anwesenheit des einzelnen *LoxP*-Elements in rekombinierten Klonen mittels *Southern Blot*-Analyse dienen. Anschließend wurde ein *LoxP*-Element-haltiger Adaptor mit kohäsiven *Pst*I-Enden in der korrekten Orientierung in die endogene *Pst*I-Schnittstelle, die 1,5 kb vom Transkriptionsstop entfernt war, inkliniert. Der kurze rekombinogene 3'-Arm von 1 kb wurde mit Hilfe der Oligonukleotide *mDEN32s* und *mDEN34as* durch PCR hergestellt, durch die Einklonierung eines Adaptors mit einer diagnostischen *Hind*III-Schnittstelle in eine endogene *Sac*I-Schnittstelle verändert und

schließlich über die Restriktions-schnittstellen SpeI und XbaI in den Subklon 13 des Phagenklons 4 eingeführt. Nach dem Einfügen der so manipulierten, gesamten 3'-Region in die zuvor beschriebene 5'-Region über die Schnittstellen XhoI und KpnI war die Klonierung des *Targeting*-Vektors abgeschlossen. Zur Linearisierung des *Targeting*-Vektors am Ende des kurzen rekombinogenen Arms diente die dort befindliche KpnI-Schnittstelle.

3.2.5. Homologe Rekombination

Zur homologen Rekombination wurden Zellen der embryonalen Maus-Stammzelllinie RI (Gu et al., 1993) mit KpnI-linearisiertem *Targeting*-Vektor durch Elektroporation transformiert und anschließend einer Selektion mit *G418* enthaltendem Medium unterworfen. Resistente ES-Zellkolonien wurden isoliert und deren genomische DNS wurde durch zwei verschiedene "geschachtelte" PCR-Reaktionen auf homologe Rekombinationsereignisse hin untersucht (Abb. 22).

Bei diesen diagnostischen PCR-Reaktionen lagen die 5'-Sinn-Oligonukleotide, *pLoxP-1s* und *pLoxP-2s*, in den exogenen Sequenzen des einzelnen *LoxP*-Elements am 5'-Ende des kurzen rekombinogenen Arms und in den angrenzenden -ebenfalls exogenen- Relikten einer multiplen Klonierungssequenz des Vektors *Blueskript SKII*-. Dadurch konnten nur solche Klone zu einem positiven PCR-Ergebnis führen, die nicht nur die "gefloxt" *pgk-neo*-Kassette integriert hatten und daher *G418* resistent waren, sondern zusätzlich auch das einzelne *LoxP*-Element integriert hatten. Die 3'-Gegensinn-Oligonukleotide, *mDEN30as* und *mDEN33as*, befanden sich hingegen außerhalb des *Targeting*-Konstruktes, stromabwärts des kurzen Rekombinationsarms, und führten deshalb nur dann zu einer spezifischen PCR-Amplifikation, wenn in dem entsprechenden Klon die "gefloxt" *pgk-neo*-Kassette und das einzelne *LoxP*-Element homolog rekombiniert, d. h. im korrekten Genort integriert worden waren. Im Fall einer homologen Rekombination des gesamten *Targeting*-Bereiches ergab sich somit für die Oligonukleotid-Kombination *pLoxP-1s* und *mDEN30as* ein 1200 bp und für die Kombination *pLoxP-2s* und *mDEN33as* ein 1000 bp PCR-Produkt.

Da Oligonukleotide wie *pLoxP-1s* und *pLoxP-2s*, die Sequenzteile des *LoxP*-Elementes umfassen, aufgrund ihrer A/T-reichen Nukleotidsequenz erfahrungsgemäß problematisch sind, d.h. zum Teil mit Fremdsequenzen hybridisieren, wurde ebenfalls eine alternative PCR-Strategie zur Analyse der isolierten ES-Zellkolonien angewandt. Hierbei wurden zunächst 30 PCR-Zyklen mit den Oligonukleotiden *mDEN28s* und *mDEN30as* zur Amplifikation des Wildtyp- und des rekombinierten Allels durchgeführt, was zu einer Anreicherung des spezifischen PCR-Produktes der homolog rekombinierten Klone führte. Eine 1:1000-Verdünnung dieser ersten PCR wurde schließlich einer PCR-Reaktion mit lediglich 25 Zyklen mit den problematischen *LoxP*-Oligonukleotiden unterworfen. Durch die geringe Zyklenzahl

mit *LoxP*-Oligonukleotiden sollten unspezifische PCR-Amplifikationen vermieden werden. Mit Hilfe dieser PCR-Analysen konnten unter 1300 isolierten, *G418*-resistenten ES-Zellkolonien zwei Kolonien mit homologer Rekombination identifiziert werden. Durch die diagnostischen Restriktionsverdauungen der resultierenden PCR-Produkte mit *HindIII* und *SacI* konnte weiterhin gezeigt werden, daß bei beiden positiven ES-Zellkolonien die homologe Rekombination bis mindestens zur Mitte des kurzen Rekombinationsarms erfolgt war, und somit neben der *G418*-Resistenz vermittelnden *pgk-neo*-Kassette auch das einzelne *LoxP*-Element homolog rekombiniert sein mußte. Die Anwesenheit des einzelnen *LoxP*-Elementes konnte ebenfalls durch DNS-Sequenzierung der spezifischen PCR-Produkte der beiden positiven ES-Zellkolonien nachgewiesen werden.

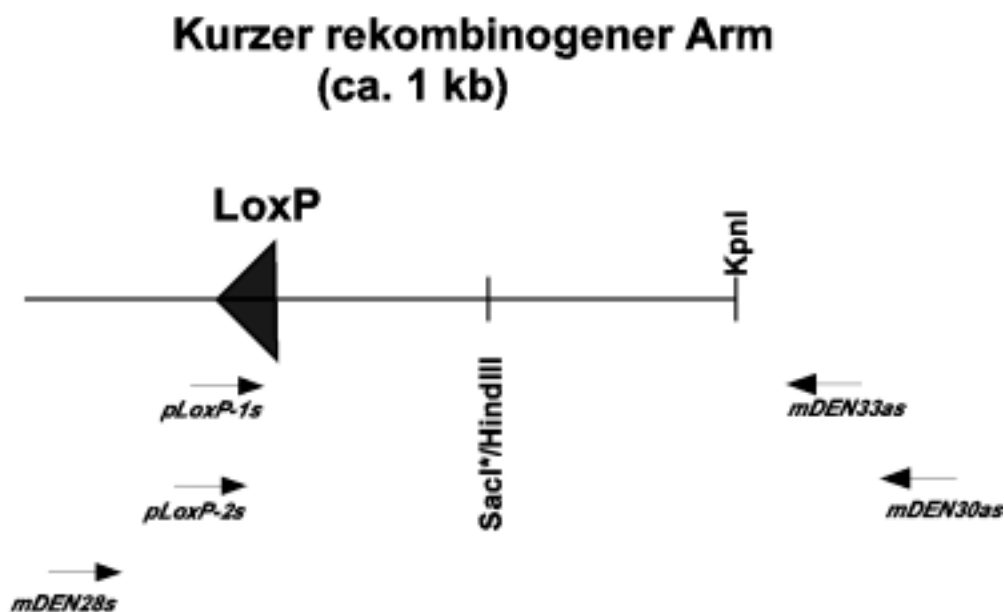


Abb. 22: PCR-Analyse von ES-Zell-DNS zur Detektion homolog rekombinierter 3 *Lox*-Rekombinationsereignisse.

Zur Bestätigung der homologen Rekombination bei den beiden PCR-positiven ES-Zellklonen 85.3 und 167.4 wurden genomische *Southern Blot*-Analysen durchgeführt. Als diagnostische Restriktionsschnittstelle des mutierten Dendrin-Locus diente die An- bzw. Abwesenheit der endogenen *PstI*-Schnittstelle, die ca. 1,5 kb vom Transkriptionseende der DEN-mRNS entfernt ist. Im *Targeting*-Konstrukt wurde in diese endogene *PstI*-Schnittstelle -wie zuvor beschrieben- ein *LoxP*-Adapter, der das einzelne *LoxP*-Element umfaßt, einkloniert. Die endogene *PstI*-Schnittstelle wurde bei diesem Klonierungsschritt zerstört und war daher im vollständig homolog rekombinierten Allel nicht mehr vorhanden, während sie im Wildtyp-Allel als auch im partiell rekombinierten Zustand - bei Anwesenheit der "gefloxten" *neo*-Kassette und Abwesenheit des einzelnen *LoxP*-Elements - vorhanden war.

Um die erfolgreiche Rekombination im korrekten Genlocus zu bestätigen, wurde für eine erste *Southern Blot*-Analyse die Hybridisierungssonde 1 (Abb. 23) verwendet, die außerhalb des *Targeting*-Konstruktes liegt, und zwar in 3'-Richtung des kurzen Rekombinationsarms. Wie aus Abbildung 23 ersichtlich ist, kann bei beiden PCR-positiven ES-Zellklonen (85.3 und 167.4) neben der 2,6 kb Wildtyp-Bande auch eine - aufgrund der fehlenden endogenen PstI-Schnittstelle- vergrößerte 7,1 kb Bande im genomischen *Southern Blot* mit der externen Sonde 1 detektiert werden.

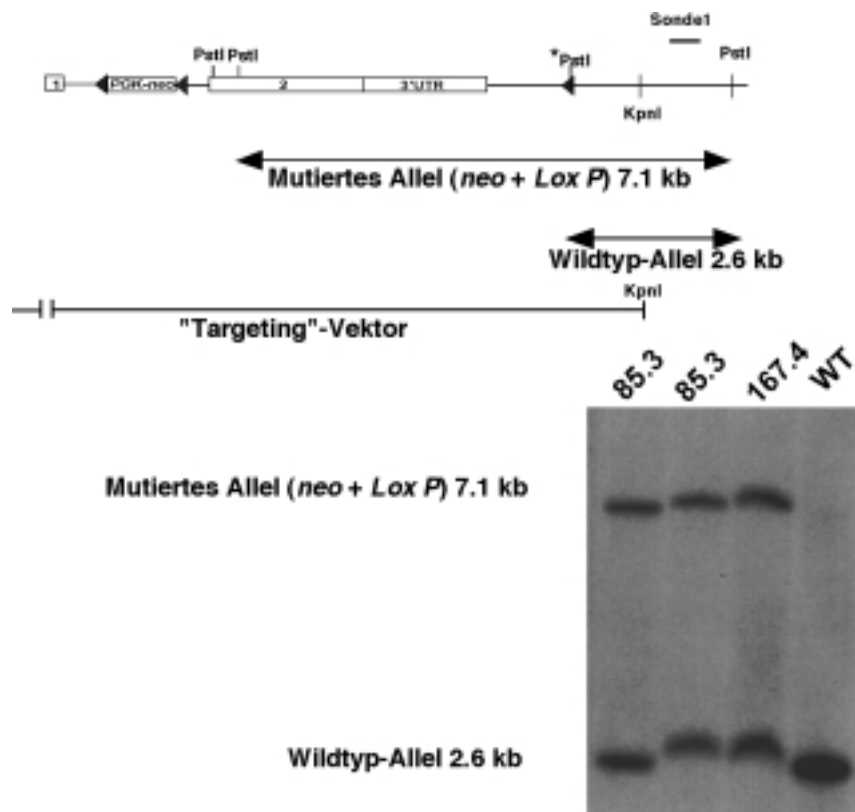


Abb. 23: Southern Blot-Analyse der mit PstI geschnittenen genomischen DNS der Klone 85.3 und 167.4 mit der Sonde 1.

Die *Southern Blot*-Analysen, bei denen die externe Hybridisierungssonde 1 verwendet wurde, geben nur Aufschluß über homologe Rekombinationsereignisse (d.h. Rekombinationsereignisse im Dendrin-Genlocus), nicht aber über eventuelle zusätzliche unerwünschte heterologe Rekombinationen des *Targeting*-Konstruktes in andere Genorte. Um solche unerwünschten zusätzlichen Rekombinationsereignisse in den beiden positiven ES-Zellkolonien auszuschließen, wurden die Signale der Sonde 1 vom *Southern Blot* abgewaschen ("Strippen des Blots") und der *DNS-Blot* wurde rehybridisiert mit einer zweiten internen Sonde 2, die mit den Oligonukleotiden *mDEN14s* und *mDEN16as* durch PCR amplifiziert worden war und die Nukleotide 311 bis 511 im zweiten Exon Dendrins umfaßte (Abb. 24).

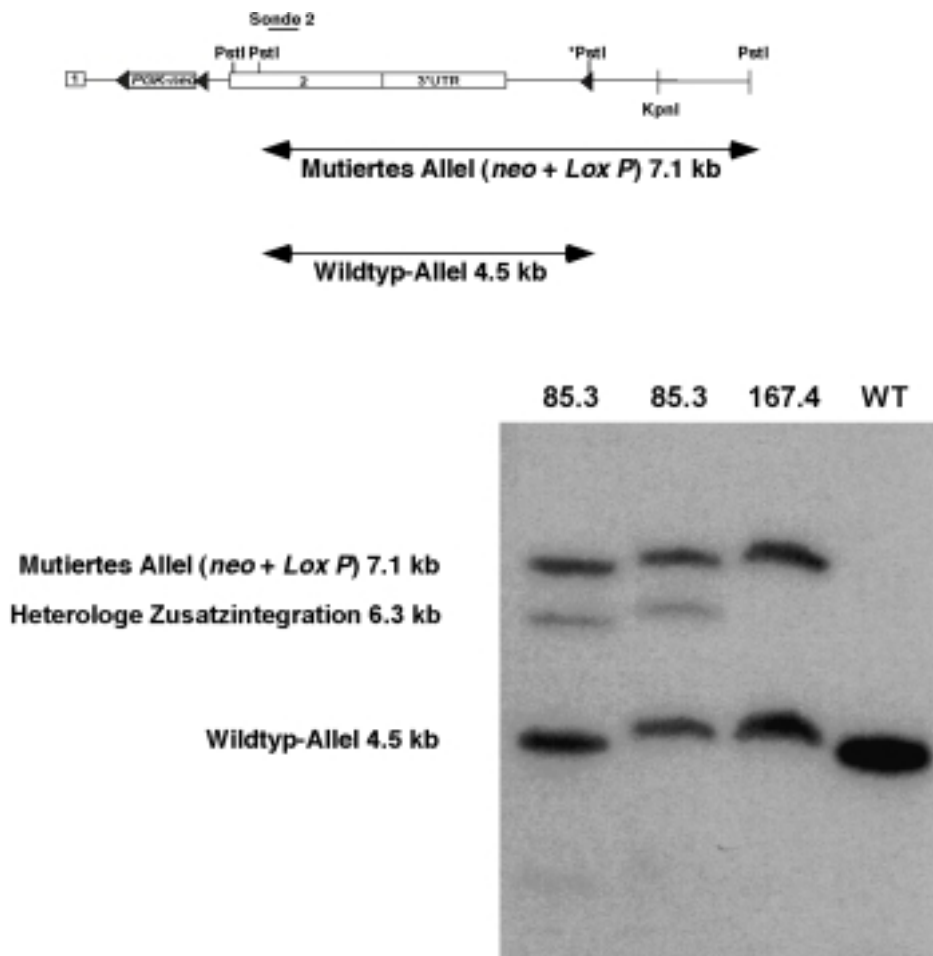


Abb. 24: Southern Blot-Analyse der mit PstI geschnittenen genomischen DNS der Klone 85.3 und 167.4 mit der internen Sonde 2 zur Detektion heterologer Zusatzintegrationen

Wie Abb. 24 zeigt konnte die interne Sonde 2 neben dem 4,5 kb WT-Fragment in den rekombinierten Klonen 85.3 und 167.4 zusätzlich das durch den Verlust der endogenen PstI-Schnittstelle auf 7,1 kb verlängerte rekombinierte PstI/PstI-Fragment detektieren. Für Klon 85.3 hybridisiert die interne Sonde 2 weiterhin mit einem 6,3 kb PstI/PstI-Fragment, was allerdings ein weit weniger intensives Signal hervorruft als die erwarteten Hybridisierungen mit dem WT- und dem rekombinierten Fragment. Eine Erklärung hierfür wäre z.B., daß es sich bei Klon 85.3 um einen Mischklon handelt zwischen einem korrekt homolog rekombiniertem Klon und einem Klon mit einem heterologen Rekombinationsereignis. Klon 167.4 hingegen zeigt in beiden Hybridisierungen mit den Sonden 1 und 2 keinerlei zusätzliche Banden und die ähnlichen Signalintensitäten der WT-Signale und der Signale des rekombinierten Allels schließen die Möglichkeit, es möge sich bei Klon 167.4 um einen Mischklon handeln, aus.

Zur weiteren Überprüfung des korrekten Rekombinationsereignisses in Klon 167.4 wurde die An- bzw. Abwesenheit einer weiteren diagnostischen Restriktions-

schnittstelle, der EcoRI-Schnittstelle in unmittelbarer Nähe des einzelnen *LoxP*-Elements, verwendet. Nach dem Schneiden der genomischen DNS des Klons 167.4 mit EcoRI, anschließender Übertragung dieser geschnittenen DNS auf eine Nylon-Membran und einer Hybridisierung mit Sonde 1 konnte neben der 18 kb WT-Bande eine auf 1,8 kb reduzierte Bande des mutierten Allels detektiert werden, die aufgrund der homologen Rekombination des einzelnen *LoxP*-Elements und der unmittelbar benachbarten exogenen EcoRI-Schnittstelle zustande kommt (Abb. 25). Für Klon 85.3 konnte mit Sonde 1, die außerhalb des Targeting-Vektors liegt, eine weitere 9 kb umfassende Bande beobachtet werden. Dieses 9 kb-Fragment könnte von seiner Größe her genau dem homologen Rekombinationsprodukt entsprechen, das entsteht, wenn die "gefloxt" *pgk-neo*-Kassette, nicht aber das einzelne *LoxP*-Element homolog rekombiniert wurde. Klon 85.3 könnte demnach einen Mischklon aus einem vollständig homolog rekombinierten Klon -mit individuellem *LoxP*-Element- und einem partiell homolog rekombinierten Klon -ohne einzelnes *LoxP*-Element darstellen.

