



Interaktion Calbindin D-28k - RanBPM: Konfokale  
Kokalisationen - und Korrelationsanalyse

Carmen Floriani

11. September 2017

Aus dem Physiologischen Institut

Lehrstuhl: Physiologie-Zelluläre Physiologie (im Biomedizinischen Zentrum München)

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Claudia Veigel

# Interaktion Calbindin D-28k-RanBPM: Konfokale Kolokalisations- und Korrelationsanalyse

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Carmen Floriani

aus

Trento

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstater: Prof. Dr. med. Michael Meyer

Mitberichterstater: Prof. Dr. Alexander Dietrich, Prof. Dr. Michael Kiebler

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 03.05.2018

# Eidesstattliche Versicherung

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

Betreuer:  
Prof.Dr. Michael Meyer

Ludwig-Maximilians-Universität München.  
Lehrstuhl für Zellphysiologie, Großhadener Str. 9,  
82152 Planegg-Martinsried, Deutschland.

*An meine Familie, besonders an meinen Bruder Ermes für seine wunderbare Hilfe, an Sabine, Anna und Andrea für ihre Unterstützung.*

*Danke auch an Sabine Mach und Markus Weidelt für ihre unverzichtbare und wertvolle Kollaboration.  
Schließlich Danke an alle meine Lehrer, die nicht nur zum Erlangen meiner fachlichen Kompetenz maßgeblich beigetragen haben, sondern auch zu meiner persönlichen Entwicklung als Mensch und als Ärztin.*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Calbindin D-28k und die EF-Hand Proteinfamilie . . . . .	1
1.1.1	Die Struktur von Calbindin D-28k . . . . .	2
1.1.2	Die Funktionen von Calbindin D-28k . . . . .	2
1.2	RanBPM: Ein Mitglied der Familie der <i>Ran Binding Proteins</i> . . . . .	3
1.2.1	Die Struktur des RanBPM . . . . .	4
1.2.2	Bisher bekannte Funktionen des RanBPM und Interaktionspartner . . . . .	4
1.2.3	Ziel der Arbeit . . . . .	5
<b>2</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>7</b>
2.1	Materialien . . . . .	7
2.1.1	Allgemeine Chemikalien, Reagenzien und Lösungen . . . . .	7
2.1.2	Eingesetzte Primär- und Sekundärantikörper . . . . .	9
2.1.3	Plastik- und Verbrauchsmaterialien . . . . .	10
2.1.4	Geräte und Software . . . . .	11
2.1.5	Plasmide . . . . .	11
2.1.6	Mäuse . . . . .	12
2.1.7	Verwendete Zelllinien . . . . .	12
2.2	Methoden . . . . .	13
2.2.1	Perfusion . . . . .	13
2.2.2	Schneiden der Präparate am Kryostat und Vibratom . . . . .	13
2.2.3	Revitalisieren von kryokonservierten Zellen . . . . .	13
2.2.4	Aussaat der Zellen auf Deckgläschen . . . . .	13
2.2.5	Sequenzierung des RanBPM Expressionsplasmids RanBPM-Flag10 und Transfektion	14
2.2.6	Westernblot-Analyse . . . . .	14
2.2.6.1	Gewebeproben für Westernblot . . . . .	14
2.2.6.2	Zelllyse . . . . .	14
2.2.6.3	Proteinquantifizierung . . . . .	15
2.2.6.4	SDS-PAGE-Gel . . . . .	15
2.2.6.5	Probenzubereitung und Beladen des Gels . . . . .	15
2.2.6.6	Elektrophorese . . . . .	15
2.2.6.7	Westernblot . . . . .	15
2.2.6.8	Proteindetektion . . . . .	16
2.2.6.9	Entwicklung der Membran . . . . .	16
2.2.7	Immunfärbungen . . . . .	16
2.2.7.1	Indirekte Immunfluoreszenz . . . . .	16
2.2.8	Mikroskopie und ihre Anwendungen . . . . .	18
2.2.8.1	Hellfeld- und Phasenkontrastmikroskopie . . . . .	18
2.2.8.2	Weitfeldmikroskopie . . . . .	18
2.2.8.3	Konfokale Mikroskopie . . . . .	18
2.2.8.4	Quantitative Kollokalisationsanalyse: Intensity Correlation Analysis . . .	18

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>20</b>
3.1	Detektion von RanBPM	20
3.1.1	Immunfärbungen	20
3.1.1.1	Nachweis von RanBPM und Calbindin D-28k mittels Immunfluoreszenz in Gefrierschnitten und primären Zellkulturen des Mausgehirns	20
3.1.1.2	Das Vorkommen von RanBPM und Calbindin D-28k in Gefrierschnitten der murinen Netzhaut	23
3.1.1.3	Immunhistochemischer Nachweis von RanBPM in Gefrierschnitten des Kleinhirns	24
3.1.1.4	Nachweis mittels Immunfluoreszenz in free-floating Schnitten des Kleinhirns der Maus	24
3.1.2	Spezifität der Antikörper gegen RanBPM	27
3.1.2.1	Westernblot Analyse	27
3.1.2.2	Immunfärbung an Zelllinien	31
3.2	Intensity-Correlation-Analysis	33
3.2.1	Beschreibung der Daten	33
3.2.2	Analyse der Experimentaldaten	38
3.2.3	Box-Plot aus den Experimentaldaten und Ausschluss von Extremwerten	39
3.2.4	Analyse der Normalität der bereinigten Experimentaldaten	42
3.2.5	Inferenzstatistische Analyse über die Vergleichbarkeit der Mittelwerte	47
3.2.5.1	Der Student-T-Test	47
3.2.5.2	Test über die Mittelwerte der normalverteilten ICQ-Werte: RanBPM-Calbindin D-28k vs. GFAP-Calbindin D-28k	47
3.2.5.3	Test über die Mittelwerte der normalverteilten ICQ-Werte: RanBPM-Calbindin D-28k vs. Calbindin D-28k Monoklonal - Polyklonal	50
3.2.5.4	Test über die Mittelwerte der normalverteilten ICQ-Werte: RanBPM-Calbindin D-28k vs. Parvalbumin-Calbindin D-28k	52
3.2.5.5	Einseitiger Student-T-Test: Vergleich zwischen Mittelwert von ICQ-Werten aus Daten einer Subpopulation von RanBPM-Calbindin D-28k und gegebenem Mittelwert von 0.1	54
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>56</b>
4.1	Spezifität der eingesetzten Antikörper und Immundetektion	57
4.2	Sensitivität der Immunfärbung	58
4.3	RanBPM in Bergmanngliazellen	58
4.4	RanBPM und Calbindin D-28k in der Retina	59
4.5	Der Einsatz von free-floating sections	59
4.6	Das konfokale Laserscanningmikroskop	60
4.7	Ergebnisse der Intensity-Correlation-Analysis (ICA)	61
<b>5</b>	<b>Schlussfolgerungen</b>	<b>65</b>

# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Calbindin D-28k und die EF-Hand Proteinfamilie

Calbindin D-28k ist ein kalziumbindendes Protein, das, aufgrund der charakteristischen Struktur, zur großen Familie der EF-Hand Proteine gehört. Im Menschen und in vielen anderen Spezies gibt es mehr als 200 solcher Proteine, deren Vorkommen organ- oder zelltypspezifisch ist.[27],[23] In anderen Spezies sind über 600 Proteine dieser Art identifiziert worden.[38] Wichtige Vertreter dieser Gruppe sind außerdem Parvalbumin, das als erstes beschrieben wurde, Calretinin, Calmodulin, Calbindin D-9k, Neurocalcin, Recoverin, und Troponin C. Ihren Namen verdanken diese Proteine der Tatsache, dass sie sogenannte EF-Hand-Motive enthalten. Solche Domänen bestehen in der Regel aus 29 bis 30 Aminosäuren.[38] Die

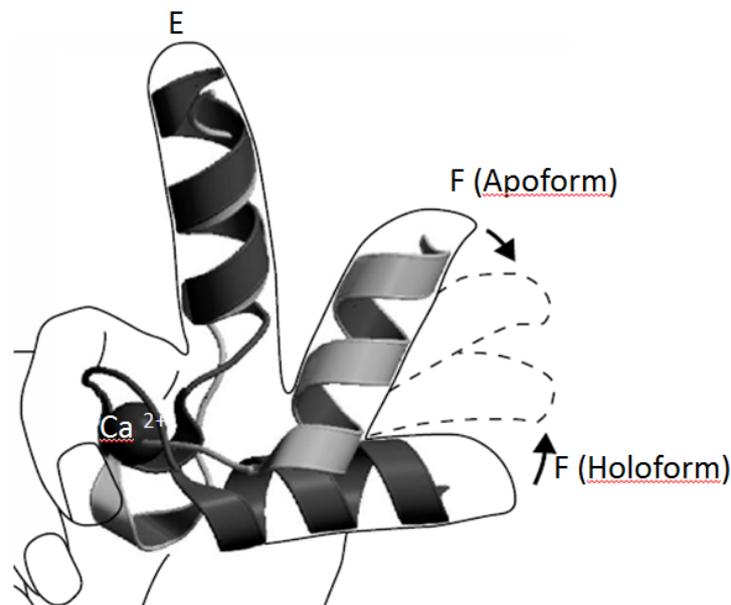


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des EF-Hand Motivs, mit Helices E und F (in der Apo- und in der Holoform) und gebundenem Kalziumion ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (modifiziert nach Lewit-Bentley et al.[38]).