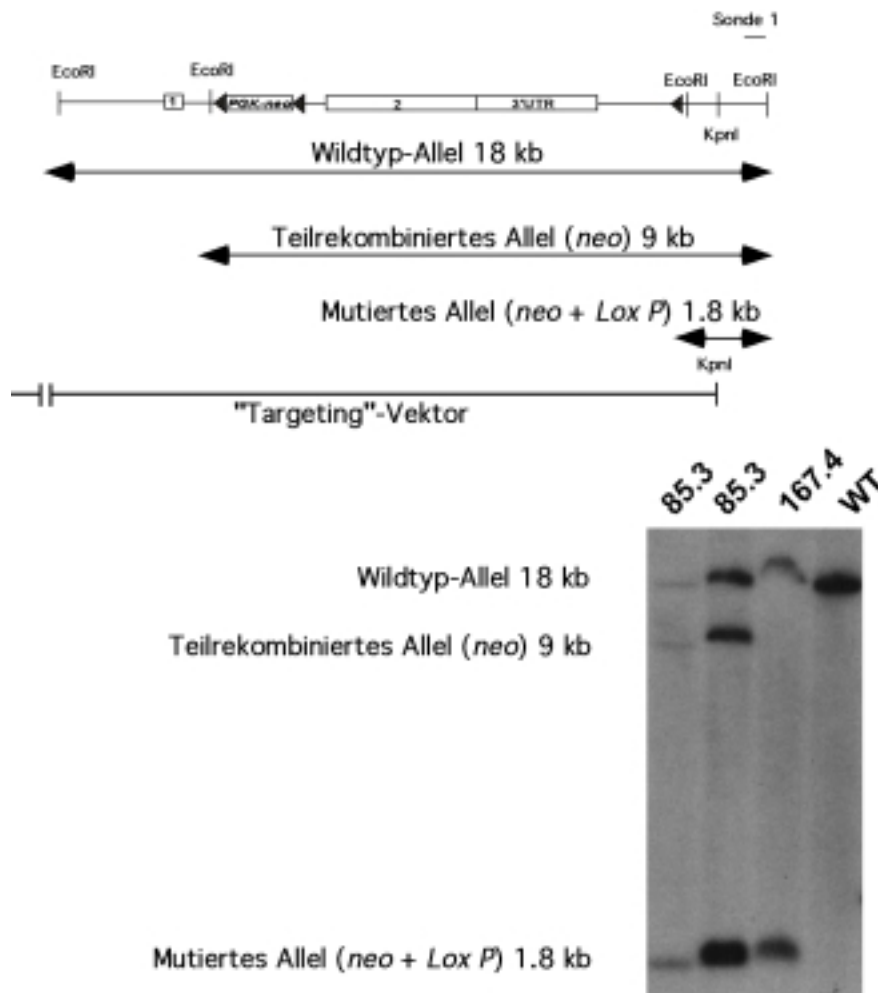


Abb. 25: Southern Blot-Analyse der mit EcoRI geschnittenen genomischen DNS der Klone 85.3 und 167.4 mit der externen Sonde 1.

Auch hier wurden die Hybridisierungssignale der Sonde 1 wieder vom *Southern Blot* entfernt ("Strippen des Blots"), um den *Blot* mit der internen Sonde 2 zur Detektion heterologer Zusatzintegrationen des *Targeting*-Vektors zu hybridisieren. Das Resultat zeigt Abb. 26: für Klon 85.3 läßt sich neben der erwarteten WT-Bande von 18 kb, der erwarteten Bande für das vollständig homolog rekombinierte Allel von 7 kb und der aufgrund voriger Ergebnisse ebenfalls erwarteten Bande des partiell homolog rekombinierten Allels von 9 kb sogar noch eine vierte nicht näher identifizierbare Bande von über 20 kb detektieren, was auf eine weitere Zusatzintegration hinweist. Klon 167.4 hingegen zeigt außer der WT-Bande (18 kb) und der vollständig homolog rekombinierten Fragmentbande (7 kb) keine weiteren Signale und damit keine unerwünschten heterologen Zusatzintegrationen. Weiterhin schließen die ausgeglichenen Intensitäten der Signale der jeweiligen WT- und mutierten Allele in allen *Southern Blots* aus, daß es sich bei Klon 167.4 um einen Mischklon handeln könnte.

Aufgrund dieser Resultate wurden ES-Zellen des Klons 167.4 zur Injektion in Blastozysten ausgewählt.

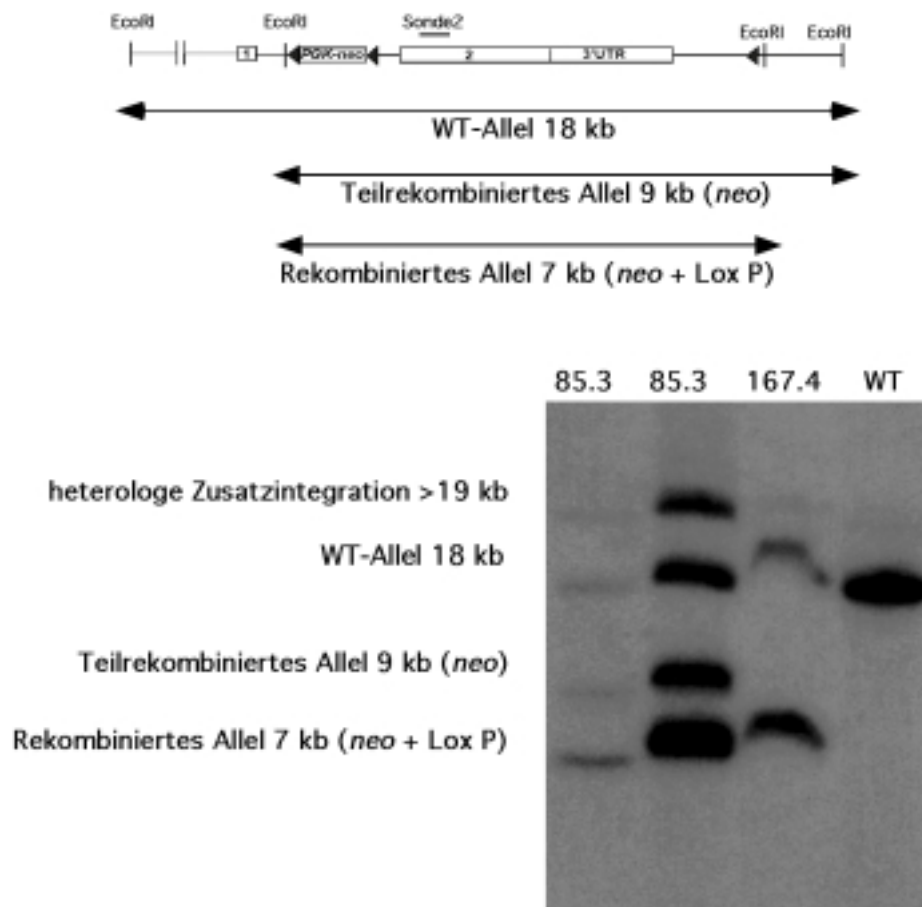


Abb. 26: *Southern Blot*-Analyse der mit EcoRI geschnittenen genomischen DNS der Klone 85.3 und 167.4 mit der internen Sonde 2 zur Detektion heterologer Integrationsereignisse.

3.2.6. Cre-Rekombination in einem homolog rekombinierten ES-Zellklon

Zur Eliminierung des *neo*-Gens im Intron durch transient exprimierte *Cre*-Rekombinase wurden ES-Zellen des Klons 167.4 mit ungeschnittenem *pMC-Cre*-Plasmid (Gu et al., 1993) durch Elektroporation transformiert. Nach 8 bis 10 Tagen wurden einzelne ES-Zellkolonien isoliert. Da aufgrund der fehlenden positiven Selektion nach der Elektroporation die *Cre*-Rekombinase lediglich in einigen der isolierten Kolonien aktiv ist, wurden die isolierten Kolonien jeweils auf Kulturplatten mit normalem Medium und Kulturplatten mit *G418*haltigem Medium übertragen. Diese erneute *G418*-Selektion diente dem Zweck, die Kolonien zu identifizieren, die aufgrund ihrer Expression der *Cre*-Rekombinase das *neo*-Gen und damit ihre *G418*-Resistenz verloren hatten. In Kolonien, die nach der *Cre*-Expression die *G418*-Selektion nicht mehr überlebten, sollte daher entweder das gewünschte 2 *Lox*- oder das 1 *Lox*-Rekombinationsereignis stattgefunden haben. Das Dendrin-Allel mit dem 2 *Lox*-Rekombinationsereignis, bei dem lediglich die "geflochte" *pgk-neo*-Kassette durch *Cre*-Rekombination entfernt wurde, enthält ein einzelnes *LoxP*-Element stromabwärts des Transkriptionsstops und ein weiteres einzelnes *LoxP*-Element im Intron Dendrins, das nach dem Entfernen der *neo*-Kassette durch *Cre*-Rekombination zurückbleibt. Bei einem Dendrin-Allel mit dem 1 *Lox*-Rekombinationsereignis ist hingegen nicht nur das "geflochte" *neo*-Gen, sondern auch das gesamte zweite Exon Dendrins durch die *Cre*-Rekombinase entfernt worden, was daher zu einem klassischen "knock-out"-Allel führt.

Nachdem 500 Kolonien der *G418*-Selektion unterworfen wurden, konnten 45 Kolonien identifiziert werden, die nicht mehr in *G418*haltigem Medium wachsen konnten und daher offensichtlich ihre *G418*-Resistenz durch *Cre*-Expression verloren hatten.

Die Identifizierung der unterschiedlichen *Cre*-Rekombinationsereignissen in diesen 45 Kolonien erfolgte durch PCR-Analyse ihrer genomischen DNS mit mehreren Oligonukleotidpaaren. Das Oligonukleotidpaar *neo4* und *neo5* diente z.B. zur PCR-Amplifikation eines 600 bp Fragments des *neo*-Gens in den Fällen, in denen die *neo*-Kassette nicht durch die *Cre*-Rekombinase entfernt worden war. Die Durchführung dieser PCR reduzierte somit die Anzahl der Klone, in denen die *pgk-neo*-Kassette durch *Cre*-Rekombination entfernt worden war, von 45 auf 19 Kolonien.

Die Oligonukleotide *mDEN40s* und *mDEN42as*, die beide die "geflochte" *pgk-neo*-Kassette flankieren, und die beiden weiter innen liegenden Oligonukleotide *mDEN41s* und *mDEN43as* führten im Falle einer erfolgreichen Eliminierung der *pgk-neo*-Kassette durch *Cre*-Rekombinase in zwei hintereinander geschalteten, "verschachtelten" PCR-Reaktionen zur Amplifikation zweier Fragmente von 200 bp und 280 bp. Das 200 bp umfassende PCR-Produkt stammte hierbei vom WT-Allel, während das 280 bp-Produkt vom mutierten Allel stammte, dessen "geflochte" *pgk-neo*-Kassette durch *Cre*-Rekombination entfernt wurde (2 *Lox*-Rekombinations-

ereignis). Als Relikt dieser von der *Cre*-Rekombinase vermittelten partiellen Rekombination verblieb an der entsprechenden Stelle im Intron eines der beiden *neo*-flankierenden *LoxP*-Elemente, das mitsamt seiner benachbarten Klonierungssequenzen 80 bp umfaßte. Das von diesem 2 *Lox*-Allel stammende PCR-Produkt war daher um den entsprechenden Betrag größer als das PCR-Produkt des WT-Allels. In den Fällen, in denen jedoch die *pgk-neo*-Kassette (ca. 2 kb) nicht durch *Cre*-Rekombination entfernt worden war, erwartete man aufgrund des zu großen Abstands der Oligonukleotide zueinander kein PCR-Produkt. Die Durchführung dieser PCRs führte zur Identifikation von drei voneinander unabhängigen 2 *Lox*-Rekombinationsprodukten (mit der 200 bp/280 bp Doppelbande) in den verbleibenden 19 *Cre*-positiven Kolonien. Hierbei handelte es sich um die Klone 219, 325 und 355.

Diese Ergebnisse konnten durch eine weitere diagnostische PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden *pLoxneo1* und *mDEN42a* bestätigt werden. Das Oligonukleotid *pLoxneo1s* war homolog zu den exogenen Klonierungssequenzen des 5'-flankierenden *LoxP*-Elements der *neo*-Kassette und amplifizierte zusammen mit dem Oligonukleotid *mDEN42as* nur dann ein 350 bp-PCR-Produkt, wenn das sogenannte 2 *Lox*-Rekombinationsereignis vorlag. Ein solches 350 bp-PCR-Produkt, das für das 2 *Lox*-Rekombinationsereignis diagnostisch ist, konnte für die Kolonien 219, 325 und 355, nicht aber für die restlichen der 19 Kolonien detektiert werden.

Das Oligonukleotidpaar *mDEN28s* und *mDEN39as* hingegen ermöglichte eine Unterscheidung zwischen dem 2 *Lox*-Rekombinationsereignis und dem 1 *Lox*-Rekombinationsereignis. Eine PCR-Reaktion mit *mDEN28s* und *mDEN39as* führte ausgehend vom DEN-WT-Allel zu einem etwa 300 bp-PCR-Produkt und ausgehend vom DEN-Allel mit dem 2 *Lox*-Rekombinationsereignis zu einem durch das einzelne *LoxP*-Element inklusive Klonierungssequenzen um 50 bp vergrößerten PCR-Produkt von 350 bp. Ausgehend vom 1 *Lox*-Rekombinationsereignis ergab sich kein PCR-Produkt, da die mit Oligonukleotid *mDEN28s* hybridisierende Region Dendrins in diesem Fall durch die *Cre*-Rekombinase entfernt worden wäre. Auch die Durchführung dieser PCR-Reaktion bestätigte das 2 *Lox*-Rekombinationsereignis in den Klonen 219, 325 und 355. Kolonie 319 hingegen zeigte in den oben beschriebenen diagnostischen PCR-Reaktionen PCR-Produkte, die auf ein 1 *Lox*-Rekombinationsereignis hinwiesen.

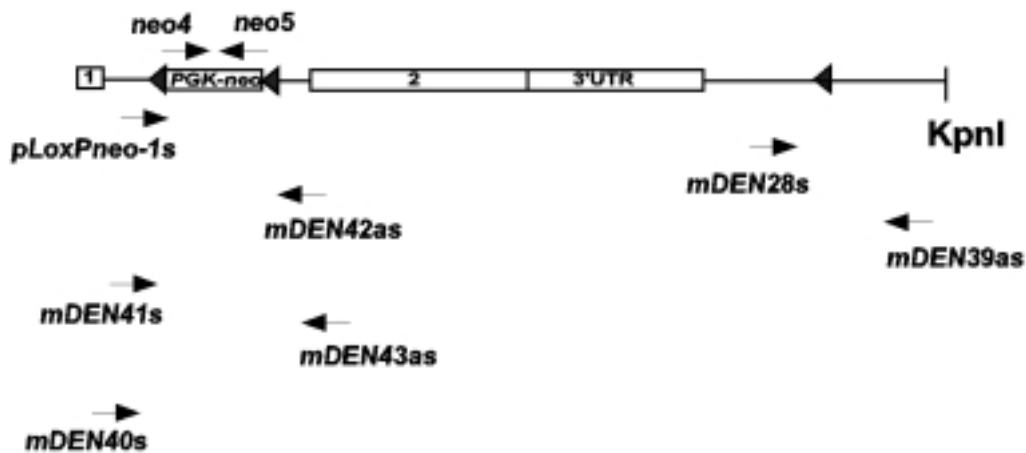


Abb. 27: PCR-Analyse der ES-Zell-DNS von ES-Zellkolonien mit transient exprimierter *Cre*-Rekombinase

Auch nach der *Cre*-Rekombination wurden zur Bestätigung der PCR-Ergebnisse genomische *Southern Blot*-Analysen der drei ES-Zellklone mit 2 *Lox*-Rekombinationsereignis und dem ES-Zellklon mit 1 *Lox*-Rekombinationsereignis durchgeführt. Zur Unterscheidung der unterschiedlichen Rekombinationsereignisse wurde jeweils genomische DNS der 2 *Lox*-Klone 219, 325 und 355, des 1 *Lox*-Klons 319, des ursprünglichen 3 *Lox*-Klons 167.4 und eines WT-Klons mit dem Restriktionsenzym HindIII geschnitten, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran übertragen. Nach der Hybridisierung dieses *Blots* mit Sonde 3, die Sequenzen des Exons 1 Dendrins umfaßte, konnten für alle unterschiedlichen Rekombinationsereignisse unterschiedliche Fragmentlängen detektiert werden, wie Abb. 28 zeigt. Für die 2 *Lox*-Klone 219, 325 und 355 wurden neben der über 16 kb WT-Bande 6,3 kb Fragmente für das 2 *Lox*-Allel detektiert. Der klassische "*knock-out*"-Klon 319 (1 *Lox*-Rekombination) zeigte neben der WT-Bande die erwartete 1,16 kb Bande, während beim Ursprungsklon 167.4 neben der WT-Bande eine 0,84 kb Bande für das mutierte Allel zu beobachten war.

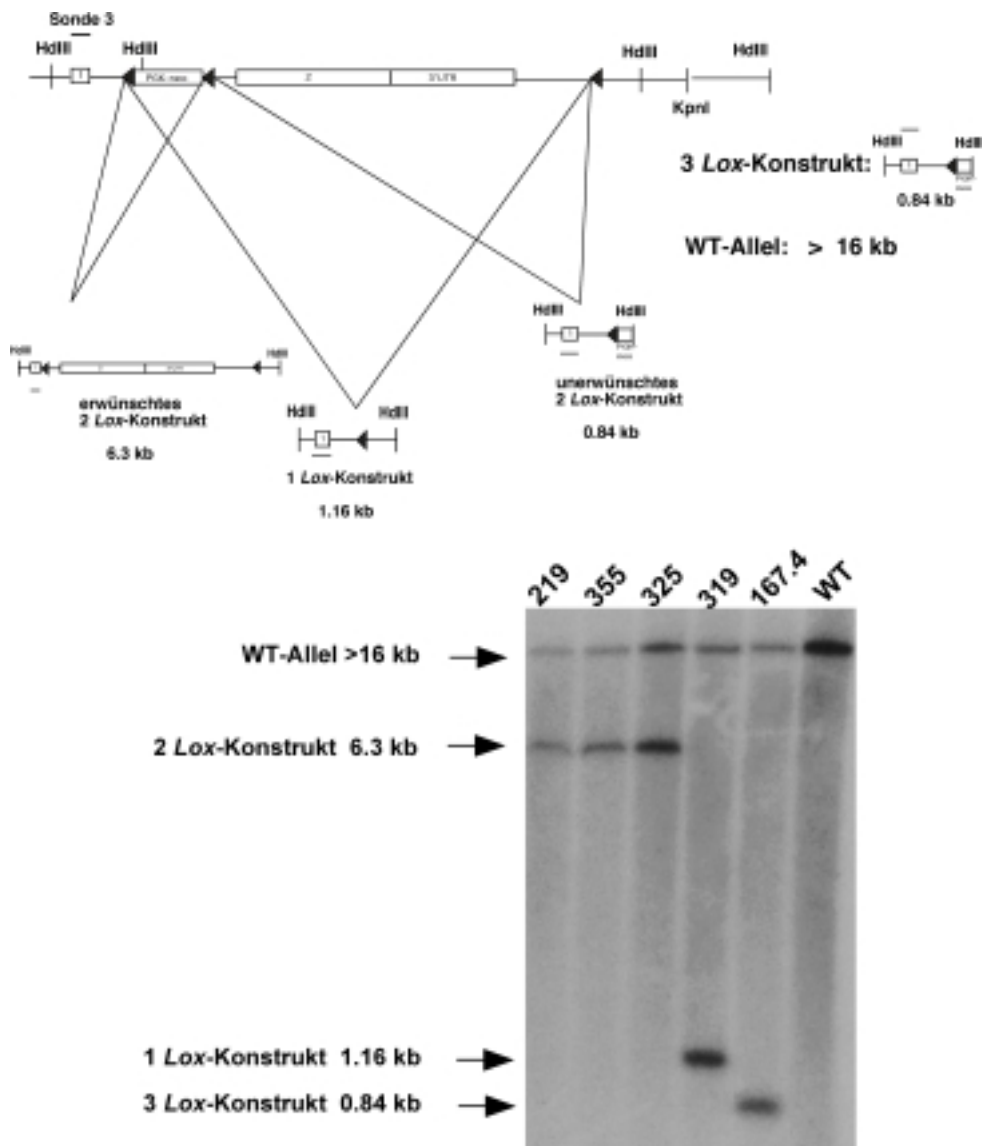


Abb. 28: *Southern Blot*-Analyse nach der *Cre*-Rekombination mit der Sonde 3.

Weitere diagnostische Restriktionsenzymstimmstellen stellten die exogenen *EcoRI*-Schnittstellen stromaufwärts (5') der "gefloxten" *neo*-Kassette und die *EcoRI*-Schnittstelle stromabwärts (3') des einzelnen *LoxP*-Elements dar. Abb. 29 zeigte einen mit Sonde 2 hybridisierten *Southern Blot*, bei dem die genomische DNS zuvor mit *EcoRI* geschnitten worden war. Der Ursprungsklon 167.4 zeigte hier neben der ca. 18 kb WT-Bande eine 7 kb Bande für das mutierte Allel. Für die 2 *Lox*-Klone 219, 325 und 355 hingegen konnte neben der WT-Bande eine 5 kb Bande detektiert werden, die daher um 2 kb kleiner war als beim Ursprungsklon, da bei den 2 *Lox*-Klonen die 2 kb umfassende *neo*-Kassette durch die *Cre*-Rekombinase eliminiert worden war. Beim 1 *Lox*-Klon 319 zeigte sich lediglich das erwartete 18 kb WT-Signal. Ein Fragment für das mutierte Allel konnte beim 1 *Lox*-Rekombinationsereignis nicht detektiert werden, da die Sonde 2 mit einer Region hybridisierte, die zuvor durch *Cre*-Rekombination entfernt worden war.

Neben dem 3 *Lox*-Ursprungsklon 167.4 wurde zusätzlich der 2 *Lox*-Klon 325 zur Injektion in Blastozysten ausgewählt.

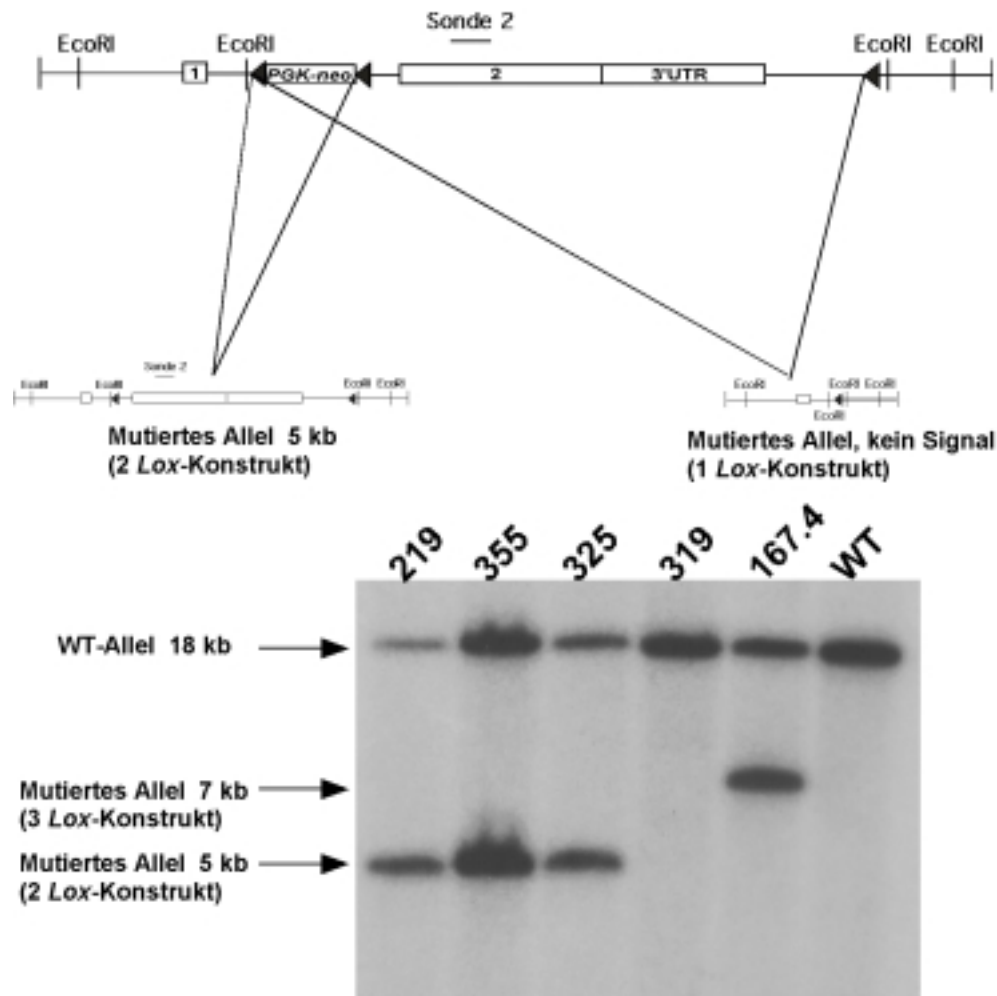


Abb. 29: Southern Blot-Analyse nach der Cre-Rekombination mit der Sonde 2.

3.2.7. Etablierung der transgenen Mauslinien

Zur Injektion in *C57Bl6*-Mausblastozysten und der anschließenden Reimplantation in scheinsschwangere Mäuse wurden die ES-Zellklone 167.4 (3 *Lox*) und 325 (2 *Lox*) verwendet. Die daraus hervorgegangenen männlichen Chimären wurden in den *C57Bl6*-Hintergrund zurückgekreuzt. Im Verlauf dieser Rückkreuzung konnte eine chimäre, rekombinante Keimbahn anhand der Expression des vom ES-Zellgenoms kodierten Fellmarkers -des *agouti*-Gens- nachgewiesen werden. Für den ES-Zellklon 167.4 wurde die Keimbahntransmission durch Weitergabe des mutierten DEN-Allels in die nächste Generation (1. Filial-Generation oder F1-Generation) festgestellt.

Die genetische Analyse der Nachkommen erfolgte durch PCR mit genomischer DNS aus Schwanzspitzengewebe. Hierbei führte die Oligonukleotid-Kombination *mDEN28s* und *mDEN39as* -wie schon in Kapitel 4.2.6. beschrieben- zur PCR-Amplifikation einer 300 bp /350 bp Doppelbande bei heterozygoten, der 300 bp-WT-Bande bei WT-Tieren und der 350 bp-Bande bei homozygoten Tieren. Das gegenüber dem Wildtyp um 50 bp vergrößerte PCR-Produkt des mutierten DEN-Allels ergab sich durch die Anwesenheit des einzelnen *LoxP*-Elements in der entsprechenden Region des DEN-Allels mit dem 3 *Lox*-Rekombinationsereignis. Diese PCR-basierte Genotypisierung konnte auch durch *Southern Blot*-Analysen mit der Sonde 2 bestätigt werden (Abb. 30).

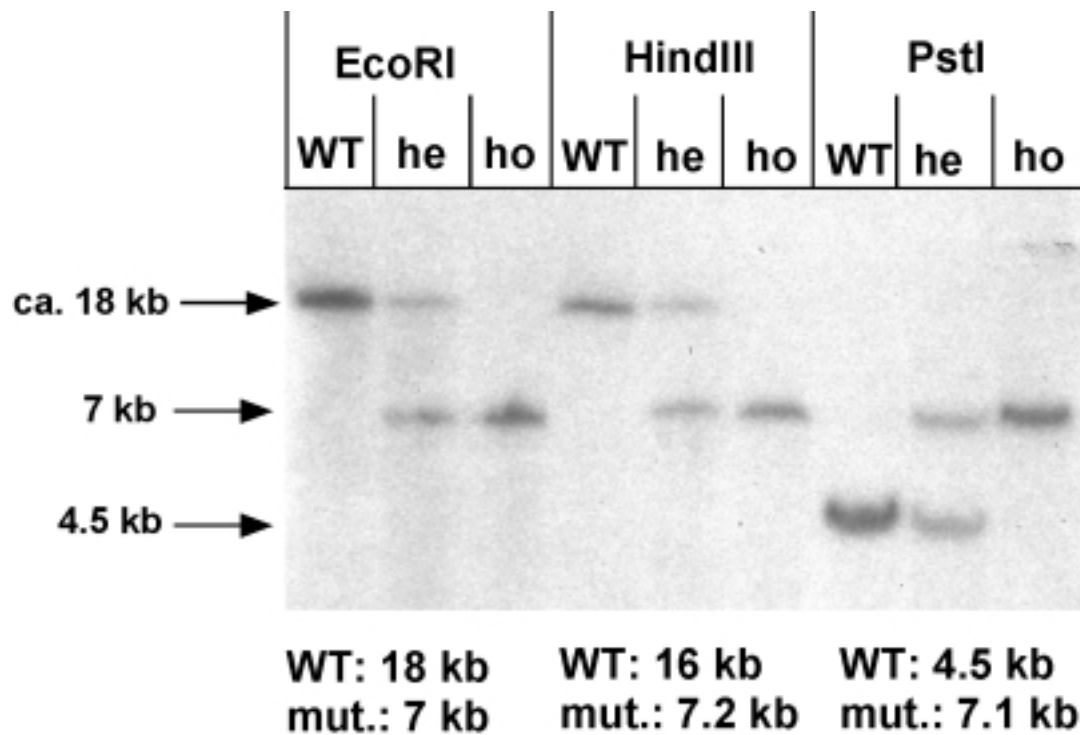


Abb. 30: Bestätigung der PCR-Genotypisierung mit *Southern Blot*-Analyse

Nach der Genotypisierung der F1-Generation wurden heterozygote Nachkommen zur Homozygotie des 3 *Lox*-Rekombinationsereignisses verpaart (F2-Generation). Die homozygoten 3 *Lox*-Allel-Mäuse erwiesen sich als uneingeschränkt lebensfähig, fertil und ohne offensichtliche körperliche Auffälligkeiten.

Für den 2 *Lox*-ES-Zellklon 325 konnte durch Rückkreuzung dreier hochchimärer Männchen in den C57Bl6-Hintergrund unter 28 Nachkommen der F1-Generation keine Keimbahntransmission für das mutierte Dendrin-Allel und die daran gekoppelte Expression des Fellmarkers beobachtet werden. Da zu diesem Zeitpunkt bereits

bekannt war, daß die homozygoten 3 *Lox*-Allel-Mäuse maximal 2% Restexpression Dendrins aufweisen (siehe Kapitel 4.4.) und somit klassischen *knock-out*-Charakter, jedoch keinen offensichtlichen Phänotyp besitzen, wurde auf die Blastozysteninjektion eines weiteren ES-Zellklon mit 2 *Lox*-Rekombination zur Etablierung des konditionalen "*knock-outs*" verzichtet. Weiterhin wurde von der Kreuzung der homozygoten 3 *Lox*-Allel-Mäuse mit *Cre-deleter*-Mäusen (Schwenk et al., 1995) zur Herstellung einer klassischen *knock-out*-Maus abgesehen, da der Phänotyp der homozygoten 3 *Lox*-Allel-Mäuse mit lediglich 2% Dendrin-Restexpression dem Phänotyp der klassischen *knock-out*-Maus entsprechen sollte.

3.3. Bestimmung des Expressionsniveaus des rekombinanten Allels in heterozygoten Mäusen der 3 *Lox*-Allel-Linie

Es ist in der Regel bei heterozygoten 2 *Lox*- bzw. 3 *Lox*-Mäusen essentiell, das Expressionsniveau des mutierten Allels im direkten Vergleich zum WT-Allel auf mRNS-Ebene durch differentielle Hybridisierung von RT-PCR-Produkten zu quantifizieren. Im Fall von Dendrin mußte damit gerechnet werden, daß die Anwesenheit der *neo*-Kassette in dem lediglich 400 bp umfassenden Intron des 3 *Lox*-Allels zu einer fast vollständigen Inaktivierung des "*gefloxten*" Allels gegenüber dem WT-Allel führt. Um zu beweisen, daß schon die homozygoten 3 *Lox*-Allel-Mäuse *knock-out*-Charakter besitzen und daß somit auf eine Kreuzung mit *Cre-deleter*-Mäusen verzichtet werden konnte, mußte das fast auf Null reduzierte Expressionsniveau des 3 *Lox*-Allels im Vergleich zum WT-Allel nachgewiesen werden. Zur Unterscheidung des WT- und des mutierten 3 *Lox*-Allels dienten Mutationen im kodierenden Bereich des mutierten Allels, die durch den Austausch der Maus-Sequenz eines PstI/PstI-Fragments gegen die entsprechende Ratten-Sequenz verursacht wurden. In einer RT-PCR-Reaktion von Gesamthirn-mRNS der heterozygoten 3 *Lox*-Allel-Mäuse mit dem Oligonukleotiden *mDEN 47s* und *mDEN45as* wurde ein ca. 230 bp-PCR-Produkt aus der Region des zweiten Exons amplifiziert. Die beiden Restriktionsenzymstellen EcoRI und PstI in den beiden Oligonukleotiden wurden zur gerichteten Subklonierung dieses PCR-Produktes in die replikative (doppelsträngige) DNS-Form des M13-Phagen verwendet (M13 mp18-Vektor). Nach der Transfektion dieser Phagen-DNS in kompetente Zellen des *E. coli*-Stammes CB101 wurden die transfizierten Bakterien ausplattiert. Die rekombinante einzelsträngige Plaque-DNS der M13-Plattenkulturen wurden auf Nitrozellulose-Filter (Protran BA 85, Schleicher&Schüll) übertragen und anschließend mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotid *ratDEN46s* hybridisiert, das zur Nukleotidsequenz der Ratte komplementär war und mit der entsprechenden Sequenz der Maus in drei von insgesamt 19 Nukleotidpositionen nicht übereinstimmte. Kontroll-PCR-Produkte der Maus bzw. der Ratte wurden zum Austesten der

Hybridisierungsbedingungen ebenfalls in M13-Vektoren subkloniert, auf Filter übertragen und dann mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotid *ratDEN46s* hybridisiert. Dieses Vorexperiment zeigte, daß unter wenig stringenten Waschbedingungen (54 °C, 1*SSC) sowohl Plaque-DNS mit PCR-Produkten der Ratten-DNS als auch Plaque-DNS mit PCR-Produkten der Maus-DNS hybridisierten. Wurde jedoch die Stringenz der Waschbedingungen angehoben (60 °C, 1*SSC), so hybridisierte nur noch die rekombinante M13-DNS, die das PCR-Produkt von der Ratten-DNS trug und damit dem mutierten Allel entsprach. Die Signale der Plaques-DNS, deren subkloniertes PCR-Produkt von der Maus-Nukleotidsequenz abstammte und somit dem Wildtyp-Allel entsprach, wurden aufgrund der drei nicht komplementären Nukleotidpositionen zur Sonde *ratDEN46s* unter diesen stringenten Bedingungen abgewaschen. Nach der Subklonierung der RT-PCR-Produkte von Gesamthirn-RNA heterozygoter *3 Lox*-Allel-Mäuse in M13-Phagen und der Übertragung der Plaque-DNS auf Filter wurde nun durch differentielle Hybridisierung bestimmt, wie viele Plaque-Signale für beide beschriebenen Waschbedingungen detektiert werden konnten. Das Verhältnis dieser Plaque-Signale entsprach dabei unmittelbar den Expressionsniveaus des Wildtyp- und des rekombinanten Allels zueinander. Von insgesamt 593 unabhängigen M13-Kolonien, in denen RT-PCR-Produkte heterozygoter *3 Lox*-Allel-Mäuse subkloniert worden waren, stammten nach den Ergebnissen der differentiellen Hybridisierung lediglich 12 Kolonien vom rekombinanten *3 Lox*-Allel, was einer Restexpression des *3 Lox*-Allels von 2,02% entsprach.