sekundäre Struktur ist durch zwei senkrecht aufeinander stehende E- und F-Helices gekennzeichnet, die durch eine Schleife aus 12 Aminosäuren verbunden sind. Das Calciumion bindet in der Regel an diese Schleife. Hier geht das Calciumion koordinative Bindungen mit sieben Sauerstoffatomen ein, sechs davon gehören zum Protein, das siebte zu einem gebundenen Wassermolekül. Die 6 Aminosäurereste, die in der Schleife an der koordinative Bindung beteiligt sind und ihren hoch-konservierten Abschnitt darstellen, entsprechen der Sequenz X·Y·Z·-Y·-X·-Z. Die Positionen X und Y werden von den Seitenketten von Aspartat oder Asparagin besetzt. Die Seitenketten von Aspartat, Asparagin oder Serin kommen an der

Position Z vor, während -Y durch den Sauerstoff einer Carbonylgruppe gekennzeichnet ist. An der Position -X bindet in den meisten Fällen ein Wassermolekül, während Aspartat- und Glutamatreste meistens an der Position -Z zu finden sind.[38] Konformationsänderungen treten häufig als Folge der Interaktion mit dem Ion ein: Im Allgemeinen verursacht die Bindung des Calciumions eine Bewegung der F-Helix von der sogenannten geschlossenen (Apoprotein) zu der offenen Konformation (Holoprotein).[22] Dadurch wird bei vielen EF-Hand Proteinen eine hydrophobe Bindungsstelle frei, die der Interaktion mit einer Vielzahl von anderen Target-Proteinen in unterschiedlichen Signaltransduktionswegen dient.[38] Die Expression von EF-Hand-Calcium-bindenden Proteinen wird sehr präzise kontrolliert, da sie an der intrazellulären Calciumregulation beteiligt sind, die eine wichtige Rolle für den geordneten Ablauf lebensnotwendiger Zellprozesse spielt.

### 1.1.1 Die Struktur von Calbindin D-28k

Erst 2006 wurde die Struktur des Calbindin D-28k Proteins, das bereits 1966 von Wasserman und Taylor beschrieben wurde,[68],[67] im Rahmen einer NMR-Analyse genauer aufgeklärt.[33] Es wurde gezeigt, dass das Protein durch eine kompakte dreidimensionale Struktur gekennzeichnet ist, die aus sechs EF-Hand-Domänen besteht. Vier der sechs EF-Hand-Domänen (EF1, EF3, EF4 und EF6) scheinen spezifisch in der Bindung von Calciumionen involviert zu sein. Interessanterweise wurden diese Strukturdaten durch spektrographische Untersuchungen an den isoliert rekombinant hergestellten EF-Hand Motiven bestätigt.[33] Weiterhin wurde gezeigt, dass diese EF-Hand Strukturen, wenn sie als Peptide separat vorliegen, in Anwesenheit von Calciumionen oligomerisieren können.[8] EF1 und EF5 binden das Ion in der dimeren Form stärker als in der Monomeren. Bei EF4 ist die Affinität für  $\text{Ca}^{2+}$  unabhängig vom Oligomerisierungsgrad und EF3 dimerisiert sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Calciumionen, wobei  $\text{Ca}^{2+}$  ihre Tendenz zur Oligomerisierung drastisch erhöht. Das Calciumion scheint zuerst an EF1 gebunden zu werden. Auch Magnesiumionen ( $\text{Mg}^{2+}$ ) können, ähnlich wie z.B. dem Parvalbumin, an diese Domäne binden. Allerdings ist die Affinität dieser Bindung viel niedriger als die für Calciumionen, und bei Calbindin D-28k viel weniger ausgeprägt als bei Parvalbumin.[58] Aus diesen Experimenten wird geschlossen, dass die verschiedenen EF-Hand Motive in Calbindin D-28k über hydrophobe Flächen im Gesamtmolekül miteinander interagieren und so die Calciumbindung kooperativ modulieren. Die Änderungen der dreidimensionalen Proteinstruktur und deren hydrophoben Eigenschaften in Abhängigkeit von der Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ - und auch  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen kann die Bindung an *target* Proteine beeinflussen, wie z.B. die Bindung an das Ran-bindende Protein M (RanBPM, s.1.2).[33],[41]

### 1.1.2 Die Funktionen von Calbindin D-28k

Die physiologischen Funktionen des Calbindin D-28k sind im Detail noch unbekannt. Wie bereits angedeutet, kommt das Protein in sehr unterschiedlichen Zelltypen innerhalb verschiedener Organe vor, wie beispielsweise in vielen Subpopulationen von Nervenzellen im Gehirn und auch im peripheren Nervensystem, in Epithelzellen von Niere und Darm, und in endokrinen Zellen, beispielsweise in der Bauchspeicheldrüse.[9],[59] Im Kleinhirn wird Calbindin D-28k lediglich in den Purkinjezellen exprimiert, die eine starke Immunreaktivität, sowohl im Zellsoma als auch in den Dendriten und in den Axonen zeigen.[59] Experimente mit nullmutanten (*knock-out*) Mäusen haben demonstriert, dass die Abwesenheit von Calbindin D-28k zu Störungen der motorischen Koordination und des Erlernens motorischer Prozesse führt.[59],[6] Auch die intrazelluläre Calciumhomöostase in den Purkinjezellen war gestört: Hauptsächlich schnelle postsynaptische Calciumtransienten waren in ihrer Amplitude und in ihrem Zeitablauf verändert. Durch die Abwesenheit des Calbindin D-28k war hingegen die LTD (*long term depression*) an der Parallelfaser-Purkinje-Zell-Synapse nicht beeinflusst.[59]

Veränderungen der neuronalen Plastizität wurden dagegen im Hippocampus beobachtet. Die Kurzzeitplastizität, gemessen als *frequency potentiation* und *paired-pulse facilitation*, an der Synapse zwischen Moosfasern und CA3-Pyramidenzellen war vermindert.[31] Während zur Nullmutanten keine Daten zu LTP (*long term potentiation*) im Hippocampus berichtet wurden, zeigten Untersuchungen an Calbindin-Antisense-Mäusen reduzierte LTP an der Schaffer-Kollateralen und ein als Hinweis auf schlechteres Lernen gedeutetes abweichendes Verhalten im *water maze test*. [43]

Zusammen mit anderen Calciumbindenden Proteinen kommt Calbindin D-28k auch in der Netzhaut vor. Wässle et al. haben anhand von immunhistochemischen Färbungen gezeigt, dass das Protein in Wildtyp-Mäusen hauptsächlich in den Horizontalzellen enthalten ist.[69] Eine starke Reaktivität wurde

sowohl in deren Zellkörpern als auch in deren Dendriten nachgewiesen, erneut ein Hinweis darauf, dass die Lokalisation des Proteins zytoplasmatisch ist. Auch amakrine Zellen und vereinzelte Ganglienzellen waren gefärbt, sowie zwei Banden in der inneren plexiformen Schicht. In der Netzhaut von nullmutanten Mäusen konnte kein Signal nachgewiesen werden, auch wenn Struktur und Zellarchitektur in der Retina nicht verändert waren. Auch in den äußeren Haarzellen im Innenohr wird Calbindin D-28k exprimiert.[2] Abwesenheit dieses Proteins führt dort erstaunlicherweise weder zu Veränderungen der akustisch evozierten Hirnstampfpotentiale noch der otoakustischen Emission. Das ist möglicherweise durch die Tatsache zu erklären, dass in den äußeren Haarzellen auch Parvalbumin und Calretinin vorkommen, die das Fehlen des Calbindin D-28k in den nullmutanten Tieren kompensieren könnten.

Die Darstellung aller Funktionen von Calbindin D-28k würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen. Exemplarisch für nicht neuronale Zelltypen soll die Bauchspeicheldrüse angeführt werden, in welcher dieses Protein an der Regulation der Sekretion von Insulin beteiligt ist,[12],[62] sowie Darm und Niere, in welchen eine Funktion für den intrazellulären Calciumtransport in Epithelien diskutiert wird.[68],[35]

Zusammenfassend handelt es sich beim Calbindin D-28k um ein funktionell sehr vielfältiges Protein, das als  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer an der Regulation vielfältiger zellulärer Mechanismen beteiligt ist. In jüngerer Zeit rückte seine Funktion als  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor mehr in das Blickfeld. Calciumsensoren, mit Calmodulin als typischen Vertreter, verändern ihre dreidimensionale Struktur durch Calciumbindung so, dass es zur Interaktion mit verschiedensten target Proteinen kommt. Für Calbindin sind eine Reihe solcher Interaktionen beschrieben worden, z.B. mit der Myo-Inositol Monophosphatase (IMPase) und dem *Ran binding protein M* (RanBPM, alternativ auch als RanBP9 bezeichnet).[33],[58]

## 1.2 RanBPM: Ein Mitglied der Familie der *Ran Binding Proteins*

Zum ersten Mal wurde das Protein RanBPM 1998 in einer Arbeit von Nakamura et al beschrieben.[45] Im Rahmen ihrer Arbeit stellten Nakamura et al.fest, dass RanBPM mit dem sogenannten MTOC (*MicroTubule Organizing Center*) interagieren kann und somit die Entstehung des Spindelapparates bei der Zellteilung beeinflussen kann.[45] Das Protein gehört zur Gruppe der *Ran binding proteins*, einer Familie, die mehr als zehn Mitglieder zählt. Solche Proteine sind unter anderem dadurch gekennzeichnet, dass sie das kleine G-Protein Ran im *yeast-two-hybrid* Experiment binden können, auch wenn eine eigentliche Ran binding domain, wie in Ran binding protein 1 (RanBP1) oder  $\beta$ -Importin, in RanBPM nicht gefunden wurde. Des Weiteren zeigen sie eine gewisse Ähnlichkeit zu der Familie der  $\beta$ -Importine, die im Stofftransport zwischen Zytoplasma und Zellkern involviert sind.[44]