3.4. Vorläufige Analyse des Dendrin-defizienten Phänotyps

3.4.1. Dendrin-RNS-Analyse

Die in homozygoten *3 Lox*-Allel-Mäusen annähernd ausgeschaltete Dendrin-Expression wurde durch *Northern Blot*-Analyse bestätigt. Zur Herstellung des *Northern Blots* wurden verschiedene Organe aus homozygoten, heterozygoten und WT-Mäusen der F2-Generation entnommen und zur Herstellung von RNS verwendet. Von jeder der verschiedenen RNS-Proben wurden 50 µg Gesamt-RNS zur gelelektrophoretischen Auftrennung eingesetzt und anschließend auf eine Nylon-Membran übertragen. Als radioaktiv markierte Dendrin-DNS-Sonde diente die in Abb. 26 dargestellte Sonde 2 (PCR-Produkt der Oligonukleotide *mDEN14s/mDEN16as*).

Abbildung 31 zeigt das ca. 3,8 kb Dendrin-Transkript in der Großhirn-RNS des Wildtyps und in etwas geringerer Intensität in der Großhirn-RNS heterozygoter *3 Lox*-Allel-Mäuse. Homozygote *3 Lox*-Allel-Mäuse zeigen -wie es die in Kapitel 4.4. beschriebenen Analysen erwarten lassen- keine Dendrin-Expression auf RNS-Ebene mehr, die von der Empfindlichkeit einer *Northern Blot*-Analyse noch erfaßt werden könnte. Somit ließ sich der annähernde "knock-out"-Status der homozygoten *3 Lox*-Allel-Mäuse auf *Northern Blot*-Ebene bestätigen.

In allen RNS-Preparationen der Leber und des Cerebellums, die als negative Kontrollen fungieren sollten, ließen sich wie erwartet keine Dendrin-Transkript-Signale detektieren. In Nieren-RNS konnte ebenfalls kein Dendrin-Signal per Northern Blot nachgewiesen werden. In Vorexperimenten war Dendrin jedoch sowohl in Nieren- als auch in Podozyten-RNS durch *reverse Transkriptase PCR* (RT-PCR) nachweisbar (unveröffentlichte eigene Ergebnisse und persönliche Mitteilung von P. Mundel). Andere, bisher nicht weiter bestätigte Hinweise durch quantitative RT-PCR belegen, daß die humane Version Dendrins weiterhin im Skelettmuskel exprimiert ist (Nagase et al., 1998), doch auch dies ließ sich nicht durch den in Abb. 31 gezeigten *Northern Blot* bestätigen. Es besteht allerdings die Möglichkeit, daß sehr geringe Expressionen oder Expressionen in lediglich einem spezifischen Zelltyp des entsprechenden Gewebes -z.B. in den Podozyten der Niere- zwar von der sehr empfindlichen RT-PCR-Technik, nicht aber von der weit weniger empfindlichen *Northern Blot*-Analyse erfaßt werden können.

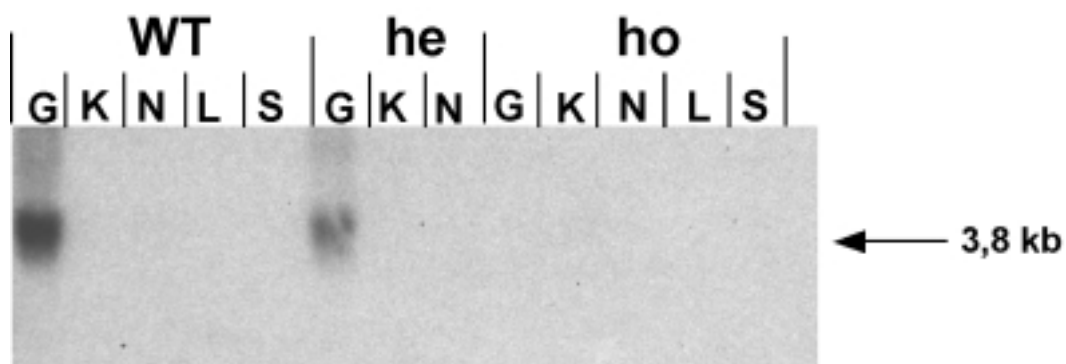


Abb. 31: *Northern Blot*-Analyse von Wildtyp-Mäusen und heterozygoten und homozygoten Dendrin *3 Lox*-Mäusen: Es wurde jeweils 50 µg Gesamt-RNA aus dem Großhirn (G), aus dem Kleinhirn (K), aus der Niere (N), aus der Leber (L) und aus dem Skelettmuskel (S) aufgetragen.

Weiterhin wurden in situ-Hybridisierungen horizontaler Hirnschnitte mit zwei verschiedenen radioaktiv markierten Dendrin-Oligonukleotiden durchgeführt. Abbildung 32 zeigt die in situ-Hybridisierungen mit dem Oligonukleotid *mDENIS4*, das mit der Nukleotidregion 311 - 340 im zweiten Exon Dendrins hybridisiert. Während man in Abb. 32 A und B -in den Hirnschnitten von WT- und heterozygoten Dendrin *3Lox*-Mäusen- die für Dendrin typische RNS-Verteilung im Neocortex, im Bulbus olfactorius, im Putamen und in den somatischen und dendritischen Schichten des Hippocampus beobachten kann, konnten in Abb. 32 C, in Hirnschnitten homozygoter Dendrin *3Lox*-Mäuse, keine Signale detektiert werden. Die Dendrin-Restexpression der homozygoten Dendrin *3Lox*-Mäuse ist demnach auch zu gering, um durch in situ-Hybridisierung mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden detektiert zu werden. Der "knock-out"-Charakter der homozygoten Dendrin *3Lox*-Mäuse ist somit durch RT-PCR und differentielle Hybridisierung, *Northern Blot*-Analyse und in situ-Hybridisierung ausreichend dokumentiert worden.

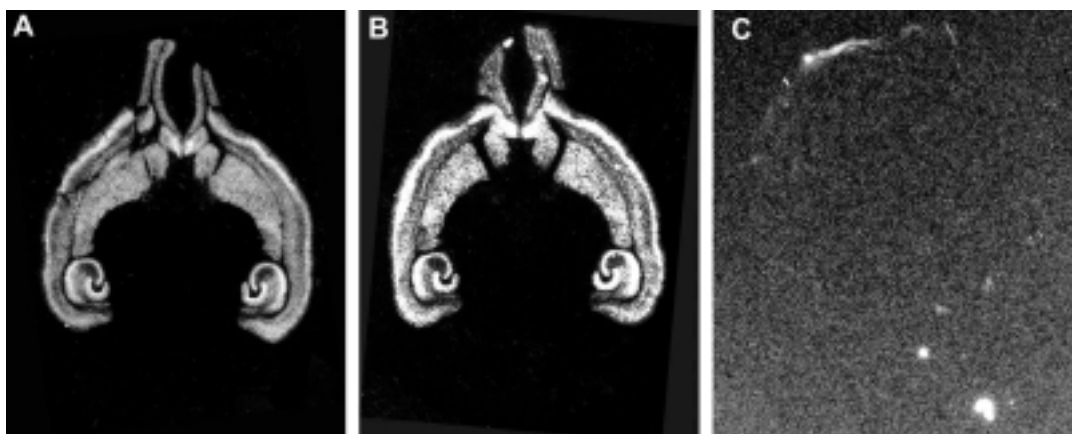


Abb. 32: In situ-Hybridisierung horizontaler Hirnschnitte von (A) Wildtyp-Mäusen, (B) heterozygoten Dendrin *3 Lox*-Allel Mäusen und (C) homozygoten Dendrin *3 Lox*-Allel Mäusen mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotid *mDENIS4*.

Wählt man zur Durchführung der in situ-Hybridisierung die radioaktive Oligonukleotid-Sonde *mDENIS1* aus, die mit einer Region des 210 bp ersten Exons hybridisiert, so ergibt sich für die in-situ-Hybridisierungen ein völlig anderes Bild (Abb. 33 A bis C): hier zeigt sich in WT-, heterozygoten und auch in homozygoten Hirnschnitten die normale RNS-Signal-Verteilung Dendrins. Die Anwesenheit der *neo*-Kassette im Intron Dendrins sollte die Transkription der ersten 210 bp Dendrins, die vom ersten Exon stammen, nicht beeinträchtigen. Die Transkription der restlichen Sequenzen Dendrins, die vom zweiten, dem Intron folgenden Exon stammen, wird durch die Anwesenheit der *neo*-Kassette im Intron -wahrscheinlich durch einen

verfrühten Transkriptionsabbruch durch das Poly-A-Signal des *neo*-Gens- stark (mit 2% fast bis auf "*knock-out*"-Niveau) reduziert. Einen signifikanten Unterschied in den RNS-Verteilungen der in Abb. 33 gezeigten Hirnschnitte A bis C zeigen lediglich die Vergrößerungen der jeweiligen Hippocampi: das RNS-Signal der dendritischen Schichten ist beim WT-Hirnschnitt (A) sehr stark, beim heterozygoten Hirnschnitt (B) nimmt es von der Intensität her etwas ab und im homozygoten Hirnschnitt (C) zeigt die RNS keinerlei dendritische Lokalisierung mehr. Diese Beobachtung spricht für die Tatsache, daß die vom Dendrin 3 *Lox*-Allel transkribierte Dendrin-RNS in der Tat durch das Poly-A-Signal des im Intron befindlichen *neo*-Gens verfrüht abgebrochen wird.

Im Hirn homozygoter 3*Lox*-Allel-Mäuse kann demnach lediglich eine Dendrin-RNS transkribiert werden, die die Sequenzen des ersten Exons, des Introns und des *neo*-Gens bis zu seinem Poly-A-Signal umfassen, nicht aber die Sequenzen des zweiten Exons inklusive der 3'UTR beinhalten. Durch diesen Verlust eines Großteils der kodierenden Dendrin-Sequenzen und der kompletten 3'UTR gehen wahrscheinlich jene Sequenz-Regionen verloren, die für die dendritische mRNS-Lokalisierung verantwortlich sind. Die Expression einer solch modifizierten Dendrin-mRNS durch die 3 *Lox*-Allele der homozygoten Mäuse könnte demnach den in Abb. 33 A - C demonstrierten Verlust der mRNS-Lokalisierungskapazität erklären. Gleichzeitig würde diese Beobachtung die Anwesenheit des sogenannten mRNS-Lokalisierungssignals auf das immerhin 3,4 kb umfassende zweite Exon Dendrins begrenzen.

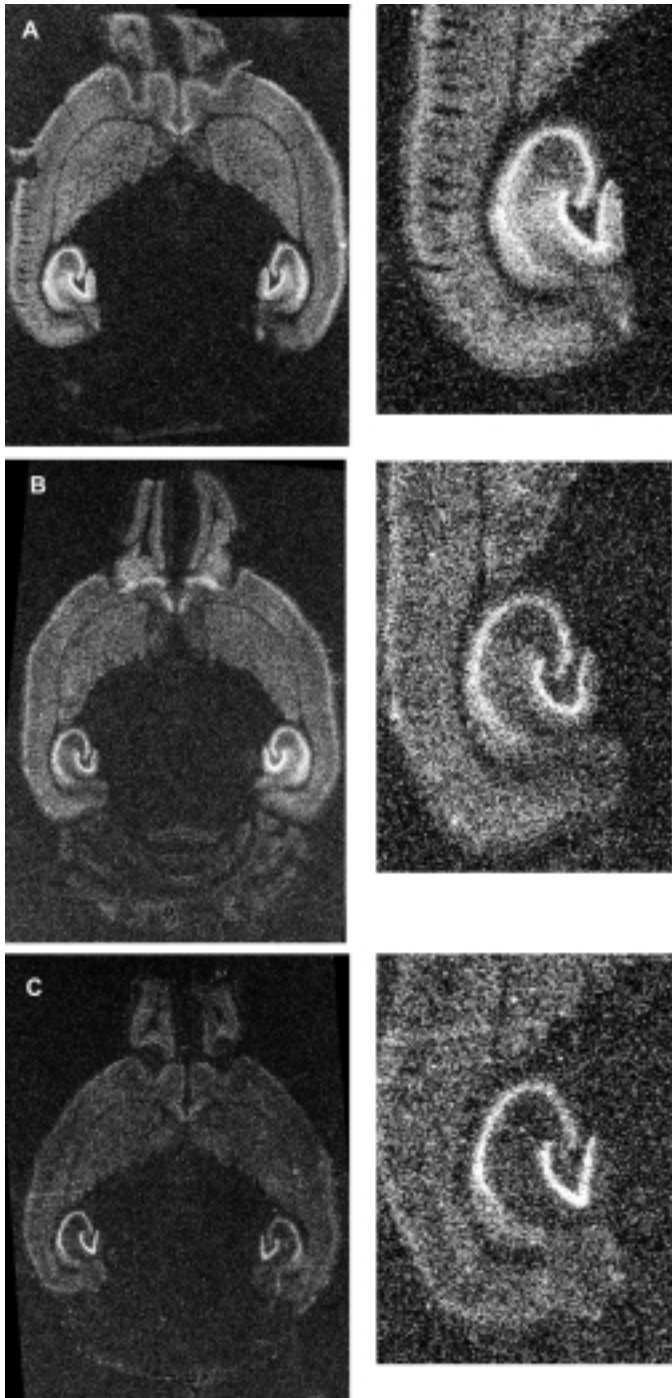


Abb. 33: in situ-Hybridisierung eines horizontalen Hirnschnitts (A) einer WT-Maus (B) einer heterozygoten Dendrin 3 *Lox*-Allel-Maus; (C) einer homozygoten Dendrin 3 *Lox*-Allel-Maus mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotid *mDENIS1*.

3.4.2. Analyse des funktionellen Zusammenhangs zwischen Dendrin und Synaptopodin

Die Proteine Dendrin und Synaptopodin besitzen zwar -streng genommen- keine Sequenzhomologien zueinander, sie vereinigen jedoch mehrere gemeinsame Eigenschaften, wie z.B. die in etwa gleiche Größe, die stark basische, prolinreiche Aminosäuresequenz, ähnliche zeitliche und lokale Expression (im Hippokampus, Neocortex, Bulbus olfactorius, Putamen etc. und in Podozyten der Niere), die geringe Anzahl an Introns in beiden Genen (Dendrin: 1 Intron; Synaptopodin: kein Intron), sowie auch die dendritische Lokalisierung beider Proteine im Hirn. Obwohl die stark unterschiedliche intrazelluläre Verteilung der EGFP-Fusionen der beiden Proteine (Kapitel 4.1.3.) nicht für einen engen funktionalen Zusammenhang zwischen Dendrin und Synaptopodin spricht, sollte dieser dennoch durch Analyse der Dendrin *3 Lox-knock-out*-Maus und der von P. Mundel etablierten Synaptopodin *knock-out*-Maus (unveröffentlichte Daten) beleuchtet werden.

Abbildung 34 A - C zeigt in situ-Hybridisierungen von horizontalen Hirnschnitten von Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten Dendrin *3 Lox-knock-out*-Mäusen mit dem Synaptopodin-spezifischen radioaktiv markierten Oligonukleotid *synptoISI*. Die in situ-Hybridisierungen zeigen keinerlei Expressionsunterschiede von Synaptopodin in Dendrin *knock-out*-Mäusen gegenüber dem Wildtyp. Dasselbe Ergebnis ergibt sich für die in Abb. 35 A - C gezeigten in situ-Hybridisierungen an Hirnschnitten von Wildtyp-, von heterozygoten und homozygoten Synaptopodin *knock-out*-Mäusen, die mit dem Dendrin-spezifischen radioaktiven Oligonukleotid *mDENIS1* hybridisiert worden waren. Die sich in der Dendrin *3 Lox-Allel*-Maus gegenüber dem Wildtyp nicht veränderte Synaptopodin-Expression wurde weiterhin auf *Western Blot*-Ebene bestätigt (Abb. 36).