Später wurden wesentliche Befunde dieser ersten Arbeit von derselben Arbeitsgruppe sehr deutlich modifiziert. Ursprünglich wurde ein kleineres Protein von ungefähr 55-kDa identifiziert.[45] Es wurde weiterhin gezeigt, dass es einen Leserahmen gibt, der sich weiter in 5'- Richtung ausdehnt und für ein größeres Protein von rechnerisch etwa 70 kd kodiert.[44] Die Analyse von transfizierten Zellen mittels Westernblot und verschiedener Antiseren gegen unterschiedliche Teile des rekombinanten Proteins zeigt eine dominante Bande von etwa 90 kDa. Der Unterschied zur berechneten Größe ist im Detail ungeklärt (zu möglichen Modifikationen des Proteines, s. 1.4). In der späteren Arbeit wurde auch die Bindung der langen Form an Ran neu charakterisiert und als eher schwach beschrieben. Ebenso wurde die Interaktion mit dem MTOC für die lange Form relativiert. Bezüglich der Proteinstruktur unterscheiden sich diese beiden Formen hauptsächlich durch eine Cystein- und Prolin-reiche Region am N-Terminus, welche nur in der 90-kDa Form vorkommt.[47] In Datenbanken finden sich heute Hinweise auf ein Protein von ca. 730 Aminosäuren, das der langen von Nishitani et al.[47] beschriebenen Form entspricht, sowie zwei N-terminal trunkierte Varianten, bei denen entweder die ersten 229 oder 341 Aminosäuren fehlen, und welche rechnerisch Molekulargewichte von ca. 43 bzw. 55 kDa haben. Letztere Form entspricht der ursprünglich von Nakamura et al.[45] berichteten kurzen Isoform (s. [www.uniprot.org/uniprot/Q96S59#Q96S59-1](http://www.uniprot.org/uniprot/Q96S59#Q96S59-1), abgerufen am 17.2.2017). Darüber hinaus unterscheiden sich auch die N-terminalen Teile der langen RanBPM-Isoformen unterschiedlicher Spezies, bspw. von Maus und Mensch, voneinander.

RanBPM Isoformen scheinen ein ubiquitäres Vorkommen zu haben.[45] Anhand der zurzeit vorhandenen Daten kann man von einer wichtigen Rolle des Proteins im Immunsystem und im Nervensystem ausgehen. Details und Mechanismen seiner Funktion sind noch weitgehend unbekannt, wobei ein besseres Verständnis seiner zentralen Rollen in mehreren Signalkaskaden intra- und extrazellulär in den letzten Jahren entstanden ist.[44],[63] RanBPM interagiert mit einer Vielzahl an Proteinen, von Transkriptionsfaktoren bis hin zu Membranrezeptoren und Onkoproteinen (Details, s. 1.4).[63] Datenbanken listen mehr als 100 verschiedene Interaktionspartner (<https://thebiogrid.org/115359>, abgerufen am 17.2.2017).

Seine Rolle in der Regulation verschiedener neuronaler Signalkaskaden und der Neuromorphogenese bietet Anhaltspunkte auch für die pharmakologische Forschung und die Entwicklung von Molekülen, die durch die Interaktion mit RanBPM oder durch Modulation seiner Expression eine therapeutische Wirkung erzielen könnten.[63] Wegen der vielfältigen Interaktionen dürfte die Vermeidung von Nebenwirkungen solcher Produkte ein kritisches Problem darstellen.

### 1.2.1 Die Struktur des RanBPM

Trotz des eingeschränkten Verständnisses für die Funktion dieses Proteins ist seine Struktur ziemlich genau beschrieben, das gilt für beide Formen (55 kDa und 90 kDa).[45],[47]

Der N-Terminus des 90 kDa Proteins enthält zahlreiche Prolinreste. Diese prolinreiche Region ist durch das Vorkommen von SH3 (*src-homology 3*)-Domänen, die, unter anderen, src und Grb2 binden können, welche wiederum die Proteinkinase Erk aktivieren, charakterisiert (Details zu den Interaktionen, s. 1.4).[44]

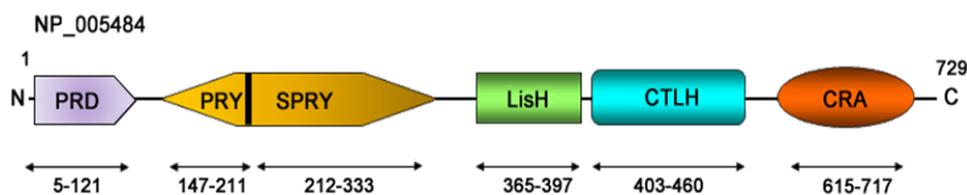


Abbildung 1.2: Struktur des langen RanBPMs. Erklärung zu den Domänen und Abkürzungen im Text (modifiziert nach Suresh et al.)[63]

Weitere Domänen sind SPRY (spla und Ryr) und LisH (*lissencephaly type-I-like homology*)/CTLH (*C-Terminal Lis H*).[44] Die SPRY Domäne scheint in der Interaktion mit MET, dem Rezeptor für den Hepatozyten-Wachstumsfaktor, involviert zu sein.[65] Distal der SPRY-Domäne dient die LisH/CTLH Domäne der Stabilisierung des Zytoskeletts durch Bindung der Mikrotubuli. Am C-Terminus wurde eine zusätzliche Domäne, die sogenannte CRA (oder CT11-RanBPM)-Domäne, entdeckt, die mit FMRP, (*fragile X mental retardation protein*) interagiert.[42] Unter anderen mittels Kernresonanzspektroskopie (*NMR-Nuclear Magnetic Resonance*) gelang es Lutz et al.[41] eine Interaktion mit Calbindin D-28k zu zeigen und zu charakterisieren. Die Sequenz LASIKNR von Aminosäure 450 bis 460 der langen Isoform des RanBPM, mithin das C-terminale Ende der CTLH-Domäne, ist für die Bindung zentral. Die funktionellen und physiologischen Implikationen dieser Bindung sind ungeklärt. Das Vorhandensein dieser multiplen, multifunktionellen Domänen in RanBPM lässt an eine Rolle als *scaffolding protein* für dieses Protein denken.[44],[63]

### 1.2.2 Bisher bekannte Funktionen des RanBPM und Interaktionspartner

Sein beinahe ubiquitäres Vorkommen und seine vielfältigen Interaktionspartner haben dazu geführt, dass die physiologische und pathophysiologische Funktion des RanBPM in sehr unterschiedlichen Kontexten mehr oder weniger tief untersucht wurde. Die wichtigsten Befunde sollen hier exemplarisch angeführt werden. RanBPM bindet unterschiedliche Membranproteine. Viele dieser Interaktionen sind bisher lediglich strukturell oder in einfachen Systemen bekannt. So wurde Interaktion mit verschiedenen Rezeptoren für Neurotrophine, trkA, trkB und p75, sowie Modulation der trophischen und Neuronen-differenzierenden Wirkung der BDNF-trkB Bindung beschrieben.[4]-[73] Wang et al. zeigten, dass RanBPM mit weiteren Kinaserezeptoren interagieren kann, unter anderen mit der Tyrosinkinase MET, einem Rezeptor des Hepatozyten-Wachstumsfaktors.[65]

Als Interaktionspartner dieser Tyrosinkinase kann das RanBPM durch Bindung an das Protein Sos den Ras/Erk-Signaltransduktionsweg verstärken oder gar induzieren. Die Interaktion mit dem Gas6 Rezeptor, Axl/Sky ist kaum funktionell untersucht.[26] Als akzessorisches Protein interagiert das RanBPM spezifisch mit dem LFA-1 (*Lymphocyte-Function-associated-Antigen 1*), einem beta-Integrin an der Zelloberfläche, das eine entscheidende Rolle auf mehreren Ebenen der Immunantwort spielt.[18] Dieselbe Gruppe entdeckte, dass das endogene RanBPM nicht nur frei im Zytoplasma vorkommt, sondern als

peripheres Membranprotein auch in Verbindung mit der Zellmembran.[18] Die mit der Zellmembran verbundene Form ist in der Regel hyperphosphoryliert, nicht aber das im Zytoplasma lokalisierte Protein, das nur einen geringen phosphorylierten Anteil hat oder nicht phosphoryliert vorliegt. Die Assoziation mit der Zellmembran, die ansatzweise bereits von Nishitani et al.[47] beschrieben worden ist, könnte Grundlage für die Interaktion des RanBPM mit unterschiedlichen Rezeptoren und Signalmolekülen sein. In Proteomstudien ist RanBPM als Träger weiterer, bisher nicht näher untersuchter Modifikationen, wie Neddylatation, Sumoylation und Ubiquitinylierung, gefunden worden (s. <https://thebiogrid.org/115359>, abgerufen am 17.2.2017).

Wie oben bereits erwähnt, ist RanBPM auch in der Netzhaut exprimiert. Seebahn et al. ist es gelungen, nachzuweisen, dass RanBPM in Zellen der inneren plexiformen Schicht vorkommt und dort mit dem metabotropen Glutamatrezeptor 8b kolokalisiert ist.[60] Des Weiteren wurde eine Interaktion mit dem metabotropen Glutamatrezeptor 2 beschrieben.[60] RanBPM interagiert auch mit einer Reihe nicht membranständiger Proteine. Dazu gehören nach Rao et al. auch die Glukokortikoid- und Androgen-Rezeptoren.[54] Zou et al. fanden, dass RanBPM auch mit der Serin/Threonin-Kinase Mirk/Dirk1B interagieren kann.[74] Diese Serin/Threonin-Kinase gehört zu den sogenannten *mini brain kinases*, die entscheidend für den korrekten Ablauf der Zellmigration während der Entwicklung sind.[74]

Das RanBPM scheint einen hemmenden Einfluss auf diesen Transkriptionsfaktor zu haben. Dieselbe Gruppe stellte fest, dass besonders die Interaktion zwischen RanBPM und der Kinase Dirk1A, die im Gehirn hoch exprimiert ist, in der Entstehung der zerebralen Einschränkungen beim Down-Syndrom eine Rolle spielt.[74] Interessant ist auch die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor p73. Kramer et al. zeigten, dass diese Interaktion die Ubiquitinylierung von p73 verhindern und damit die Lebensdauer dieses Proteins verlängern und so seine proapoptotische Wirkung verstärken kann.[34] Auch über Aktivierung von Caspasen scheint RanBPM Apoptose zu verstärken.[3] Von besonderem Interesse sind Beobachtungen zur Wirkung von RanBPM, welche in komplexeren Systemen gemacht worden sind. So führt der RanBPM knock-down mittels in utero RNAi Applikation in Ratten vermutlich über Umverteilung der Citronkinase zu einer Anreicherung von mitotischen Vorläuferzellen im sich entwickelnden Gehirn.