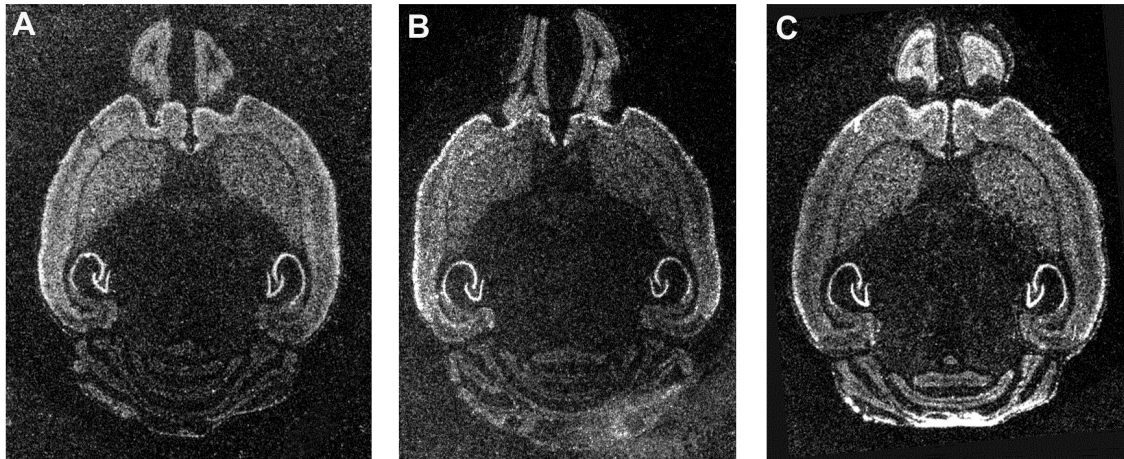


Abb. 34: In situ-Hybridisierungen an horizontalen Hirnschnitten von (A) Wildtyp-Mäusen, (B) heterozygoten Dendrin 3 *Lox*-Allel-Mäusen und (C) homozygoten Dendrin 3 *Lox*-Allel-Mäusen mit dem radioaktiv markierten, Synaptopodin-spezifischen Oligonukleotid *synaptoIS1*.

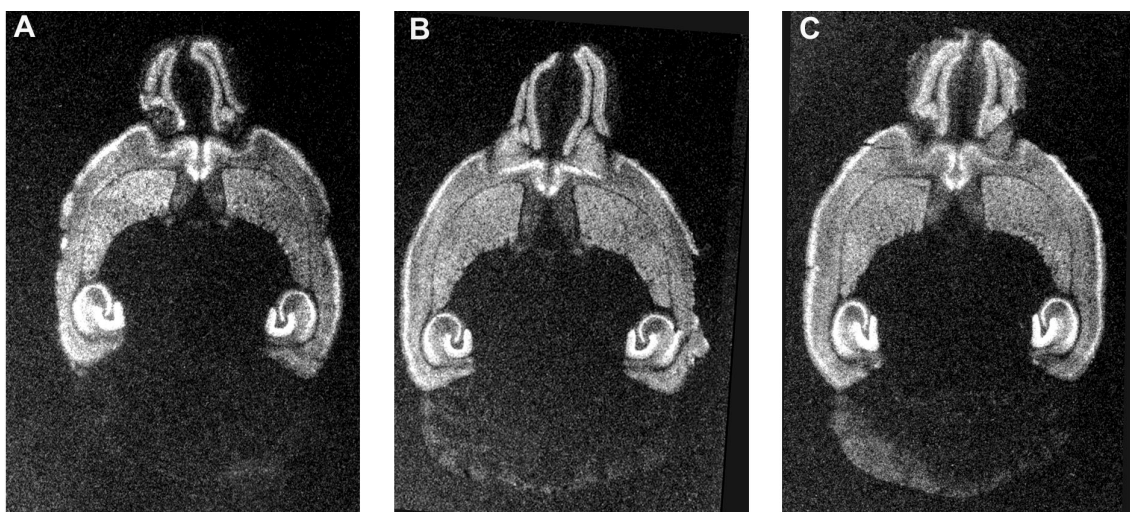


Abb. 35: In situ-Hybridisierungen an horizontalen Hirnschnitten von (A) Wildtyp-Mäusen, (B) heterozygoten Synaptopodin *knock-out*-Mäusen und (C) homozygoten Synaptopodin *knock-out*-Mäusen mit dem radioaktiv markierten, Dendrin-spezifischen Oligonukleotid *mDENIS1*.

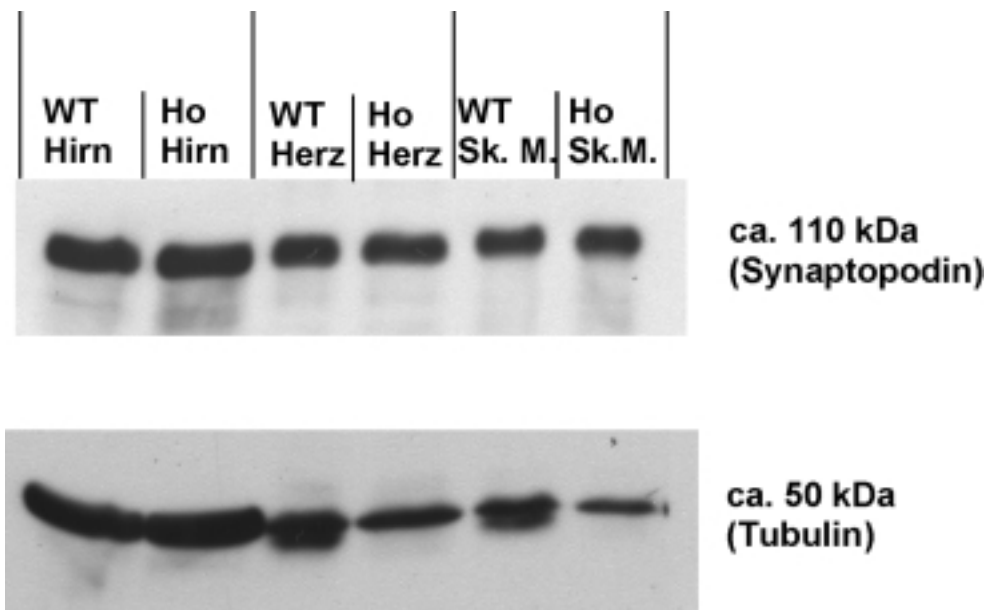


Abb. 36: Western Blot-Analyse von Protein-Extrakten aus Hirn, Herz und Skelettmuskel (Sk. M.) von Wildtyp-Mäusen und homozygoten Dendrin 3 *Lox-*Allel-Mäusen mit einem polyklonalen, affinitätschromatographisch gereinigten anti-Synaptopodin Antikörper.**

Da die Inaktivierung eines der beiden Gene die Expression des jeweils anderen Gens nicht zu beeinflussen scheint, ist ein enger funktionaler Zusammenhang beider Proteine unwahrscheinlich.

Immunocytochemische Experimente hatten gezeigt, daß Synaptopodin in Podozyten entlang der Aktin-Filamente und in fokalen Kontaktregionen zu finden ist. Im Einklang mit diesen Beobachtungen konnte in der Synaptopodin *knock-out*-Maus eine reduzierte Expression von α -Aktinin und von Paxillin -einem fokalen Adhäsionsprotein- gegenüber dem Wildtyp auf *Western Blot*-Ebene nachgewiesen werden (unveröffentlichte Daten von P. Mundel). Ähnlich reduzierte Expressionen von α -Aktinin und Paxillin gegenüber dem Wildtyp konnten in den *Western Blots* in Abb. 37 und 38 jedoch nicht für die Protein-Extrakte der Dendrin 3 *Lox-knock-out*-Maus nachgewiesen werden.

Bei allen gezeigten *Western Blot*-Analysen (Abb. 36, 37 und 38) erfolgte die Quantifizierung der analysierten Proteinmengen durch die Detektion des ubiquitär und konstitutiv exprimierten α -Tubulins mit einem monoklonalen anti- α -Tubulin Antikörper.

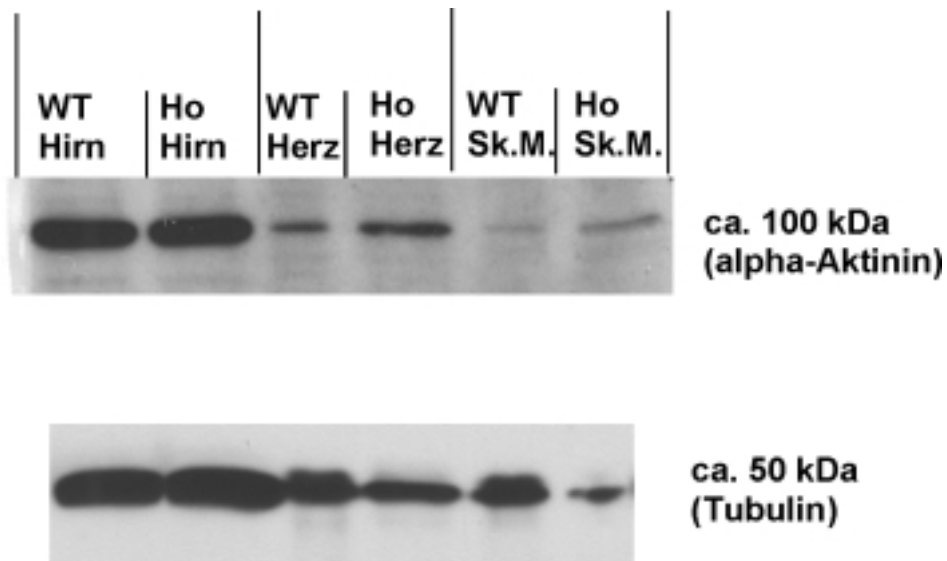


Abb.37: Western Blot-Analyse von Protein-Extrakten aus des Hirn, Herz und Skelettmuskel (Sk. M.) von Wildtyp-Mäusen und homozygoten Dendrin 3 *Lox-*Allel**-Mäusen mit einem monoklonalen anti- α -Aktinin Antikörper.

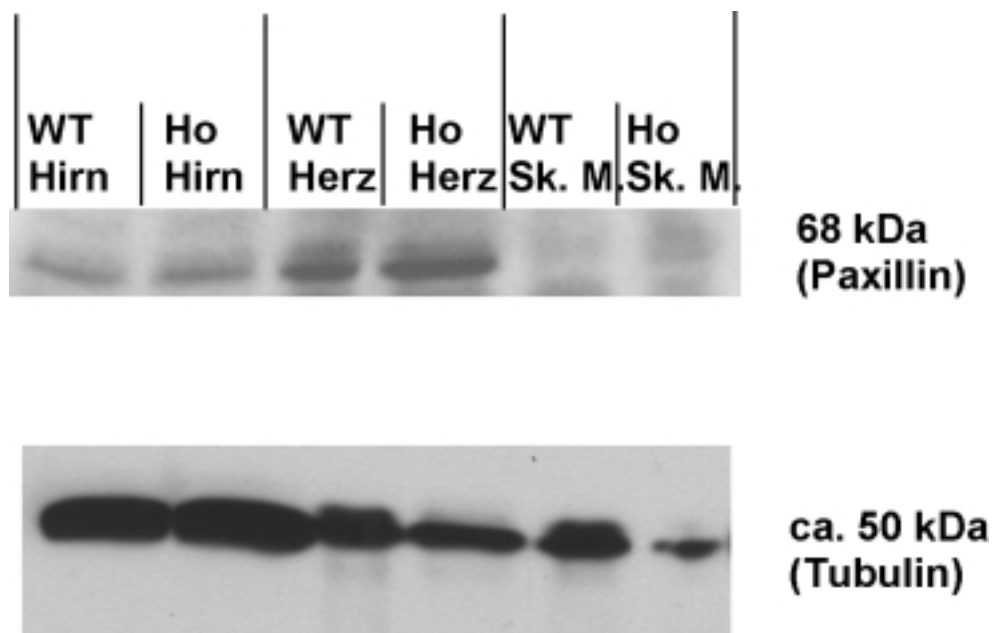


Abb.38: *Western Blot*-Analyse von Protein-Extrakten aus Hirn, Herz und Skelettmuskel (Sk. M.) von Wildtyp-Mäusen und homozygoten Dendrin 3 *Lox-*Allel**-Mäusen mit einem monoklonalen anti-Paxillin Antikörper.

Diese Analysen und die unterschiedliche Verteilung ihrer EGFP-Fusionen (Kapitel 4.1.1. bis 4.1.3.) sprechen trotz aller Gemeinsamkeiten gegen einen funktionellen Zusammenhang zwischen Dendrin und Synaptopodin.

4. Diskussion

4.1. Identifizierung eines funktionalen NLS am N-Terminus Dendrins

Das Programm *pSort*, das die intrazelluläre Aufenthaltswahrscheinlichkeit von Proteinen durch Analyse ihrer Primärstruktur vorhersagt, konnte für das Protein Dendrin zwei Regionen mit "nuclear targeting signals" (NLS) identifizieren: die Sequenzen RKRR, KRRK, das zweiteilige NLS-Signal RKAASQEREAKETERKR (Aminosäuren 113 - 131) und die Motive PRRR und PRRRWDR (Aminosäuren 218 - 224). Aufgrund dieser NLS-Signale konnte durch *pSort* mit 70%iger Wahrscheinlichkeit ein nukleärer Aufenthaltsort für Dendrin vorhergesagt werden. Diese Voraussage des Computer-Programms konnte durch die Expression eines EGFP-Dendrin-Fusionsproteins in diversen eukaryontischen Zelllinien bestätigt werden: das durch EGFP unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemachte Dendrin (Aminosäuren 1 - 707) zeigte in allen getesteten Zelllinien in annähernd 100% aller transfizierten Zellen eine klare Kernlokalisierung. In der zytoplasmatischen Region hingegen war das EGFP-Dendrin-Fusionsprotein entweder gar nicht vorhanden oder zeigte sich lediglich in Form von vesikulären Strukturen im Soma und entlang der Zellfortsätze. Da Fibroblasten, die mit dem EGFP exprimierenden Vektor *pEGFP-C1* transfiziert wurden, eine gleichmäßige Verteilung EGFPs in den nukleären und zytoplasmatischen Bereichen der Zelle aufweisen, müssen die nukleäre Lokalisation des EGFP-Dendrin-Fusionsproteins sowie dessen vesikuläre Verteilung im Zytoplasma auf Sortierungssignale in der Primärstruktur Dendrins zurückzuführen sein.

Zur lokalen Eingrenzung des Sortierungssignals, das tatsächlich für die Kernlokalisierung verantwortlich ist, wurden EGFP-Fusionsproteine mit diversen Fragmenten Dendrins in eukaryontischen Zelllinien exprimiert. So zeigten z.B. Fusionsproteine, die keine der beiden von *pSort* vorausgesagten NLS-Regionen umfaßten, keinerlei Kernlokalisierung, sondern eine für das nicht trunkierte Dendrin untypische gleichmäßige zytoplasmatische Verteilung (*EGFP-C-term* (Aminosäuren 402 - 707); *EGFP-5s/4as* (Aminosäuren 234 - 707)). Fusionsproteine, die beide Regionen mit den von *pSort* identifizierten NLS-Signalen enthielten, zeigten hingegen in nahezu 100% der transfizierten Zellen eine klare Kernlokalisierung (*EGFP-Dendrin* (Aminosäuren 1 - 707); *EGFP-N-term* (Aminosäuren 1 - 570) und *EGFP-7s/4as* (Aminosäuren 106 - 707)). Das Fusionsprotein, das vom Konstrukt *EGFP-6s/4as* gesteuert wurde (Aminosäuren 137 - 707) und nur die zweite von *pSort* identifizierte NLS-Region enthielt, war in weniger als 40% aller transfizierten Zellen im Kern zu finden. Die zweite NLS-Region mit den Motiven PRRR und PRRRWDR (Aminosäuren 218 - 224) scheint daher lediglich eine untergeordnete Rolle bei der

Kernlokalisierung Dendrins zu spielen. Die Aminosäure-Region 106 bis 136, die in Konstrukt *EGFP-7s/4as* anwesend ist, aber in Konstrukt *EGFP-6s/4as* fehlt, ist demnach maßgeblich für die beobachtete Kernlokalisierung Dendrins verantwortlich. Diese experimentelle Eingrenzung des tatsächlichen NLS-Signals Dendrins auf die Aminosäure-Region 106 bis 136 stimmt gut mit der vom Programm *pSort* vorausgesagten Hauptregion akkumulierter NLS-Signale (RKRR, KRRK und RKAASQEREAKETERKR) von Aminosäure 113 bis 131 überein. Obwohl die beschriebenen Experimente die Funktionalität der NLS-Signale in der Aminosäure-Region 113 bis 131 bestätigen und damit die funktionalen NLS-Signale auch schon überzeugend eingrenzen, wären zusätzliche Experimente zur weiteren Eingrenzung und Bestätigung denkbar. Z.B. könnte man einzelne Aminosäuren aus der Region 113 bis 131 mutieren und so die Funktionalität des NLS-Signals zerstören. Ein ähnliches Experiment wurde zur Identifikation des funktionalen NLS-Signals des Protease-Inhibitor-10 durchgeführt (Chuang et al., 1999). Die vier Aminosäuren KKRR in den Positionen 74 bis 77, die für die Funktion des NLS-Signals des Protease-Inhibitor-10 unerlässlich sind, wurden durch Alanine substituiert. Dies hatte zur Folge, daß das so mutierte EGFP-markierte Protease-Inhibitor-10-Fusionsprotein im Gegensatz zum Wildtyp-Fusionsprotein keine Kernlokalisierung mehr zeigte. Weiterhin wäre möglich, die NLS-haltige Region Dendrins mit einem normalerweise nicht kernlokalisierten Reporter-Protein zu fusionieren und in Zelllinien zu exprimieren. So könnte man beispielsweise die NLS-Region 106 bis 136 alleine mit EGFP fusionieren und so herausfinden, ob das normalerweise gleichmäßig in der Zelle verteilte EGFP mit dieser Modifikation kernlokalisiert ist.