[10] In Mäusen, welche nullmutant für RanBPM sind, wird ein sehr weitgehender Verlust sowohl der männlichen als auch der weiblichen postmeiotischen Keimbahnzellen beobachtet.[53] Aus einer früheren Arbeit ist bereits die Interaktion mit einer keimbahnspezifischen Helicase bekannt.[61] In Ovarien von *Drosophila* ist RanBPM an der Organisation der Nische der Keimbahnstammzellen beteiligt.[14] Ebenfalls in *Drosophila* wurde gefunden, dass Mutationen in RanBPM dazu führen, dass Larven auf Umweltreize nicht mehr zielgerichtet reagieren.[55] In *Drosophila* ist dieses Protein besonders auch in den *mushroom bodies*, einer mit assoziativem Lernen in Verbindung gebrachten Struktur des Gehirnes, exprimiert. Außer einer reduzierten Proliferation vermutlich von neuronalen Vorläuferzellen und geringerem Volumen wurden keine strukturellen Veränderungen im Gehirn von Larven der Fruchtfliege berichtet. Im zentralen Nervensystem sind weitere äußerst interessante Interaktionen bekannt: Durch die Bindung mit dem Zelladhäsionsmolekül L1 wirkt das RanBPM als Regulator der Länge von Axonen.[11] Zu ähnlichen Ergebnissen führt laut Togashi et al. auch die Interaktion mit Plexin A, die über Bindung zu Semaphorin3A eine Inhibition des Wachstums der Axonskegel und der Axone hervorruft.[64] Neben seiner Beteiligung an vielfältigen physiologischen Zell- und Gewebefunktionen wird zunehmend auch eine pathophysiologische Rolle des RanBPM diskutiert. Besonders weit entwickelt haben sich hier Forschungen zu seiner Beteiligung bei neurodegenerativen Erkrankungen. So kann Überexpression von RanBPM in transgenen Mausmodellen der Alzheimererkrankung zum Verlust von Dendriten und Dornfortsätzen in der Großhirnrinde und zu einer erhöhten Produktion von Amyloid-beta-Protein führen.[66],[71] Weiter wurden in solchen Tieren Lern- und Gedächtnisdefizite zusammen mit reduziertem LTP im Hippocampus beobachtet. Als Mechanismus wurde eine verstärkte Aktivierung von Cofilin, möglicherweise über verringerte Phosphorylierung dieses Proteins vorgeschlagen.[51] Darüber hinaus wurde berichtet, dass RanBPM direkt mit der intrazellulären Domäne des Amyloid-beta-Vorläuferproteins interagieren kann und so über dessen Verteilung zwischen Cytosol und Kern in möglicherweise für die Pathophysiologie der Alzheimer'schen Erkrankung wichtige Genregulation eingreift.[19] Der im Rahmen unserer Arbeit besonders interessierende Interaktionspartner von RanBPM ist das Calbindin D-28k. Diese Interaktion ist bisher in vitro biochemisch und mittels NMR charakterisiert worden.[33],[41] Die Implikationen dieser Interaktion bezüglich der Funktion beider Proteine sind bis heute nicht geklärt.

### 1.2.3 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, Hinweise auf eine Interaktion zwischen RanBPM und Calbindin D-28k in vivo zu finden. Dazu wurde zunächst die Verteilung des endogenen RanBPMs in murinem Kleinhirn und

Netzhaut sowie in unterschiedlichen Zelllinien durch Anwendung diverser Antikörper in Immunfärbungen charakterisiert. Weiter wurde die Spezifität der verwendeten Antikörper in mit einem RanBPM Expressionsplasmid transfizierten Zelllinien mittels Immunfluoreszenz und Westernblot geprüft. Zumindest für kleine Proteine wie RanBPM und Calbindin D-28k ist die Methodik zum Nachweis der Interaktion der nativen Proteine in Geweben auch heute noch sehr limitiert. In Frage kommen verschiedene Methoden der mikroskopischen Kollokalisationsanalyse. Für diese Arbeit wurde die vermutlich robusteste und einfachste dieser Methoden, die Image-Correlation-Analysis nach Li und Kollegen,[39] gewählt.

# Kapitel 2

## Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Allgemeine Chemikalien, Reagenzien und Lösungen

Nur bei einer speziellen Methode benutzte Lösungen werden im Methodenteil beschrieben.

- Acrylamid, 30 % Acrylamid/BIS Solution, 161-0158, Biorad, München.
- Aproptinin, A-1153, Sigma, München.
- APS, Ammoniumperoxodisulfat, A-3678, Sigma, München.
- Aqua Braun, (steriles, endotoxinfreies bidestilliertes Wasser für Zellkultur und molekularbiologische Reaktionen), Braun, Melsungen.
- BCA, Bicinchoninic acid assay, UP 95424A, Uptima, jetzt Interchim, Montlucon Cedex, Frankreich.
- BES, NN-Bis-(2 hydroxyethyl)-2-amino-ethan-sulfonsäure Natriumsalz, 69981, Roth, Karlsruhe.
- Bromphenolblau, 918, Merck, Darmstadt.
- BSA, Bovine Serum Albumin, A-9647, Sigma, München.
- Chloralhydrat, C-8383, Sigma, München.
- DAPI, 4', 6-Diamidin-2-phenylindol, A-1001.0010, Applichem/VWR, Darmstadt.
- Diaminobenzidin, D-5637, Sigma, München.
- Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, p.A., 4984.3, Roth, Karlsruhe.
- DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (GlutaMax, 4,5 g/l Glucose), 61965026, Gibco/Life Technologies, Darmstadt.
- DMSO, Dimethylsulfoxid, D-8418, Sigma, München.
- DTT, Dithiothreitol, Artikelnummer nicht bekannt, Sigma, München.
- ECL Kit, Enhanced Chemiluminescence Prime Western Blotting Detection Reagent, RPN2232, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK.
- Ethanol, p.A., 9065.3, Roth, Karlsruhe.
- EDTA, Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat, p.A., 8043.1, Roth, Karlsruhe.
- FBS, fetal bovine serum, (Mycoplasma- und virusfrei, hitzeinaktiviert), S0115, Biochrom, Berlin.
- Glycerin (Glycerol), p.A., 3783.1, Roth, Karlsruhe.

- Glyzin, G-8790, Sigma, München.
- HCl, Salzsäure, rauchend, p.A., 4625.1, Roth, Karlsruhe.
- Kaliumdihydrogenphosphat, p.A., 3904.2, Roth, Karlsruhe.
- Leupeptin, L-2884, Sigma, München.
- MACsfectin, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach.
- Methanol, p.A., 4627.2, Roth, Karlsruhe.
- Milchpulver, Bio Magermilchpulver, Heirler, Radolfzell.
- Millipore Wasser (bidestilliertes Wasser), aus hauseigener Anlage.
- Mowiol (Polyvinylalkohol 4-88), 81381, Fluka über Sigma, München.
- Natriumchlorid, p.A., 3957.2, Roth, Karlsruhe.
- Nonidet P-40, 59009 2L, BDH Laboratory Supplies, Dubai, UAE.
- Paraformaldehyd (PFA), reagent grade, 6148-1kg, Sigma, München.
- PBS für Zellkultur, DPBS (Dulbecco's PBS), 14200 -059, Gibco/Life Technologies, Darmstadt.
- PBS-CMF (Phosphate-buffered saline, calcium-magnesium-free) für alle anderen Anwendungen (120 mM NaCl, 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 2.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.3).
- PS, Penicillin Streptomycin, (10000 U/ml Penicillin G, 10 mg/ml Streptomycin), P11-010, PAA/GE Healthcare, Buckinghamshire, UK.
- PMSF, Phenylmethylsulfonylfluorid, P-7626, Sigma, München (Stock 100 mM in Isopropanol).
- Ponceau S, 78376, Fluka über Sigma, München.
- 2-Propanol, p.A., 6752.4, Roth, Karlsruhe.
- RIPA-Lyse-Puffer (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% Na-Deoxycholat, 0.1% SDS, 50 mM Tris pH 8.0).
- SDS, Sodium dodecyl sulfate, ultra pure, 2326.2, Roth, Karlsruhe.
- Sodium Deoxycholate Monohydrate, BioXtra, D5670-5G, Sigma, München.
- Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, Fermentas/ThermoFisher Scientific, Gräfelfing.
- Saccharose, D (+) Saccharose, > 99.5%, 9097.1, Roth, Karlsruhe.
- TEMED, Tetramethylethyldiamin, 161-0800, BioRad, München.
- Tissue Tek, 4583, Sakura Fintek, Staufen.
- Tris, p.A., 4855.2, Roth, Karlsruhe.
- Triton X-100, T-9284, Sigma, München.
- Trypsin-EDTA, (0.25% Trypsin, 1 mM EDTA, phenol red), 25200072, Life Technologies, Darmstadt.
- Tween20, P-9516, Sigma, München.
- Vectastain Elite ABC Kit, Rabbit IgG, PK-6101, Vector Laboratories über Biozol, Eching.
- Wasserstoffperoxid, 30%, p.A., 8070.2, Roth, Karlsruhe.

## 2.1.2 Eingesetzte Primär- und Sekundärantikörper

Primärantikörper	Hersteller
Rabbit polyclonal to RanBPM (ab15301)	Millipore
Rabbit polyclonal Ran BP-M (K-12) (sc-46253)	Santa Cruz
Goat polyclonal to RanBP9* (ab5295)	abcam
Rabbit polyclonal to RanBP9* (ab78127)	abcam
Mouse monoclonal to RanBPM (SP1 177) 0.7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Geschenk von Dr. R Pardi [18]
Goat polyclonal to GFAP antibody (ab53554)	abcam
Polyclonal to Goat Flag (DDDDK) (ab1257)	abcam
Mouse monoclonal to Neuron specific beta III Tubulin TU-20 (ab7751)	abcam
Mouse monoclonal to Calbindin D-28K (300)	Millipore
Rabbit polyclonal to Calbindin D-28K (Cb38a)	Swant
Mouse monoclonal to Parvalbumin	Swant
Rabbit polyclonal to PCP-2	Geschenk von Dr. B Denker [25]

Tabelle 2.1: Primärantikörper, Millipore/Merck, Darmstadt; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA; abcam, Cambridge UK; Swant, Marly, Schweiz.

(\* *RanBP9* gleicht *RanBPM*.)

<b>Sekundärantikörper Immunfärbungen</b>	<b>Hersteller</b>
Goat anti Rabbit Alexa 555 (A-21428)	Molecular Probes
Goat anti Rabbit Alexa 594 (A-11012)	Molecular Probes
Donkey anti Rabbit Alexa 488 (A-21206)	Life Technologies
Donkey anti Goat Alexa 594 (A-11058)	Invitrogen
Donkey anti Goat Alexa 488 (A-11055)	Invitrogen
Goat anti Mouse Alexa 555 (A-21422)	Molecular Probes
Goat anti Mouse Alexa 488 (A-11025)	Life Technologies
Fluorescein Goat anti Rabbit (F2765)	Invitrogen
<b>Sekundärantikörper Westernblot</b>	<b>Hersteller</b>
Donkey ELL anti Rabbit Horseradish Peroxidase (NA934)	Amersham/ GE Healthcare
Sheep ELL anti Mouse Horseradish Peroxidase (NA931)	Amersham/ GE Healthcare
Donkey anti Goat Horseradish Peroxidase (C PAB 10570)	Abnova

Tabelle 2.2: Molecular Probes, Invitrogen, Life Technologies: alle Thermo Fischer, Waltham, USA; Amersham/GE Healthcare, Freiburg; Abnova, Taipei, Taiwan.

### 2.1.3 Plastik- und Verbrauchsmaterialien

- Eppendorf Reagenzgefäße Safe-Lock-Tubes, 1,5 ml, Eppendorf, Hamburg.
- Gewebekulturschale 35 mm, 627160, Cellstar Greiner Bio-One, Frickenhausen.
- Gewebekulturschale 60 mm, 628160, Cellstar Greiner Bio-One, Frickenhausen.
- Gewebekulturschale 100 mm, 664160, Cellstar Greiner Bio-One, Frickenhausen.
- 24-Well Schalen, 662160, Greiner Bio-One, Frickenhausen.
- Glaspasteurpipetten mit Wattestopfen, E327, Roth, Karlsruhe.
- Menzel-Deckgläser, rund, 12 mm Durchmesser, 5161064, über Schubert und Weiss von Omnilab, München.
- Objektträger, 02 1203, Menzel/Thermo Fisher Scientific, Nalgene Rapid Flow Filter Unit, 0.2  $\mu\text{m}$  aPES membrane, 500 ml, 569-0020, Nalgene, Rochester, USA.
- Pipettenspitzen TipOne 10  $\mu\text{l}$ , S1111-3700 und 200  $\mu\text{l}$ , S1111-1706, Starlab, Hamburg.
- Pipettenspitzen 1000  $\mu\text{l}$ , Sarstedt, Nürnbrecht.
- Zellkulturflaschen 25 cm<sup>2</sup>, 430639, Corning, Corning, NY, USA.
- Zentrifugenröhrchen 15 ml, 188271, Cellstar Greiner Bio-One, Frickenhausen.
- Zentrifugenröhrchen 50 ml, 227261, Cellstar Greiner Bio-One, Frickenhausen.
- VDF Blotting Membran, Hybond 0,2 micrometer, Amersham /GE Healthcare, Freiburg.
- Blottingpapier, Rotilab (Dicke 1,5 mm), CL75.1, Roth, Karlsruhe.

## 2.1.4 Geräte und Software

### Allgemeine Laborgeräte

- Chemidoc mit Image Lab Software, BioRad, München.
- GelDoc mit Quantity One Software 4.4.0, BioRad, München.
- Elektrophorese-Kammer für Proteingele: Mini Protean 3, BioRad, München.
- Homogenisator Polytron PT10/35, Kinematica, Kriens, Schweiz.
- Semidry Blotgerät, Eigenbau, Werkstatt MPI für Psychiatrie-Theoretisches Institut, Martinsried.
- Zentrifugen: Heraeus Labofuge 400R, Heraeus Biofuge pico, Eppendorf 5415R, Hanau.
- Schwenkplatte Polymax 1040, Heidolph, Schwabach.
- Standardgeräte: verschiedene Wasserbäder, Vortex Genie 2, Heiz-Rührer, pH Meter, elektrische Pumpen, Heizblock, Spannungsquellen für Elektrophorese, Gilson-Pipetten Epoch Reader, mit Gen5 Software, BioTek, Bad Friedrichshall.

### Spezielle Geräte für die Zellkultur

- Sterilarbeitsbank Berner B-MaxPro-160, Elmshorn.
- Mikroskop Leica DMI, Leica, Wetzlar.
- Inkubator New Brunswick Galaxy 170S, Eppendorf, Hamburg.
- Zentrifuge Eppendorf 5804, Hamburg.
- Weitfeld-Fluoreszenz- und konfokales Mikroskop: s. Methoden.

### Weitere Software

- WCIF-ImageJ 1.37c, mit LSM Reader 3.2, und ICA plugin, Version 2006/03/23 <http://wwwfacilities.uhnresearch.ca/wcif/software/Plugins/ICA.html>.
- BLAST, Basic Local Alignment Search Tool, über <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
- MapleSoft, Statistics package, MapleSoft, Ontario, Kanada.

## 2.1.5 Plasmide

RanBPM-Flag10	Geschenk von Dr. E Bianchi[18]
---------------	-----------------------------------

## 2.1.6 Mäuse

Tierlinie	Tier	Geschlecht	Geburtsdatum	Alter	Genotyp
Pcp2 Cre.B # 35	# 259	Männlich	27.09.2011	2 Monate	wt/wt
Pcp2 Cre.B # 35	# 258	Weiblich	27.09.2011	2 Monate	wt/T
Pcp2 Cre.B # 35	# 256	Weiblich	27.09.2011	2 Monate	wt/wt
Pcp2 Cre.B # 35	# 302	Weiblich	29.03.2012	2 Monate	wt/wt

Abkürzungen: T, Transgen; wt, wildtyp.

Zu berücksichtigen bei der Wahl der Tiere sind folgende Aspekte: Für das transgene Allel in dem einen analysierten wt/T Tier (Cre-Rekombinase in einem pcp2-Minigen) gibt es trotz langjähriger Beobachtung keine Hinweise auf Veränderungen von Kleinhirn oder Purkinjellen. Auch die Expression von Calbindin und RanBPM sind von wt nicht unterscheidbar. Daher wurden die Daten dieses Tieres mit denen der wt Tiere gepoolt.

## 2.1.7 Verwendete Zelllinien

3T3 SO1, p37, kryokonserviert, 08.11.1990 (Sublinie von NIH 3T3) [28]
HEK 293, p29, kryokonserviert, 08.03.2010 [1]
COS, p10, kryokonserviert, 25.03.2000 [24]
HELA DCT, p5, kryokonserviert, 25.01.2001 (Sublinie von HELA) [56]
MDCK, p16, kryokonserviert, 04.04.2012 [21]
HN10 [37]

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Perfusion

Als Anästhetikum wurde Chloralhydrat in einer Dosierung von mindestens 400 *mg/kg* Körpergewicht verwendet. Die Applikation des Anästhetikums erfolgte intraperitoneal. Vor Durchführung der Perfusion wurden repetitiv Schmerzreize gegeben, um so sicherzustellen, dass die Tiere ausreichend narkotisiert waren. Anschließend wurden die Mäuse auf einem Brett fixiert und es wurde eine mediane Längsinzision am Bauch durchgeführt. Die rechte Thoraxhälfte wurde mit einem parasternalen Schnitt eröffnet und nach Ablösung vom Zwerchfell hochgeklappt, so dass das Herz gut zugänglich war. Der linke Ventrikel wurde mit einer Kanüle am Perfusionsbesteck punktiert und dadurch mit der Perfusionspumpe verbunden, der rechte Vorhof wurde mit einer Irisschere angeschnitten. Zuerst wurden 20 ml PBS-CMF perfundiert, anschließend 20 ml 4% PFA. Am Ende des Perfusionsvorgangs wurden Herz, Nieren, Milz und Gonaden explantiert und über Nacht in 4% PFA bei 4°C immersionsfixiert. Nach Eröffnung des Schädels mit einer feinen Präparier-Schere wurden auch beide Augen, das Gehirn und das Kleinhirn entnommen. Zur Augenfixierung wurde zusätzlich auch ein anderes Protokoll getestet, das von der Arbeitsgruppe von Brandstätter entwickelt wurde und von Ralf Enz aus der Universität Erlangen empfohlen wurde.[60],[13] Nach Entnahme wurden die Augen erstmals 30 Minuten in 4% PFA in Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,4 fixiert. Die Netzhaut wurde daraufhin vom Fundus entfernt und in Sucrose-Lösungen zunehmender Konzentration (jeweils 10%, 20% und 30%) bei 4°C übertragen. Sobald die Netzhaut sank, wurde diese in die Lösung mit der nächsthöheren Verdünnung übertragen.