Die Region der funktionellen NLS-Signale (Aminosäuren 106 - 136) bildet außerdem das Kernstück der ebenfalls vom Programm *pSort* (*Lupas's algorithm*, Internetadresse <http://psort.nibb.ac.jp:8800>) identifizierten *coiled coil*-Domäne Dendrins von Aminosäure 103 bis 138 (AEVRAREQEKRRKAASQEREAKETERKRRKAGGARRS). Die Struktur sogenannter *coiled coil*-Domänen basiert auf einem Bündel von α -helikalen Proteinstrukturen, die zu einer Superhelix gewunden sind (Lupas et al, 1996). *Coiled coil*-Domänen in bereits bekannten Proteinen haben diverse Funktionen wie z.B. die Vermittlung der Homo- und Heterodimerisierung von Proteinen (Glover et al, 1995), die Positionierung von DNS-Bindungsdomänen bei DNS-bindenden Proteinen (Joshua-Tor et al, 1995) und sogar die direkte Bindung von DNS (Pellegrini et al, 1995). Beide durch *pSort* identifizierte funktionale bzw. strukturelle Domänen - die NLS-Region (106 bis 131) und die *coiled coil*-Domäne (103 bis 138) - liegen in Sequenzregionen Dendrins, die in der Ratten-, der Maus-Version und sogar in der humanen Version Dendrins (Nagase et al., 1998) eine 100%ige Aminosäurekonservierung aufweisen. Diese Konservierung in verschiedenen Spezies spricht dafür, daß diese Domänen signifikante Rollen in der Funktion Dendrins spielen könnten.

Es stellt sich daher die Frage, welchen Beitrag die nukleäre Lokalisation und auch die *coiled coil*-Domäne für die Funktion Dendrins leisten. Weitere Teilprogramme von *pSort* konnten keinerlei DNS- bzw. RNS-Bindungsdomänen in der Primärstruktur Dendrins identifizieren, die Dendrin als Transkriptionsfaktor oder RNS-bindendes Protein auszeichnen würden und so dessen nukleäre Lokalisation funktionell erklären könnten. Dennoch schließt das negative Suchergebnis von *pSort* diese Möglichkeiten nicht vollständig aus, denn geringe Homologien zu den bekannten RNS- bzw. DNS-Bindungsdomänen werden von den Algorithmen des Programms sicherlich nicht mehr erkannt. Außerdem zeigen einige wenige Beispiele, daß auch Aminosäure-sequenzen ohne die bekannten DNS-Bindungsmotive eine Rolle bei der Bindung von DNS spielen können, wie z.B. die *coiled coil*-Domäne des "*serum response factor*" (Pellegrini et al., 1995).

4.2. Analyse des vesikulären Proteintransports Dendrins zwischen Soma und Zellperipherie

Neben der klaren Kernlokalisierung sind die Fusionsproteine, die von den Konstrukten *EGFP-Dendrin* (1 bis 707) und *EGFP-N-term* (1 bis 570) gesteuert werden, in vesikulären Strukturen im Soma und entlang der Zellfortsätze zu beobachten. Die Anreicherung dieser Fusionsproteine in Vesikeln kann jedoch lediglich in etwa 60% aller transfizierter Zellen (in NIH3T3-, C2C12- und MDCK-Zellen) beobachtet werden, während die übrigen transfizierten Zellen nur eine Kernlokalisierung und keinerlei zytoplasmatische Lokalisation aufweisen. Diese Beobachtung erweckt den Eindruck, daß die Zellen in zwei verschiedenen Zuständen existieren könnten, einem Zustand, in dem die Fusionsproteine lediglich kernlokalisiert sind und in einem anderen Zustand, in dem die Fusionsproteine im Kern und in Transportvesikeln im Soma zu finden sind. Es läßt sich bislang nicht erklären, warum die *EGFP-Dendrin*-Fusionsproteine in Podozyten nahezu nie Vesikel im Soma bilden, sondern lediglich kernlokalisiert sind. Außerdem bleibt anzumerken, daß Fusionsproteine, die vom Konstrukt *EGFP-7s/4as* (Aminosäuren 106 - 707) gesteuert werden, im Gegensatz zu Fusionsproteinen, die von den Konstrukten *EGFP-Dendrin* (Aminosäure 1 - 707) und *EGFP-N-term* (Aminosäure 1 - 570) gesteuert werden, niemals in vesikulären Strukturen, sondern nur im Kern zu finden sind. Diese Beobachtung könnte beispielsweise dafür sprechen, daß in der Aminosäureregion 1 bis 105 eine funktionelle Domäne liegt, die essentiell für den vesikulären Protein-Transport Dendrins ist, also z.B. mit dem verantwortlichen Transportprotein interagiert.

Erste *time-lapse*-mikroskopische Experimente mit Fibroblasten, die mit dem Konstrukt *EGFP-Dendrin* (1 - 707) transfiziert worden waren, konnten zeigen, daß sich die fusionsproteinhaltigen Vesikel gerichtet und saltatorisch bewegen. Ein Beispiel einer anterograden Bewegung eines Vesikels wurde im Rahmen dieser Arbeit

dargestellt, es existieren jedoch auch erste Hinweise auf retrograde Vesikelbewegungen. Bei der Beobachtung von vesikulären Bewegungen durch *time-lapse*-Mikroskopie von transfizierten Fibroblasten erwies sich die extrem hohe Motilität der Fibroblasten auf der Oberfläche der Kulturschale als problematisch, die häufig zu Fokusverschiebungen während des Beobachtungszeitraums führte. Für zukünftige *time-lapse*-Experimente wäre es demnach ratsam, andere Zelllinien zu verwenden, die eine geringere Motilität aufweisen: für das ohnehin hauptsächlich in Neuronen exprimierte Dendrin bieten sich hierfür Primärkultur-Neuronen des Hippokampus an. Primärkultur-Neuronen lassen sich mit der hier verwendeten Lipofektion jedoch nur mit geringer Effizienz transfizieren, so daß sich für eine effiziente Beobachtung mittels *time-lapse*-Mikroskopie eine Umklonierung der cDNS des Fusionsproteins in einen viralen Vektor, z.B. den Sindbis-Virus-Vektor anbieten würde. Virus-vermittelte Transfektionen von Primärkultur-Neuronen verlaufen in der Regel sehr viel effizienter als Transfektionen durch Lipofektion.

An zahlreichen intrazellulären Transportvorgängen von Zellorganellen, Proteinen oder RNS ist das mikrotubuläre Netzwerk beteiligt (Kaether und Kiebler, 1999). Um der Frage nachzugehen, ob auch die dendrinhaltigen Transportvesikel Mikrotubuli-abhängig sind, wurden Fibroblasten, die zuvor mit dem Konstrukt *EGFP-Dendrin* transfiziert worden waren, einer Mikrotubuli-depolymerisierenden Substanz namens Nocodazol ausgesetzt (Kobayashi et al, 1998). Nach einer 2stündigen Inkubation mit Nocodazol ging die vollständige Zerstörung des mikrotubulären Netzwerks mit einem vollständigen Verschwinden der dendrinhaltigen Transportvesikel einher. Lediglich die Kernlokalisierung des Fusionsproteins war nach der Zerstörung der Mikrotubuli noch zu beobachten. Nach dem Austausch des nocodazolhaltigen Mediums durch normales Kulturmedium konnte sowohl die Rückbildung des mikrotubulären Netzwerks als auch die Rückbildung der dendrinhaltigen fluoreszierenden Transportvesikel beobachtet werden. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß das Auftreten dendrinhaltiger Transportvesikel von der Existenz intakter Mikrotubuli abhängig ist. Die durch *time-lapse*-Mikroskopie beobachteten saltatorischen, gerichteten Bewegungen der Vesikel und ihre Abhängigkeit vom mikrotubulären Netzwerk legen die Funktion der dendrinhaltigen Vesikel als Transporteinheiten zwischen Soma und Zellperipherie nahe.

Weiterhin wurde die Frage untersucht, ob die dendrinhaltigen Transportvesikel mit Hilfe eines der bekannten Mikrotubuli-abhängigen Motorproteine, wie z.B. Kinesin oder Dynein, transportiert werden. Zu diesem Zweck wurden Fibroblasten, die mit dem Konstrukt *EGFP-Dendrin* (1 - 707) transfiziert worden waren, mit monoklonalen Antikörpern gegen Kinesin oder Dynein gefärbt. Während Kinesin in den Zellen fast überall und viel zu stark exprimiert war, um eindeutige kinesinhaltige Transportvesikel und ihre Kolokalisation mit dendrinhaltigen Vesikeln zu beobachten, war die Kolokalisation zwischen dynein- und dendrinhaltigen Transportvesikeln

überzeugend. Dynein scheint daher am Transport der dendrinhaltigen Vesikel beteiligt zu sein. Einige wenige dyneinhaltige Vesikel, die nicht mit dem stark überexprimierten EGFP-Dendrin-Protein kolokalisierten, waren höchstwahrscheinlich am Transport anderer Ziel-Proteine Dyneins beteiligt. Die sehr wenigen dendrinhaltigen Transportvesikel, die nicht mit dyneinhaltigen Vesikeln kolokalisierten, könnten auf die geringe Beteiligung eines weiteren Motorproteins beim Proteintransport Dendrins hinweisen. Diesen Beobachtungen zufolge wäre es denkbar, daß Dendrin mit dem Mikrotubuli-abhängigen und ATP-verbrauchenden Motorprotein Dynein zu Transportzwecken entweder direkt oder aber über dritte Interaktionspartner interagiert. Es wäre möglich, daß -wie zuvor beschrieben- die Aminosäureregion 1 bis 105 Dendrins bei dieser direkten oder durch dritte Faktoren vermittelten Interaktion eine entscheidende Rolle spielt, da sich bei der Expression des Konstrukts *EGFP-7s/4as* (106 bis 707) keine Transportvesikel bilden. In einem anderen Fall konnte bereits nachgewiesen werden, daß die leichte Kette Dyneins eine direkte Interaktion mit der *coiled coil-Domäne* eines interagierenden Proteins eingehen konnte (Schnorrer et al., 2000). Obwohl das Konstrukt *EGFP-7s/4as* (106 bis 707) zwar einen Großteil der *coiled coil-Domäne* Dendrins enthält, könnte die native Struktur dieser Domäne durch den Verlust der angrenzenden Regionen Dendrins oder durch die unmittelbare räumliche Nähe des EGFP-Proteins in dem von *EGFP-7s/4as* gesteuerten Fusionsprotein verändert worden sein, so daß keine Bindung an Dynein selbst oder an das überbrückende Protein mehr möglich wäre.

Dynein ist ein Motorprotein, das unter ATP-Verbrauch Fracht vom Plusende der Mikrotubuli in Richtung Minusende transportiert. Da in neuronalen Axonen die Mikrotubuli alle gleich orientiert sind, d.h. ihre Plusenden in der Peripherie und ihre Minusenden in Richtung Zellkörper liegen, kann Dynein in Axonen nur den retrograden Transport vermitteln. Kinesin, das seine Fracht nur vom Minusende zum Plusende der Mikrotubuli transportieren kann, ist hingegen in Axonen nur für den anterograden Transport zuständig. Die Mikrotubuli der neuronalen Dendriten sind im Gegensatz zu denen der Axone zufällig orientiert, was zur Folge hat, daß in Dendriten beide Motorproteine -Kinesin und Dynein- trotz ihrer unterschiedlichen Bewegungsrichtungen sowohl anterograden als auch retrograden Transport von Zielproteinen vermitteln können (Burack et al., 2000). Aufgrund dieser speziellen Mikrotubuli-Orientierungen in Neuronen und ihrer Bedeutung für die Richtung des Dynein-vermittelten Transports wäre eine Wiederholung zumindest der Dynein-Antikörper-Färbungen in *EGFP-Dendrin* transfizierten Primärkultur-Neuronen sinnvoll.

Die Umklonierung der cDNS des EGFP-Dendrin Fusionsproteins in den Sindbis-Virus-Vektor *pSinRep5* und die effiziente virus-vermittelte Transfektion von hippokampalen Primärkultur-Neuronen könnte in Zukunft noch weitere funktionelle Informationen über Dendrin liefern. So könnten Immunofärbungen von *EGFP-*

Dendrin transfizierten hippocampalen Neuronen mit einem Antikörper gegen den dendritischen Marker MAP-2 Aufschluß darüber geben, ob die dendrinhaltigen Transportvesikel nur in dendritischen Zellfortsätzen oder auch in Axonen zu finden sind. Weiterhin könnte eine Immunofärbung von *EGFP-Dendrin* exprimierenden Neuronen mit einem Antikörper gegen das synaptische Vesikelprotein Synaptophysin zeigen, ob einige dendrinhaltige Transportvesikel mit Synaptophysin kolokalisieren und Dendrin daher auch in der Nähe von Synapsen lokalisiert ist. Das Sindbis-Virus-gesteuerte Expressionssystem ermöglicht sogar die effiziente Transfektion organotypischer "Hirnschnitt-Kulturen", die *in vivo*-Bedingungen wesentlich authentischer simulieren als Primärkultur-Neuronen und die aufgrund noch intakter synaptischer Verknüpfungen sogar elektrophysiologische Manipulationen und Analysen ermöglichen. Weitere neue Erkenntnisse über die Eigenschaften und die Funktion Dendrins lassen sich von immunzytochemischen Analysen mit zwei neuen polyklonalen Peptidantikörpern erwarten, die gegen zwei verschiedene Dendrin-Epitope (der Maus-Sequenz) der Aminosäure-Regionen 1 - 21 und 691 - 710 gerichtet sind. Mit diesen Antikörpern sollte die Verteilung des endogenen Dendrins in hippocampalen Primärkultur-Neuronen und in Hirnschnitten detektierbar sein und die durch Expression von EGFP-Fusionsproteinen gewonnenen Erkenntnisse sollten durch diese Immunfärbungen bestätigt und erweitert werden. Außerdem könnten die Dendrin-Antikörper für Immunpräzipitationen oder *GST pull-down*-Experimente genutzt werden, um beispielsweise eine direkte Interaktion Dendrins mit seinem putativen Motorprotein Dynein oder einem anderen interagierenden Protein nachzuweisen.

Abschließend stellt sich die Frage, wie sich die nukleäre Lokalisation des Dendrin Proteins, die somatische und dendritische Lokalisation der Dendrin mRNA und das Auftreten von Mikrotubuli-abhängigen, mit Dynein kolokalisierenden Dendrin-Transportvesikeln in einen funktionalen Zusammenhang bringen lassen. Es wäre beispielsweise denkbar, daß die Dendrin mRNA aktiv mit Hilfe eines noch unbekanntes Trans-Faktors und einem cis-agierenden Lokalisierungssignal im zweiten Exon der reifen mRNA Dendrins in die Dendriten transportiert wird. Anschließend könnte die Dendrin mRNA -möglicherweise in der Nähe von Synapsen und als Antwort auf einen spezifischen Stimulus- mit Hilfe der dort befindlichen Translationsmaschinerie in das Dendrin Protein translatiert werden. Diese in Dendriten entstandenen Dendrin Proteine könnten alleine oder zusammen mit anderen Interaktionspartnern retrograd mit Hilfe des Mikrotubuli-abhängigen Motorproteins Dynein in Form von Transportvesikeln von der Zellperipherie in das Soma und letztlich vielleicht sogar in den Zellkern transportiert werden, um dort selbst oder durch weitere Interaktionspartner eine spezifische Funktion im Kern zu erfüllen wie z.B. die Veränderung des Expressionsmusters der Zelle.

4.3. Dendrin *knock-out*-Mäuse

Zur möglichen Aufklärung der Funktion Dendrins wurde das Dendrin-Gen isoliert, charakterisiert und sollte anschließend durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen der Maus konditional durch die Anwendung des *Cre/Lox*-Systems inaktiviert werden. Zu diesem Zweck wurde ein *3 Lox-Targeting-Konstrukt* kloniert, bei dem der im Intron positionierte Selektionsmarker -die *PGK/Neomycin-Kassette*- von zwei *LoxP*-Elementen flankiert wurde und ein drittes *LoxP*-Element 1,5 kb 3'-wärts vom Transkriptionseende Dendrins lokalisiert war. Die Flankierung der *PGK/Neomycin-Kassette* mit *LoxP*-Elementen ermöglichte durch die transiente Expression der *Cre*-Rekombinase im positiven ES-Zell-Klon die Eliminierung des Selektionsmarkers nach der erfolgreichen homologen Rekombination, so daß das daraus hervorgehende *2Lox*-Allel und das WT-Allel in gleichem Ausmaß exprimiert sein sollten. Nach der darauf folgenden Kreuzung der heterozygoten *2Lox*-Allel-Mäuse mit Mäusen, die die *Cre*-Rekombinase unter der Kontrolle eines zeit- und zellspezifischen Promoters exprimieren, sollte das Dendrin-Gen zeit- und zellspezifisch durch die *Cre*-vermittelte Eliminierung des gesamten zweiten Exons (Aminosäuren 71 bis 710 und die gesamte 3'UTR) inaktiviert werden. ES-Zellen des einzigen korrekt homolog rekombinierten *3-Lox*-Allel-Klons 167.4 und des *2-Lox*-Allel-Klons 325 wurden in Blastozysten injiziert. Während aus der Injektion des *2-Lox*-Klons 325 leider keine Keimbahn-Chimären hervorgingen, konnte für die Chimären, die aus der Injektion des *3-Lox*-Klons 167.4 entstanden, die Keimbahnübertragung des rekombinanten Allels festgestellt werden.