### 2.2.2 Schneiden der Präparate am Kryostat und Vibratom

Nach der Fixierung wurden die Organe bei -20°C mit Tissue-Tek eingebettet. Die Einbettblöcke wurden dann am Kryostat in 16  $\mu\text{m}$  dicken Scheiben in parasagittaler Richtung geschnitten. Auf jeden Objektträger wurden drei bis vier Schnitte gelegt. Die Präparate wurden dann bei -20°C aufbewahrt. Free floating Schnitte für die Immunfärbung wurden auf einem Vibrationsmikrotom Mikrom HM 650V (ThermoFisher) in einer Dicke von 25 Mikrometern parasagittal aus PFA fixierten Kleinhirnen adulter Mäuse geschnitten (Einstellungen: Fein = 25, FREQ = 70, Kontin.S, trim = 100, ampl = 0,7, V = 8). Bis zur Verwendung wurden sie in 24-Well Schalen in 0.5% PFA bei 4°C gelagert.

### 2.2.3 Revitalisieren von kryokonservierten Zellen

Vor Anwendung wurde das Kulturmedium (450 ml DMEM, 50 ml FCS, 5 ml PS bei 4°C gelagert) im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Eine Ampulle Zellen wurde bei 37°C aufgetaut und in 5 ml Kulturmedium zugegeben. Die Zellsuspension wurde 5 Minuten lang (300 g) zentrifugiert, nach Entfernung des Überstands wurden die Zellen im Kulturmedium resuspendiert und in der gewünschten Dichte in Zellkultur-Schalen gegeben. Die Zellen wurden dann bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> im Inkubator über mehrere Tage kultiviert, bis sie zum Anlegen neuer Zellkulturen oder für Versuche eingesetzt werden konnten.

### 2.2.4 Aussaat der Zellen auf Deckgläschen

Nach Absaugen des Kulturmediums wurden die Zellen auf den Schalen kurz mit Trypsin oder PBS gewaschen. Im Anschluss wurde Trypsin-EDTA Lösung für 5 bis 10 Minuten bei Raumtemperatur erneut eingesetzt, um die Zellen abzulösen. Nach dem Verdau wurden die Zellen in das Kulturmedium (5 ml) überführt und 5 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen im Kulturmedium resuspendiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit Hilfe einer Zählkammer (Neubauer) gezählt, nach Bedarf weiter verdünnt und auf Deckgläschen (20.000/Deckgläschen) übertragen. Diese Deckgläschen waren zuvor mit Poly-L-Lysin (PLL, Sigma, München) beschichtet worden (0,01% PLL in Wasser, für mind. 1h, bei 37°C).

## 2.2.5 Sequenzierung des RanBPM Expressionsplasmids RanBPM-Flag10 und Transfektion

Um die Spezifität der verwendeten RanBPM Antikörper zu prüfen und einen Eindruck von der intrazellulären Verteilung dieses Proteins zu bekommen, wurden Zellen aus unterschiedlichen Zelllinien mit einem RanBPM Expressionsplasmid transfiziert. Bei dem Plasmid handelte es sich um das RanBPM-Flag10, das uns Dr. E. Bianchi zur Verfügung stellte.[18] Die proteinkodierende Sequenz einschließlich eines C-terminalen Flag tags ist in diesem Plasmid unter der Kontrolle des CMV (Cytomegalievirus) – Promotors. Transformation und DNA Präparation wurden nach Standardverfahren durchgeführt (hier nicht beschrieben) und die DNA durch Restriktionsverdau und Gelelektrophorese präliminär charakterisiert (hier nicht beschrieben). Zur Verifikation des Plasmides wurde es sequenziert (Eurofins Genomic, Ebersberg). Dazu wurden eine Reihe geeigneter Sequenzierprimer entworfen (nicht gezeigt). Aus der Sequenzierung resultierte die erwartete perfekte Übereinstimmung mit der humanen Form hu-Ran BP (Genbank 15080673/AB055311, atg=60, stop 2249). Somit konnte die Transfektion durchgeführt werden. Diese wurde zunächst unter Anwendung der BES-Calcium-Phosphat-Methode durchgeführt.[50] Dazu wurden adhärenente Zellen eingesetzt, die benötigte DNA-Menge wurde in 450  $\mu$ l destilliertem Wasser aufgelöst. Zu dieser Lösung wurden 50  $\mu$ l 2,5 M  $\text{CaCl}_2$  hinzugegeben sowie 500  $\mu$ l 2x BES (50 mM BES, 280 mM NaCl, 15 mM Dinatriumhydrogenphosphat, pH 6,95, sterilfiltriert), die Mischung wurde dann über 10-20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss auf die Zellen tropfenweise verteilt. Die Zellen wurden im Anschluss für 24 Stunden bei 35°C und 3%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Am nächsten Tag erfolgten der Waschvorgang mit PBS, die Versorgung mit frischem Kulturmedium sowie Inkubation bei 37°C und 10%  $\text{CO}_2$ . Diese Zellen wurden am darauffolgenden Tag für die Versuche verwendet. Zu einem späteren Zeitpunkt wurden Transfektionen auch mittels Lipofektion mit dem MACSfectin-Reagent durchgeführt. Bei der Versuchsdurchführung hielten wir uns genau an die Protokolle der Firma für adhärenente Zellen an (Dokument DS130-098-410-411-412, auf [www.miltenyibiotec.com](http://www.miltenyibiotec.com)). Lipofizierte Zellen wurden am Tag nach der Transfektion verwendet.

## 2.2.6 Westernblot-Analyse

### 2.2.6.1 Gewebeprobe für Westernblot

Die verwendeten Proben wurden aus dem Großhirn, dem Kleinhirn, der Niere, der Milz, dem Herzen und den Gonaden von 1 bis 3 Tagen alten wt Mäusen der Linie C57Bl/6 hergestellt. Die einzelnen Organe wurden nach der Entnahme bis zur Probenvorbereitung bei -70°C aufbewahrt. Vor der Anwendung wurde zum Homogenisierungspuffer (0,25 M Saccharose, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, 50  $\mu$ g/ml Leupeptin, 25  $\mu$ g/ml Aprotinin) PMSF frisch dazugegeben. Zu den gewogenen Organen wurde der komplette Homogenisierungspuffer wie folgt zugegeben: 20-40 mg Feuchtgewicht in 1 ml Homogenisierungspuffer; 60-70 mg in 1.5 ml. Anschließend wurden die Gewebe mit Hilfe eines Polytron-Homogenisators zerkleinert. Die Proben wurden dann 15 Minuten bei 4°C und 5000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut 30 Sekunden bei 4°C und 50000 g (30000 rpm) in einem TLA 55 Festwinkelrotor, Beckmann Optima Ultrazentrifuge, zentrifugiert. Die gesamte Prozedur wurde wo immer möglich auf Eis durchgeführt. Überstand und Pellet wurden getrennt und bei -20°C aufbewahrt.

### 2.2.6.2 Zellyse

Zur Analyse im Westernblot wurden HN10e und MDCK-Zellen eingesetzt. Diese Zellen wurden in RIPA Lyse-Puffer lysiert. Nach Absaugen des Mediums und kurzem Waschen mit PBS-CMF wurden die 10 cm Kulturschalen auf Eis gestellt und jeweils 1 ml Lyse-Puffer dazu gegeben. Die Schalen wurden dann 30 Minuten geschwenkt, die Zellen abgeschabt und das Zell-Lysat in Eppendorf-Gefäße überführt und 10 Minuten lang bei 10000 g, 4°C, zentrifugiert. Pellets und Überstand wurden voneinander getrennt und bei -20°C bis zur Anwendung aufbewahrt.

### 2.2.6.3 Proteinquantifizierung

Um vergleichbare Mengen Protein auf die Gele laden zu können, wurde die Proteinkonzentration der Lysate mit dem Bicinchoninic Acid (BCA) Assay bestimmt. Jeweils ein Volumen von 25  $\mu$ l Probe wurde mit 200  $\mu$ l BC-Reagenz vermischt, für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend bei 562 nm die Absorption im Epoch Reader gemessen. Die Standards für die Eichgerade wurden jeweils durch progressive Verdünnung einer 1 mg/ml Stock Lösung von BSA frisch hergestellt und im gleichen Experiment vermessen. Die Messungen erfolgten mindestens in Duplikaten. Die Proteinkonzentration jeder Probe wurde durch lineare Regression anhand der Mittelwerte bestimmt.

### 2.2.6.4 SDS-PAGE-Gel

Als Erstes wurde die Gießkammer aufgebaut: dazu wurden 1,5 mm dicke Kämme mit 9 Taschen verwendet. Der nächste Schritt war die Vorbereitung des Trenngels (10% Gel): 6,15 ml steriles Wasser, 4,95 ml Acrylamid, 3,75 ml Gelpuffer für Trenngele (pH 8,8), 75  $\mu$ l 20% SDS, 75  $\mu$ l 10% APS, 15  $\mu$ l TEMED wurden gemischt und in die Kammer verteilt. Es wurde eine Stunde gewartet, bis das Gel polymerisiert war. Als Schutz gegen Austrocknung wurde das Gel mit Ethanol überschichtet. Bei dem Sammelgel handelte es sich um ein 4% Gel, das 6,1 ml steriles Wasser, 1,3 ml Acrylamid, 2,5 ml Gelpuffer für Sammelgele (pH 6,8), 50  $\mu$ l 20% SDS, 50  $\mu$ l 10% APS, 10  $\mu$ l TEMED enthielt. Nach der Zugabe in die Gießkammer musste das Sammelgel ebenfalls eine Stunde aushärten. Die Gele wurden dann direkt im Anschluss eingesetzt oder bis zur Anwendung feucht im Kühlschrank gelagert.

### 2.2.6.5 Probenzubereitung und Beladen des Gels

Als Standard verwendeten wir die Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder. Um ein Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l einzustellen, wurden zu 15  $\mu$ l Wasser 5  $\mu$ l Standard zugegeben. Wenn nicht anders angegeben, dann wurden von jedem Lysat 20  $\mu$ g Protein pro Spur geladen. Zur Vorbereitung der Proben wurden je nach Proteinkonzentration definierte Mengen an Lysat eingesetzt und mit Wasser auf ein Volumen von 22  $\mu$ l verdünnt. Dazu wurden 5  $\mu$ l 1M DTT und 8  $\mu$ l 5x SDS Page-Ladepuffer (250 mM Tris HCl, pH 6,8, 10% SDS, 30% Glycerin, 0,1% Bromphenolblau) zugegeben. Die Proben und der Standard wurden dann 5 Minuten bei 95°C im Heizblock erhitzt.

### 2.2.6.6 Elektrophorese

Vor Ladung der Proben auf das Gel wurde die Elektrophorese-Kammer aufgebaut und mit 1x SDS-Page-Running-Buffer (0,26 M Tris HCl, pH 8, 1,92 M Glyzin, 1% SDS, pH 8,3) gefüllt. Nach Beladung des Gels mit den zu analysierenden Proben wurden diese bis zur Trennlinie zwischen Trenn- und Sammelgel bei 100 V danach bis Ende bei 200 V betrieben. Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Gel 15 Minuten im Transfer-Puffer (45 mM Tris, 39 mM Glyzin, 20% Methanol, 0,025% SDS, pH 9,2) geschwenkt. Parallel dazu wurden die Bestandteile der Westernblot-Apparatur vorbereitet.

### 2.2.6.7 Westernblot

Die PVDF Membran und das Whatman Papier wurden in die passende Größe geschnitten. 5 Blätter in Transferpuffer getränktes Blottingpapier, die mit Methanol äquilibrierte PVDF Membran, das Gel und wiederum 5 Blättern feuchtes Blottingpapier wurden in der Apparatur zu einem Stapel aufeinandergelegt und die Proteine für 1 Stunde bei 260 mA auf die Membran gebロットet. Anschließend wurde die Membran 5 Minuten in Ponceau-Lösung gefärbt, fotografiert und im Wasser entfärbt. Danach wurde die Membran im Blockpuffer aus 5% Milchpulver und 0,2% Tween 20 in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur geschwenkt.

### 2.2.6.8 Proteindetektion

Nach der Blockierung wurde die Membran mit den Primärantikörpern über Nacht bei 4°C inkubiert. Die polyklonalen Primärantikörper gegen RanBPM von abcam und Millipore sowie die monoklonalen Primärantikörper wurden in den jeweils angegebenen Verdünnungen eingesetzt. Nach 24 Stunden wurde die Membran kurz mit TBST (138 mM NaCl, 50 mM Tris HCl pH 7,6, 0,01% Tween 20) gespült und anschließend 15 Minuten in TBST bei Raumtemperatur geschwenkt. Die Membran wurde dann für 10 Minuten in RIPA-Lyse-Puffer gewaschen und für 10 Minuten bei Raumtemperatur geschwenkt. Vor der Inkubation mit den sekundären Antikörpern wurde die Membran noch weitere 15 Minuten im Blockpuffer (s.o.) geschwenkt. Als Sekundärantikörper wurden je nach Art der Primärantikörper anti rabbit-, anti mouse- oder anti-goat-Peroxidase-konjugierte Antikörper verwendet. Diese wurden zur Anwendung auf 1/10000 im Blockpuffer verdünnt. Die Membran wurde eine Stunde mit den Sekundärantikörpern bei Raumtemperatur geschwenkt. Nach der Behandlung mit den Sekundärantikörpern wurde die Membran erneut kurz mit TBST gespült und anschließend 15 Minuten im TBST und dann noch einmal 10 Minuten im RIPA-Lyse-Puffer bei Raumtemperatur gewaschen. Danach wurde die Membran noch zwei weitere Male für jeweils 5 Minuten in TBST gewaschen.

### 2.2.6.9 Entwicklung der Membran

Jeweils 2 ml von Reagenz A und B aus dem ECL-Kit wurden gemischt und auf die Membran verteilt. Die Membran wurde 5 Minuten unter Lichtschutz geschwenkt und im Anschluss mittels des ChemiDoc-Systems dokumentiert.

## 2.2.7 Immunfärbungen

### 2.2.7.1 Indirekte Immunfluoreszenz

Als Primär- beziehungsweise als Sekundärantikörper wurden die in den entsprechenden Tabellen aufgelisteten Antikörper verwendet (2.1 und 2.2). Zur Durchführung von Immunfärbungen wurden einige Protokolle getestet.

### Standardprotokoll

Die Gefrierschnitte aus den verschiedenen Organen wurden mit Permeabilisierungslösung (PBS-CMF, 10% BSA, 0.1% Triton X100) 30 Minuten lang bei Raumtemperatur in einer Feuchtekammer behandelt. Anschließend wurden die Präparate 30 Minuten in Blockierungslösung (PBS-CMF mit 10% BSA) inkubiert. Danach wurden die Präparate drei Mal mit PBS gewaschen, die ersten zwei Male für jeweils 5 Minuten, das dritte Mal für 20 Minuten. Für die Primärantikörper wurden hauptsächlich 1/200 und 1/400 Verdünnungen (Antikörper-Verdünnungslösung: PBS-CMF, 1% BSA, 0.1% Triton) verwendet. Auf den Präparaten wurden je nach Größe der zu behandelnden Oberfläche 200 bis 500 µl von den verdünnten Primärantikörperlösungen verteilt. Die Inkubation fand über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer statt. Am nächsten Tag wurden die Präparate zunächst mit PBS dreimal nacheinander für jeweils zwanzig Minuten bei Raumtemperatur gewaschen. Im Anschluss wurden die Sekundärantikörper in der Verdünnung 1/2000 zugegeben. Falls es beim Experiment vorgesehen war, wurden bei diesem Schritt auch DAPI (300 nM in Antikörper-Verdünnungslösung) zugegeben. Die Inkubation mit den Sekundärantikörpern erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Anschließend erfolgte der zweite Waschvorgang (3 x 20 Minuten PBS). Am Ende wurden die Präparate in Mowiol-Einbettmedium (25 ml Wasser, 6 ml 1 M Tris pH 8.5, 6 g MOWIOL, 18.9 g Glycerin) montiert und bis zur mikroskopischen Untersuchung bei 4°C aufbewahrt.

Zusätzlich wurden drei weitere Protokolle verwendet: zur Färbung von Gefrierschnitten aus der Netzhaut, zur Färbung von MDCK-Zellen und ein immunhistochemischer Nachweis auf Gefrierschnitten des Kleinhirns.

## Methode zur Färbung von Gefrierschnitten aus der Netzhaut

Dieses Protokoll stammt von Seebahn et al.[60] Die Präparate wurden zur Permeabilisierung und Blockierung mit den üblichen Reagenzien eine Stunde bei Raumtemperatur in eine Feuchteammer gelegt. Anschließend erfolgte über Nacht die Inkubation mit den Primärantikörpern bei 4°C. Bei diesen Versuchen wurden vor allem die murinen monoklonalen Primärantikörper gegen RanBPM in einer Verdünnung von 5 µg/ml verwendet. Am nächsten Tag wurden die Präparate über mehrere Waschschrte eine Stunde lang mit PBS gewaschen und anschließend mit den Sekundärantikörpern ebenfalls eine Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die Sekundärantikörper wurden zu 1/2000 in Antikörper-Verdünnungslösung verdünnt. In die Lösung der Sekundärantikörper wurde auch DAPI (wie oben) zugegeben. Am Ende der Inkubationszeit wurde mit PBS eine Stunde lang mehrmals gewaschen. Die Präparate wurden dann in Mowiol-Einbettmedium (s.o.) montiert.

## Methode zur Färbung der MDCK-Zellen

Das Protokoll folgt der Methode von Denti et al.[18] Die Zellen wurden jeweils bei -20 °C in eiskaltem Methanol fünf Minuten lang fixiert und anschließend 30 Sekunden lang in eiskaltes Chloroform getaucht. Die Permeabilisierung erfolgte mit 0,1% Triton X-100 in PBS-CMF. Dann wurde mit den monoklonalen Primärantikörpern gegen RanBPM, wenn nicht anders angegeben, in einer Verdünnung von 5 µg/ml über Nacht bei 4°C inkubiert. Andere Verdünnungen wurden ebenfalls getestet (1 µg/ml und 2.5 µg/ml). Am nächsten Tag wurden die Präparate über eine Stunde mehrmals mit PBS gewaschen, anschließend mit den Sekundärantikörpern und mit DAPI in den üblichen Verdünnungen (s.o.) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die Präparate ein letztes Mal mehrmals mit 1 x PBS eine Stunde lang gewaschen wurden, wurden sie mit Mowiol-Einbettmedium auf die Objektträger montiert.