Die homozygoten *3-Lox*-Allel-Mäuse exprimierten im Alter von vier Wochen nur noch 2% der natürlichen Dendrin-Menge. Dies konnte durch differentielle Hybridisierung von Dendrin-cDNS in M13-Phagen mit Oligonukleotiden, die spezifisch für das mutierte Allel waren, herausgefunden werden. Die in Kapitel 3.4.1. beschriebenen in-situ-Hybridisierungen gaben Aufschluß darüber, warum die homozygoten Dendrin-*3Lox*-Allel-Mäuse bereits eine so stark reduzierte Dendrin-Expression aufweisen. In-situ-Hybridisierungen an Hirnschnitten homozygoter Dendrin-*3Lox*-Allel-Mäuse mit einem markierten Oligonukleotid, das zu einem Bereich des ersten Exons komplementär war, detektierten eine Dendrin mRNA, die im Vergleich zum Wildtyp etwas geringer exprimiert, jedoch -bis auf die fehlende dendritische Lokalisation im Hippokampus- vollkommen normal verteilt war. Im Gegensatz dazu zeigten in-situ-Hybridisierungen mit einem radioaktiv markierten Oligonukleotid, das zu einer Sequenz des zweiten Exons homolog war, an Hirnschnitten homozygoter Dendrin-*3Lox*-Allel-Mäuse keinerlei RNS-Signal. Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß durch die Anwesenheit der *neo*-Kassette im Intron zwischen Exon 1 und 2 eine verkürzte Dendrin mRNA gebildet wird, die die Sequenzen von Exon 1 beinhaltet, dann aber höchstwahrscheinlich mit dem polyA-Signal des Neomycin-Gens endet. Das Fehlen der Sequenzen des gesamten Exons 2

und der 3'UTR ist daher wahrscheinlich für die fehlende dendritische Lokalisation dieser trunkierten Dendrin mRNA verantwortlich.

Die Transkription einer so stark verkürzten Dendrin-Neomycin-mRNA führt zu einer stark reduzierten Expression des nativen Dendrins von 2% der Wildtyp-Expression in homozygoten Dendrin-3Lox-Allel-Mäusen, was durch differentielle Hybridisierung bestimmt werden konnte. Diese stark reduzierte Dendrin-Expression verleiht den homozygoten Dendrin-3Lox-Allel-Mäusen "knock-out"-Charakter. Um diesen "knock-out"-Charakter der homozygoten 3Lox-Allel-Mäuse zu bestätigen, wurde die Hirn-RNS von Wildtyp-Mäusen und von hetero- und homozygoten Dendrin-3Lox-Allel-Mäusen durch Northern Blot-Analyse untersucht. Im Northern Blot konnte für homozygote 3Lox-Allel-Mäuse -wie schon zuvor bei der in-situ-Hybridisierung mit dem Oligonukleotid aus Exon 2- kein Dendrin-mRNA-Signal detektiert werden. Da der "knock-out"-Charakter der homozygoten Dendrin-3Lox-Allel-Mäusen durch differentielle Hybridisierung, in-situ-Hybridisierung und Northern Blot-Analyse nachgewiesen worden war, wurde auf eine Kreuzung der 3Lox-Allel-Mäuse mit "Cre-deleter"-Mäusen zur Herstellung klassischer "knock-out"-Mäuse verzichtet (Schwenk et al., 1995). Weiterhin wurde auf eine Injektion eines weiteren 2-Lox-Klons zur Etablierung einer konditionalen "knock-out"-Maus verzichtet, da die Dendrin-3Lox-Allel-Mäuse mit ihrem eindeutigen "knock-out"-Charakter lebensfähig und fertil sind und keinen offensichtlichen Phänotyp zeigen. Die Generierung einer konditionalen "knock-out"-Maus ist allerdings nur bei solchen Targetgenen sinnvoll, die -sofern sie komplett inaktiviert werden- einen pränatal oder im frühen postnatalen Stadium lethalen Phänotyp besitzen.

Der zunächst aufgrund der vielen Ähnlichkeiten erwartete funktionale Zusammenhang zwischen Dendrin und Synaptopodin konnte durch Analysen der Dendrin- und Synaptopodin-"knock-out"-Mäuse nicht bestätigt werden. Durch in-situ-Hybridisierungen wurde nachgewiesen, daß sich die Expression Dendrins in Synaptopodin-"knock-out"-Mäusen nicht verändert. Auch die Analyse der Dendrin-3Lox-Allel-"knock-out"-Mäuse durch in-situ-Hybridisierung und Western Blot-Analyse zeigte auf mRNA- wie auch auf Protein-Ebene keine veränderte Expression von Synaptopodin. Diese Analysen sprechen gegen einen funktionellen Zusammenhang oder gar überlappende Funktionen Dendrins und Synaptopodins. Weitere Analysen der Dendrin- und Synaptopodin-"knock-out"-Mäuse bestätigen den fehlenden funktionalen Zusammenhang zwischen beiden Proteinen. Während z.B. in der Synaptopodin-"knock-out"-Maus reduzierte Expressionen des Aktin-bindenden α -Aktinins und des fokalen Adhäsionsproteins Paxillin auf Protein-Ebene detektiert werden konnten (unveröffentlichte Daten von P. Mundel), zeigten Dendrin-3Lox-Allel-"knock-out"-Mäuse auf Protein-Ebene keine Veränderungen bezüglich der Expression von α -Aktinin und Paxillin, was allerdings aufgrund der intrazellulären Verteilungen von Dendrin und Synaptopodin nicht weiter verwundert. Synaptopodin

zeigt eine mit Aktin kolokalisierende Verteilung in der Zelle, die sensitiv ist gegen die Behandlung mit Cytochalasin B, einem Aktin-depolymerisierendem Agens. Eine in der Synaptopodin-"*knock-out*"-Maus reduzierte Expression des Aktin-bindenden α -Aktinins ergibt aufgrund der offensichtlichen Aktin-Assoziation Synaptopodins Sinn, nicht jedoch für den "*knock-out*" Dendrin, das -entsprechend seiner intrazellulären Verteilung- nicht Aktin-assoziiert sein sollte. Die Resultate des von T. Schulz durchgeführten *yeast two-hybrid-screens*, nach dem Dendrin und α -Aktinin miteinander interagieren, ließen sich demnach weder durch die intrazelluläre Verteilung Dendrins noch durch eine veränderte Expression α -Aktinins im Dendrin-"*knock-out*" bestätigen.

Da Synaptopodin im Gegensatz zu Dendrin in Podozyten in fokalen Kontaktregionen zu finden ist, ist auch die reduzierte Expression des fokalen Adhäsionsproteins Paxillin für den Synaptopodin-"*knock-out*" stimmig, nicht jedoch für den Dendrin-"*knock-out*".

Synaptopodin und Dendrin scheinen demnach zumindest in keinem unmittelbaren funktionellen Zusammenhang zu stehen.

Die vorläufige Analyse der Dendrin "*knock-out*"-Maus konnte leider bisher keine weiteren Hinweise auf die Funktion Dendrins geben, da die Inaktivierung Dendrins zumindest keinen offensichtlichen Phänotyp zur Folge hat. Dendrin scheint demnach keine lebenswichtige Funktion zu erfüllen, oder aber es existieren effiziente physiologische Ersatzmechanismen, die die Funktion Dendrins übernehmen können.

Weitere Informationen über die Eigenschaften Dendrins und damit auch neue Analysemöglichkeiten für die Dendrin-"*knock-out*"-Maus sollten sich in naher Zukunft durch immunzytochemische Experimente mit Hilfe der neuen Peptidantikörper gegen Dendrin ergeben.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß das vorwiegend in Großhirn-Strukturen exprimierte Protein Dendrin, das seinen Namen seiner Gegenwart in Dendriten und der dendritischen Lokalisation seiner mRNA verdankt, ein funktionelles nukleäres Lokalisations-Signal (NLS) besitzt. Dieses NLS, das von dem Computer-Programm *pSort* in der Aminosäureregion 113 bis 131 vorausgesagt wurde, konnte experimentell durch die Expression von EGFP-Dendrin-Fusionsproteinen mit diversen Trunkierungen im Dendrin-Bereich in eukaryontischen Zelllinien auf die Aminosäureregion 106 bis 136 eingegrenzt werden. Darüberhinaus zeigte die Expression des nicht trunkierten EGFP-Dendrin-Fusionsproteins in eukaryontischen Zelllinien und in neuronalen Primärkulturen, daß neben einem mRNA-Transport Dendrins in die Dendriten auch ein vesikulärer Transport des Dendrin Proteins zwischen Soma und Zellperipherie existiert. "Time-lapse"-mikroskopischen Experimenten mit EGFP-Dendrin exprimierenden Fibroblasten zufolge bewegten sich diese dendrinhaltigen Transportvesikel auf saltatorische Weise in anterograder und mit größter Wahrscheinlichkeit auch in retrograder Richtung. Experimente mit der Mikrotubuli-depolymerisierenden Substanz Nocodazol demonstrierten die Mikrotubuli-Abhängigkeit des vesikulären Proteintransports von Dendrin. Weiterhin wurde durch Immunfärbungen von EGFP-Dendrin exprimierenden Fibroblasten mit einem anti-Dynein-Antikörper gezeigt, daß Dynein-Transportvesikel mit EGFP-Dendrin-haltigen Transportvesikeln kolokalisieren, was die Beteiligung des Mikrotubuli-abhängigen Motorproteins Dynein am Protein-Transportprozess Dendrins nahelegt.

Um möglicherweise Hinweise auf die physiologische Funktion Dendrins zu erhalten, wurde das Dendrin-Gen mit Hilfe eines "3-Lox gene targeting"-Konstrukts in embryonalen Stammzellen der Maus homolog rekombiniert und dadurch in homozygoten "3Lox-*Allel*"-Mäusen bis auf 2% Restexpression inaktiviert. Diese fast vollständige Inaktivierung Dendrins, die auf *Northern Blot*- und *in-situ*-Ebene und durch differentielle Hybridisierung dokumentiert werden konnte, hatte keinen offensichtlichen Phänotyp der Dendrin "knock-out"-Mäuse zur Folge. Dies bedeutet entweder, daß Dendrin keine lebensnotwendige Funktion hat oder daß die Funktion Dendrins effizient durch alternative Stoffwechselwege erfüllt werden kann. Der zunächst vermutete funktionelle Zusammenhang zwischen Dendrin und dem in vielerlei Hinsicht ähnlichen Protein Synaptopodin ließ sich durch die Analyse der Dendrin- und auch der Synaptopodin-"knock-out"-Mäuse nicht bestätigen.

Die neuen Ergebnisse der zellbiologischen Analysen Dendrins könnten implizieren, daß die Dendrin mRNA nach ihrer Lokalisation in die Dendriten lokal und eventuell stimulusinduziert translatiert werden könnte. Das in der Peripherie entstandene Dendrin Protein könnte dann -möglicherweise zusammen mit anderen Faktoren-

retrograd mit Hilfe des Motorproteins Dynein in Transportvesikeln von der Zellperipherie ins Soma und letztlich in den Zellkern transportiert werden, wo es eine bisher noch unbekannte Funktion erfüllen könnte.


```

CTAGATGTTACAACTCAAGTTTCAATTCACACTGACCTTAGCTGGTGGATCTCAGAGTGACTACTTTCTGCCCAGGCATCAG
2610
GATCTACAATGTTGAGTTCAAAGTTAAGGTTGAGACGGTGACTGAATCGACCACCTAGAGTCTCACTGATGAAAAGAGGGCCCGTASTC

GGACTAATGTAATGTAAGAGAGCGATTTCTGCCGCCATTCTTTTGTCCCTGAAATTTTGTGAACGAGCGAGTAAATTTGAGGTTT
2700
CCTGATTACATTTACATTTTTCGCTGCTAAAGAGCGGAGGGTAAGAAACAGGGGATCTTAAACACTTGTCTGCTCATCTTAAACGCCAAG

TTACCCACTTCTGCCATCCCTCAGTTCCGAAAGACAGTCAGGTTTTTCAGATTTAAACGGCAAGAGGCTTCATTTCCAAATTTCCGATTT
2790
AATGGGTAAGAGCGGTAGGAGTCAAGCCCTTCTGTCAGTCCCAAAGTCTAAATTTGCCCGTTTCCGAAAGATAAGGTTAAAGGGCTCAAA

AGTGAATGCTCCCCAAGCAGGGCAAGATAAAGBTCCBBTCCACTGCCCTCTBBCTGCTGTGTATCCAAGCTGAGAGGGAAAGTABCCA
2880
TCCACTTACGAGGGGTTTCTGCCCGTCTTATTTCCAGGCGAGGTGACGGAGACCGGACGACACTAGGTTCCGACCCTCCCTTCCATCGT

ATGAATCAGCTTGAACACTTTTAAAGCTGCCCCCTTCTCCATCTCCGTGCTCTTAAATGATGCTCTACGTGTTACCAGACGGCAAGCAG
2970
TACTTAGTCAAGCTTTGTAAATCCGGACGGGAAAGGAGGTABAGGCACAGBAATCACTACBAGATGACAAATGGCTGCCGCTCTGCC

TATGCCACCAGATAGACCTGACTATCTCTGTGCTCTCTCTGAAACAGCCAGGCAGGAGGAAAGTTGATCACAGCAGCGGTGTG
3060
ATACCGGTTGGCTATCTGGGACTGATAGAGACACAGAGAGGACTTTTGTCTGCTCCCTCCCTTCCAACTAGTGTGCTCTGCCACAC

GGTGTGACTGCTGTAAGCCACTACGGGGCGCGCAGGTCGCGGATTTCCCCGCCGTTGCTGGTCTCGAGTCCCTTACACCAGCAC
3150
CCACACTATGAGCGACATCGGTGATGCCCGCGCGCTCCAGCGCTAAGGGGGGGCCAACGACACGAGCTCACGGGATGTGTCTGTG

TGCCAGTTACTGGAATCCCTTATTTCCCGGCCGCTTTCCGCTTGACACCTCCAAACCGCGCGGGGCGGGGACAGGCTCCCGT
3240
ADGGTCAATAGACTTAGGAAATAAGGGCCCGGCGCAAAGGGCGAACTGTTGGAGGTTTGGCGGCGGCCCGCCCTCGTCCGAGGCGCA

CTCCAGACTTCTGGGGCGCGCCGAGCCCTCTTTGTATTAATCACGCTTACCAGTTTGAAGCTGACATTCAGGCTTTTTTTTTTTTTT
3330
GAGGCTGAAACACCCCGCGCGCTCGGAGAAACATAATAGGTGCGSATGGCCAACTCTACTGTAAATTCAGAAAAAAGAAAAA

TCTTTCTTTTCTTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTT
3420
AGAAAGGAAAGGAAAGCAAAAGGAAAGGAAAGGTTTGGACCCGTTAAGGACACACAGAGGGTGAATGATCGGTACACTGGA

TGCCAAATCACTTCACTCCCTGAGCCCTAGTTTCTCTCATCTGTTCAAAGGGGTTATAAACACTTACCCTGCAAGGTTTGTGTAG
3510
ACCGGTTAGTGAAGTGAAGGAGCTCGGAGTCAAGGAGTAGACAGTTTACCCCAAATATTGTGGATGGAGCTGCCAACCAACTC

GATTTAATGAGGTAATGTATATAAAGCGCTTGCACAGTGCCTGGACATAGTGGCGCCAAATAATCTACTCGTCCCTTAAAA
3596
CTAAATTAATCCATTACATATAATTCGCAAGAGTGTACAGGACGTTGATCATCCGCGGGTATTTGATGAGCAGGAAATTTT

```

Die unterstrichenen Aminosäuresequenzen stellen die beiden "Nuclear Targeting Signals" (NLS) dar, die vom Programm *pSort* identifiziert worden waren. Die Nukleotidsequenz von 2125-3596 umfaßt die gesamte 3'UTR der Dendrin cDNS der Ratte.

6.2. Abkürzungsverzeichnis

A	Ampère
Arc	Aktivitäts-abhängiges Cytoskelett-assoziiertes Protein
bp	Basenpaar
CaMKII	Calcium/Calmodulin abhängige Proteinkinase II
cDNS	zur mRNS komplementärer DNS-Strang
DEN	Dendrin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
ES	embryonale Stammzellen
G418	Geneticin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
MAP-2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2
mRNS	Boten-Ribonukleinsäure
<i>neo</i>	Neomycin-Phosphotransferase
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
<i>pgk</i>	Phosphoglyceratkinase
RT	reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
3'UTR	3' untranslatierte Region
V	Volt
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

6.3. Liste der verwendeten Oligonukleotide

ES-Zell-Selektion

mDEN30 as	5'- GAGCATTTATCCACAGATGACTTG-3'
mDEN33 as	5'- TGTGCACCCTTGAAGACTTGTCTC -3'
LoxP-1s	5'- TGCTATACGAAGTTATTGCAGCC -3'
LoxP-2s	5'- ATTCCGGGGGATCCACTAGTTC -3'
mDEN42 as	5'- AGCCTACACCTGGGACAATGAGC -3'
mDEN40 s	5'- CTGTTGGTGATTGAAGTGAAGAC -3'
mDEN43 as	5'- CGTGTGAGTGTCTGAGCGAGTGC -3'
mDEN41 s	5'- ACTGGGGCCTGAATCATTGAGC -3'
pLoxPneo-1s	5'- GAATTCGGATCATATTCAATAACC -3'
mDEN 28s	5'- GAGCTTGCCAAGGATAGAGTC -3'
mDEN39as	5'- TAGCCCTCCAGGACCTGCTGTC -3'

Zur Klonierung verwendete Oligonukleotide

pEGFP-Eco 1s	5'- CAGGAATTCGCTGGATGGCCCGTTATTCTCC -3'
pEGFP-Sal 2as	5'- CTGGTCGACCTGTCGCTCACGATGCATGACTC -3'
pEGFP-Eco 3s	5'- CTGGAATTCTGGAGGCACCGGGTGGAAAGAG -3'
pEGFP-Sal 4as	5'- CGCGTCGACAGGAGGGGCGTCGCTCACTCTCAC -3'
pEGFP-Eco 7s	5'- GCCGAATTCCTGAGCCCGAGAACAGGAG -3'
pEGFP-Eco 6s	5'- CGCGAATTCACGGAGTCCCCTAGGTCAG -3'
pEGFP-Eco 5s	5'- AGGGAATTCAGGACCCTGGGGACTAAGC -3'
mDEN32 s	5'- GCTCTAGACCCTGGTAAGTAGTATCTTAG -3'
mDEN34 as	5'- CAGGTACCAGGCATTTGTGGCTATATC -3'
mDEN35 s	5'- GCATCCTACCTATGCACTTACTG -3'
mDEN36 as	5'- CATGTGAAGGTCAGATGCTTG -3'
mDEN45 as	5'- GGTGAATTCAGAAAACCTGGAAACCCTGTAG -3'
mDEN47 s	5'- TCCAGGGTGCTGCAGGAGGC -3'
ratDEN46 s	5'- GACCAACTGGCGGGCAGGG -3'

In-situ-Hybridisierung

mDenis4	5'- CTGCAGAGCCTCTCAACAGCAGGTGAGCCTCGTACGTAG-3'
mDEN1	5'- CTTGGACTTCTGCACCCAGAGGCAGCTGCCGGACTC -3'
synpto.is1	5'- GTCCTGTTGACCACGGATGCAGGCTTGGCTAGTGTGAGATG-3'

Sequenzierung

lac	5'- GTTTTCCCAGTCACGAC -3'
lac rev	5'- CAGGAAACAGCTATGAC -3'
rDEN14 s	5'- GAATCTACCGGGATGTTCTAGG -3'
rDEN15 s	5'- TGTGCAGCAGCCAGAGCTAG -3'
rDEN 16 as	5'- TCTGGCTATGCCTAACTGGAGG -3'
rDEN 17 s	5'- TCATGCATCGTGAGCGACAG -3'
rDEN18 as	5'- TGGGCCTAAGGTCGAGTGCTC -3'
rDEN19s	5'- AGCCTTGCGGGAAGCCGTGTC -3'
rDEN20s	5'- ACCTAGTGCAGGAGACAGAGG -3'
rDEN21 as	5'- TCCAAGCTGATTCATTGGCTACC -3'
rDEN22 s	5'- ACTTCTGCCATCCTCAGTTCG -3'
rDEN23 as	5'- GCGCGCGGTTTGGAGGTGTC -3'
rDEN24 s	5'- ACACCAGCACTGCCAGTTATC -3'
rDEN25s	5'- GATTCTAGATGTCATCAGTCAAACC -3'
mDEN26 as	5'- ATAGCTGGAAGTTGCTGTGTAAAC -3'
mDEN27 s	5'- GACTTCTTCCCGCTCATTGTG -3'
mDEN29 as	5'- GTGAAGGTCAGATGCTTGCTTTATG -3'
T3	5'- CGCGCAATTAACCCTCACTAAAGGG -3'
T7	5'- CGTAATACGACTCACTATAGGGCG -3'
neo4	5'- GGCTATTCGGCTATGACTGGGC -3'
neo5	5'- GGGTAGCCAACGCTATGTCCTG -3'

7. Literatur

Ainger, K., Avossa, D., Diana, A.S., Barry, C., Barbarese, E., and Carson, J.H. (1997). Transport and localization elements in myelin basic protein mRNA. *J. Cell Biol.* **138**, 1077-1087.

Allen, R. D., Metzals, J., Tasaki, I., Brady, S. T., and Gilbert, S. P. (1982). Fast axonal transport in squid giant axon. *Science* **218**, 1127-1129.

Bailey, C.H., Bartsch, D., and Kandel, E.R. (1995). Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 13445-1352.

Barbarese, E., Koppel, D., Deutscher, M., Smith, C., Ainger, K., Avossa, D., Morgan, F., Carson, J. (1995). Protein translation components are colocalized in granules in oligodendrocytes. *J. Cell Sci.* **108**, 2781 - 2790.

Bian, F., Chu, T., Schilling, K., and Oberdick, J. (1996). Differential mRNA transport and the regulation of protein synthesis: Selective sensitivity of Purkinje cell dendritic mRNAs to translational inhibition. *Mol. Cell Neurosci.* **7**, 116-133.

Blichenberg, A., Schwanke, B., Rehbein, M., Garner, C.C., Richter, D., and Stefan Kindler, S. (1999). Identification of a cis-Acting Dendritic Targeting Element in MAP2 mRNAs. *J. Neurosci.* **19**, 8818-8829.

Burack, M., Silverman, M., Banker, G. (2000). The role of selective transport in neuronal protein sorting. *Neuron* **26**, 465 - 472.

Burgin, K., Waxham, M., Rickling, S., Westgate, S., Mobley, W., Kelly, P. (1990). In situ hybridization histochemistry of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in developing rat brain. *J. Neurosci.* **10**, 1788-1798.

Capecchi, M., (1989). Altering the genome by homologous recombination. *Science* **244**, 1288 - 1292.

Carson, J.H., Kwon, S., and Barbarese, E. (1998). RNA trafficking in myelinating cells. *Curr. Opin. Neurobiol.* **8**, 607-612.

Chuang, T., Schleaf, R. (1999). Identification of a Nuclear Targeting Domain in the Insertion between Helices C and D in Protease Inhibitor-10. *J. Biol. Chem.* **274**, 11194 - 11198.

Craig, A. M., and Banker, G. (1994). Neuronal polarity. *Annu. Rev. Neurosci.* **17**, 267-310.

Deller, T., Merten, M., Roth, S., Mundel, P., Frotscher, M. (2000). Actin-associated protein synaptopodin in the rat hippocampal formation: localization in the spine neck and close association with the spine apparatus of principal neurons. *J. Comp. Neurol.* **418**, 164-181.

Deshler, J.O., Highett, M.I., Abramson, T., and Schnapp, B.J. (1998). A highly conserved RNA-binding protein for cytoplasmic mRNA localization in vertebrates. *Curr. Biol.* **8**, 489-496.

Einbond, A. Sudol, M. (1996). Towards prediction of cognate complexes between the WW domain and prolin-rich ligands. *FEBS Lett.* **384**, 1 - 8.

Elgersma, Y., and Silva, A.J., (1999). Molecular mechanisms of synaptic plasticity and memory. *Curr. Opin. Neurobiol.* **9**, 209-213.

Ellenberg, J., Lippincott, S. J., and Presley, J. F. (1999). Dual-colour imaging with GFP variants. *Trends Cell Biol.* **9**, 52-56.

Ferrandon, D., Elphick, L., Nüsslein-Volhard, C., and St Johnston, D., (1994). Staufen protein associates with the 3'-UTR of bicoid mRNA to form particles that move in a microtubule-dependent manner. *Cell* **79**, 1221-1232.

Forristall, C., Pondel, M., Chen, L., and King, M.L. (1995). Patterns of localization and cytoskeletal association of two vegetally localized RNAs, Vg1 and Xcat-2. *Development* **121**, 201-208.

Frey, U., and Morris, R.G.M. (1997). Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature* **385**, 533-536.

Garner, C., Tucker, R., Matus, A. (1988). Selective localization of messenger RNA for cytoskeletal protein MAP2 in dendrites. *Nature* **336**, 674-677.

Glover, J. Harrison, S. (1995). Crystal structure of the heteromeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. *Nature* **373**, 257 - 261.

Gu, H., Zou, Y., Rajewsky, K. (1993). Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through *Cre-loxP*-mediated gene targeting. *Cell* **73**, 1155 - 1164.

Havin, L., Git, A., Elisha, Z., Oberman, F., Yaniv, K., Schwartz, S.P., Standart, N., and Yisraeli, J.K. (1998). RNA-binding protein conserved in both microtubule- and microfilament-based RNA localization. *Genes & Dev.* **12**, 1593-1598.

Herb, A., Wisden, W., Catania, M., Marechal, D., Dresse, A., Seeburg, P. (1997). Prominent Dendritic Localization in Forebrain Neurons of a Novel mRNA and Its Product, Dendrin. *Mol. Cell. Neurosci.* **8**, 367-374.

Hirokawa, N. (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* **279**, 519-526.

Hirokawa, N. (1997). The mechanisms of fast and slow transport in neurons: identification and characterization of the new kinesin superfamily motors. *Curr. Opin. Neurobiol.* **7**, 605-614.

Hirokawa, N., Noda, Y., and Okada, Y. (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 60-73.

Hoek, K., Kidd, G.J., Carson, J.H., and Smith, R. (1998). hnRNP A2 selectively binds the cytoplasmic transport sequence of myelin basic protein mRNA. *Biochemistry* **37**, 7021-7029.

Joshua-Tor, L., Xu, H., Johnston, S., Rees, D. (1995). Crystal structure of a Conserved Protease that binds DNA: The Bleomycin Hydrolase, Gal 6. *Science* **269**, 945 - 950.

Kaether, C., Kiebler, M. (1999). Dendritische Transportprozesse - ein Ausblick. *Neuroforum* **2/99**, 54 - 60.

Kiebler, M.A., Hemraj, I., Verkade, P., Köhrmann, M., Fortes, P., Marión, R.M., Ortin, J., and Dotti, C.G. (1999). The mammalian Staufen protein localizes to the somatodendritic domain of cultured hippocampal neurons: implications for its involvement in mRNA transport. *J. Neurosci.* **19**, 288-297.

Kislauskis, E.H., Zhu X., and Singer, R.H. (1994). Sequences responsible for intracellular localization of beta-actin messenger RNA also affect cell phenotype. *J. Cell Biol.* **127**, 441-451.

Kloc, M., and Etkin, L.D. (1995). Two distinct pathways for the localization of RNAs at the vegetal cortex in *Xenopus* oocytes. *Development* **121**, 287-297.

Knowles, R.B., Sabry, J.H., Martone, M.E., Deerinck, T.F., Ellisman, M.H., Bassell, G.J., and Kosik, K.S. (1996). Translocation of RNA granules in living neurons. *J. Neurosci.* **16**, 7812-7820.

Kobayashi, N., Reiser, J., Kriz, W., Kuriyama, R., Mundel, P. (1998). Nonuniform Microtubular Polarity Established by CHO/MKLP1 Motor Protein Is Necessary for Process Formation of Podocytes. *J. Cell Biol.* **143**, 1961 - 1970.

Köhrmann, M., Luo, M., Kaether, C., DesGroseillers, L., Dotti, C.G, and Kiebler, M.A. (1999). Microtubule-dependent recruitment of Staufen-GFP into large RNA-containing granules and subsequent dendritic transport in living hippocampal neurons. *Mol. Biol. Cell.* **10**, 2945-2953.

Krecic, A.M., and Swanson, M.S. (1999). hnRNP complexes: composition, structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 363-371.

Kreis, T. E., Matteoni, R., Hollinshead, M., and Tooze, J. (1989). Secretory granules and endosomes show saltatory movement biased to the anterograde and retrograde directions, respectively, along microtubules in AtT20 cells. *Eur. J. Cell Biol.* **49**, 128-139.

Landry, C., Watson, J., Kashima, T.; Campagnoni, A. (1994). Cellular influences on RNA sorting in neurons and glia: an in situ hybridization histochemical study. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **27**, 1 - 11.

Link, W., Konietzko, U., Kauselmann, G., Krug, M., Schwanke, B., Frey, U., and Kuhl, D. (1995). Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 5734-5738.

Lupas, A., (1996). Coiled coils: new structures and new functions. *TIBS* **21**, 375 - 382.

Lyford, G.L., Yamagata, K., Kaufmann, W.E., Barnes, C.A., Sanders, L.K., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Lanahan, A.A., and Worley, P.F. (1995). Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron* **14**, 433-445.

Marión, R.M., Fortes, P., Beloso, A., Dotti, C.G. and Ortín, J. (1999) A human sequence homologue of stauferin is an RNA-binding protein that is associated with polysomes and localizes to the rough ER. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2212-2219.

Mayford, M., Baranes, D., Podsypanina, K., and Kandel, E.R. (1996). The 3'-untranslated region of α -CaMKII is a cis-acting signal for the localization and translation of mRNA in dendrites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 13250-13255.

Morris, R. L., and Hollenbeck, P. J. (1995). Axonal transport of mitochondria along microtubules and F-actin in living vertebrate neurons. *J. Cell Biol.* **131**, 1315-1326.

Muslimov, I.A., Santi, E., Homel, P., Perini, S., Higgins, D., and Tiedge, H. (1997). RNA transport in dendrites: a cis-acting targeting element is contained within neuronal BC1 RNA. *J. Neurosci.* **17**, 4722-4733.

MacDonald, P. (1990). Bicoid mRNA localization signal: phylogenetic conservation of function and RNA secondary structure. *Development* **110**, 161-171.

Macdonald, P.M., and Smibert, C.A. (1996). Translational regulation of maternal mRNAs. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **6**, 403-407.

Mundel, P., Heid, H., Mundel, T., Krüger, M., Reiser, J., Kriz, W. (1997). Synaptopodin: An Actin-associated Protein in Telencephalic Dendrites and Renal Podocytes. *J. Cell Biol.* **139**, 193-204.

Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow, N., Roder, J. (1993). Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 8424 - 8428.

Nagase, T., Ishikawa, K., Suyama, M., Kikuno, R., Miyajima, N., Tanaka, A., Kotani, H., Nomura, N., Ohara, O. (1998). Prediction of the Coding Sequences of Unidentified Human Genes. XI. The Complete Sequences of 100 New cDNA Clones from Brain Which Code for Large Proteins in vitro. *DNA Res.* **5**, 277 - 286.

Nakata, T., Terada, S., and Hirokawa, N. (1998). Visualization of the dynamics of synaptic vesicle and plasma membrane proteins in living axons. *J. Cell Biol.* **140**, 659-674.

Neuner-Jehle, M., Denizot, J., Borbely, A., Mallet, J. (1996). Characterization and sleep-deprivation induced expression modulation of dendrin, a novel dendritic protein in rat brain neurons. *J. Neurosci. Res.* **46**, 138-151.

Okada, Y., Yamazaki, H., Sekine, A. Y., and Hirokawa, N. (1995). The neuron-specific kinesin superfamily protein KIF1A is a unique monomeric motor for anterograde axonal transport of synaptic vesicle precursors. *Cell* **81**, 769-80.

Oleynikov, Y., and Singer, R.H. (1998). RNA localization: different zipcodes, same postman? *Trends Cell Biol.* **8**, 381-383.

Ouyang, Y., Kantor, D., Harris, K.M., Schuman, E.M., and Kennedy, M.B. (1997). Visualization of the distribution of autophosphorylated calcium/calmodulin-dependent protein kinase II after tetanic stimulation in the CA1 area of the hippocampus. *J. Neurosci.* **17**, 5416-5427.

Ouyang, Y., Rosenstein, A., Kreiman, G., Schuman, E.M., and Kennedy, M.B. (1999). Tetanic stimulation leads to increased accumulation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II via dendritic protein synthesis in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **19**, 7823-7833.

Pellegrini, L., Tan, S., Richmond, T. (1995). Structure of serum response factor core bound to DNA. *Nature* **376**, 490 - 498.

Pepperkok, R., Squire, A., Geley, S., and Bastiaens, P. I. (1999). Simultaneous detection of multiple green fluorescent proteins in live cells by fluorescence lifetime imaging microscopy. *Curr. Biol.* **9**, 269-272.

Racca, C., Gardiol, A., and Triller, A. (1997). Dendritic and postsynaptic localizations of glycine receptor alpha subunit mRNAs. *J. Neurosci.* **17**, 1691-1700.

Rhyner, T., Borbely, A., Mallet, J. (1990). Molecular Cloning of Forebrain mRNAs which are Modulated by Sleep Deprivation. *Eur. J. Neurosci.* **2**, 1063-1073.

Ross, A.F., Oleynikov, Y., Kislauskis, E.H., Taneja, K.L., and Singer, R.H. (1997). Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2158-2165.

Schnorrer, F., Bohmann, K., Nüsslein-Volhard, C. (2000). The molecular motor dynein is involved in targeting Swallow and bicoid RNA to the anterior pole of *Drosophila* oocytes. *Nature Cell Biol.* **2**, 185 - 190.

Schulz, T., Diplomarbeit, Heidelberg, 1997.

Schuman, E.M. (1999). mRNA trafficking and local protein synthesis at the synapse. *Neuron* **23**, 645-648.

Schwenk, F., Baron, U., Rajewsky, K., (1995). A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of *loxP*-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucl. Acids Res.* **23**, 5080 - 5081.

Steward, O., and Lewy, W.B. (1982). Preferential localization of polyribosomes under the base of dendritic spines in granule cells of the dentate gyrus. *J. Neurosci.* **2**, 284-291.

Steward, O., and Reeves, T.M. (1988). Protein synthetic machinery beneath postsynaptic sites on CNS neurons: association between polyribosomes and other organelles at the synaptic site. *J. Neurosci.* **8**, 176-184.

St. Johnston, D. and Nüsslein-Volhard, C. (1992). The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell* **68**, 201 - 219.

Sundell, C., and Singer, R. (1991). Requirement of microfilaments in sorting of actin mRNAs. *Science* **253**, 1275 - 1277.

Tongiorgi, E., Righi, M., and Cattaneo, A. (1997). Activity-dependent dendritic targeting of BDNF and TrkB mRNAs in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **17**, 9492-9505.

Vale, R. D., Reese, T. S., and Sheetz, M. P. (1985). Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* **42**, 39-50.

Wickham, L., Duchaine, T., Luo, M., Nabi, I.R., and DesGroseillers, L. (1999). Mammalian Staufen is a double-stranded RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough ER. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2220-2230.

Yisraeli, J., Sokol, S., Melton, D. (1990). A two-step model for the localization of maternal mRNAs in *Xenopus* oocytes: Involvement of microtubules and microfilaments in the translocation and anchoring of VG1 mRNA. *Development* **108**, 289 - 298.