## Avidin-Biotin Methode

Zur Durchführung dieser Färbungen wurde der Vectastain Elite ABC Kit angewendet und gemäß dem Protokoll der Firma gearbeitet

(<http://docs.vectorlabs.com/protocols/PK-6100.pdf>). Mit dieser Methode wurden ausschließlich Gefrierschnitte aus dem Kleinhirn gefärbt. Zur Blockierung der endogenen Peroxidasen wurden die Schnitte 30 Minuten lang in eine 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Methanol-Lösung gelegt. Anschließend wurden die Präparate 5 Minuten in PBS gewaschen und 20 Minuten mit dem Blockserum aus dem Kit inkubiert. Nach der Blockierung wurde die Inkubation mit den Primärantikörpern 30 Minuten durchgeführt.

Als Primärantikörper wurden die polyklonalen Antikörper gegen RanBPM von Millipore und abcam in den üblichen Verdünnungen (s.o.) eingesetzt. Nach einem kurzen Waschvorgang mit PBS wurden die Präparate mit den Biotin-markierten Sekundärantikörpern entsprechend o.g. Protokoll 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss 5 Minuten lang mit PBS gewaschen. Die Schnitte wurden dann 30 Minuten mit dem Vectastain ABC Reagenz behandelt. Kurz vor Anwendung wurde die Diaminobenzidin (DAB)- Substratlösung zubereitet (198 ml Wasser, 10 ml Tris 1M (pH 7,4), 120 mg 3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid und 200 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Die Präparate wurden 5 bis 10 Minuten in die DAB-Substratlösung gelegt, gewaschen und in Mowiol-Einbettmedium (s.o.) montiert.

## Färbeprotokolle für Free Floating Sections

Im weiteren Verlauf wurden vom Kleinhirn free floating Schnitte angefertigt. Dabei wird das Gewebe nicht auf dem Objektträger fixiert, sondern befindet sich freischwebend in der Antikörper- bzw. Waschlösung in einer 24-Well Schale. Alle Antikörper werden einer speziellen Antikörperverdünnungslösung verdünnt (PBS-CMF, 0,4% Triton X100, 5% BSA), die gleichzeitig auch der Permeabilisierung und dem Blockieren dient. Die Inkubation mit den Primärantikörpern erfolgte über Nacht, bei 4°C auf der Schwenkplatte. Darauf wird 3 mal für 10 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen (PBS-CMF mit 0.2% Triton-X100). Mit den Sekundärantikörpern wird für 2 h bei Raumtemperatur wie oben auf der Schwenkplatte inkubiert. Waschen erfolgte wie nach der Inkubation mit den primären Antikörpern. Nach einem letzten Waschschrte in PBS-CMF ohne Triton werden die Schnitte mit Hilfe eines Pinsels auf Objektträgern platziert und in Mowiol-Eindeckmedium eingebettet.

## 2.2.8 Mikroskopie und ihre Anwendungen

### 2.2.8.1 Hellfeld- und Phasenkontrastmikroskopie

Immunhistochemische Präparate wurden an einem S100 Mikroskop der Firma ZEISS untersucht, das wie folgt ausgestattet war:

- Objektive: 5x, NA 0,12, A-Plan/ 10x, NA 0.25, A-Plan/ 40x, NA 0,75, Ph2, EC Plan Neofluar/ 100x, NA 1,3, oil, EC Plan Neofluar;
- Kamera und Software: AxioCam MRc5, AxioVision 4.4.

Wenn nicht anders vermerkt, wurde das 10x und das 40x, 63x Objektiv eingesetzt.

### 2.2.8.2 Weitfeldmikroskopie

Ein Teil der Präparate wurde am Weitfeld-Epifluoreszenzmikroskop untersucht. Dazu wurde das oben beschriebenen S100 Mikroskop zusammen mit folgenden Filtern und Strahlenteilern benutzt: Alexa 488: Ex 450-490, FT 510, LP 510/ Alexa 546, 566: Ex 520-585, FT 600, LP 615/ DAPI: G365, FT 395, LP 420. Sofern nicht anders angegeben, wurde das 40x, 63x Objektiv verwendet.

### 2.2.8.3 Konfokale Mikroskopie

Ein Teil der Präparate, insbesondere alle Präparate für die Intensitäts-Korrelationsanalyse (ICA), wurde an einem Laserscanningmikroskop LSM710 an einem *AxioObserver-Stativ*, von ZEISS, durchgeführt, das wie folgt ausgestattet war:

- Objektive: EC Plan-Neofluar 10x, NA 0,3/ LD C-Apochromat 40x, NA 1,1, W/ Plan-Apochromat 63x, NA 1,4, oil DIC;
- Laser: 561 nm/ Argon-Multiline/ 405 nm; Detektion: Photomultiplier, 34 Kanal Spektraldetektor; Software: ZEN 2010.

Zur Orientierung wurde entweder das 10x oder das 20x Objektiv verwendet. Detailbilder wurden mit dem 63x Objektiv mit Ölimmersion aufgenommen. Z-Stacks wurden zur 3D Darstellung und zur räumlichen Charakterisierung der Signalverteilung durchgeführt. Das *pinhole* wurde konsequent auf eine Area *unit* eingestellt, *gain* und *digital* offset wurden mit Hilfe des *range indicators* optimiert. Einstellungen der Filter und Strahlenteiler wurden über die Option *smart setup, best compromise* in ZEN 2010 vorgenommen. Das Scanning verschiedener Farben erfolgte in getrennten Tracks nacheinander im frame Scan Modus, die Datenaufnahme in 8 bit, *averaging* wurde nicht durchgeführt.

### 2.2.8.4 Quantitative Kollokalisationsanalyse: Intensity Correlation Analysis

Zur Durchführung der Intensity Correlation Analysis (ICA)[39] wurden lediglich Bilder beziehungsweise Abschnitte davon verwendet, die frei von Pixelsaturation waren. Die LSM-Datensätze von den mittels der konfokalen Mikroskopie gewonnenen Z-Stacks wurden in *ImageJ* geöffnet und entsprechend der dazu publizierten Anleitung ([www.facilities.uhnreserach.ca/wcif/PDF/ICA.pdf](http://www.facilities.uhnreserach.ca/wcif/PDF/ICA.pdf)) weiterverarbeitet. Dazu wurden zunächst aus den Z-Stacks mittlere Ebenen mit grosser Ausdehnung des Kerns und vollständigen Zytoplasma auf allen Seiten des Kernes ausgewählt. Die zugehörigen Bilder beider Kanäle wurden in *ImageJ* in 8-Bit TIFF Format umgewandelt. Als *regions of interest* (ROI) wurden Somata von Purkinje Zellen markiert und jeweils ein ROI, also ein Soma nach dem anderen, mittels des ICA *plug-ins* weiter analysiert. Die Analyse mittels ICA basiert auf der Tatsache, dass für jedes Kontingent von n Werten die Summe der Differenzen aller Werte vom Mittelwert (Summe der Mittelwertsdifferenzen) gleich null ist.

$$\sum_{i=0}^n (A_i - a).$$

Für ein Bild mit  $n$  Pixeln, die je mit zwei Intensitätswerten (bspw. aus zwei verschiedenen Kanälen bei der Fluoreszenzmikroskopie)  $A_i$  und  $B_i$  assoziiert sind, gilt das entsprechend für die Werte aus beiden Kanälen:

$$\sum_{i=0}^n (A_i - a).$$

$$\sum_{i=0}^n (B_i - b).$$

Betrachtet man Wertepaare mit Werten, die gleichsinnig abhängig voneinander variieren, wird diese Summe positiv sein, da die Mittelwertdifferenz für beide Kanäle in der Regel dasselbe Vorzeichen haben wird. Variieren die Werte nicht gleichsinnig (d.h. wo  $A_i$  relativ zum Mittelwert groß ist, ist  $B_i$  klein; von Li et al. als segregierte Verteilung bezeichnet), dann wird diese Summe negativ sein, denn der niedrige Wert in einem Kanal führt zu einer negativen Mittelwertdifferenz, ist aber assoziiert mit einem hohen Wert im zweiten Kanal, der in einer positiven Mittelwertdifferenz resultiert. Der Nachteil dieser Produkte der Mittelwertdifferenzen liegt nach Li et al. darin, dass diese nicht normalverteilt sind. Allerdings kann die Verteilung mit dem nichtparametrischen Vorzeichentest untersucht werden. Als quantitatives Maß des Korrelationsgrads wird dafür wie folgt der ICQ (Intensity Correlation Quotient) verwendet. Für jedes Bild wird die Zahl der Pixel berechnet, die ein positives oder ein negatives Ergebnis bei dem Produkt der Mittelwertdifferenzen ergeben. Der Quotient zwischen der Anzahl an positiven Ergebnissen und der gesamten Pixelzahl ist ein Wert, welcher den Abhängigkeitsgrad widerspiegelt. Durch Subtraktion von 0.5 wird dieser Quotient in den Bereich von -0.5 bis + 0.5 transformiert. Den so erhaltenen Quotienten bezeichnen Li et al. als ICQ. Er wird folgendermaßen interpretiert: Bei ICQ-Werten gegen 0 geht man von einer zufälligen Signalverteilung, bei Werten zwischen 0 und -0.5 von einer segregierten Verteilung der Signale und bei Werten zwischen 0 und +0.5 von einer positiv abhängigen Signalverteilung (wo A hoch ist, ist auch B hoch) aus. Insbesondere spricht ein ICQ von 0.05 bis zu 0.1 für eine moderate Kolokalisation, ein ICQ  $> 0.1$  für eine starke Kolokalisation. In der graphischen Darstellung werden die Intensitäten eines Kanals auf der Ordinate gegen das jeweilige Produkt der zugehörigen Mittelwertdifferenzen auf der Abzisse dargestellt. Distributionen, die deutlich rechts von 0 auf der Abzisse liegen, entsprechen einer positiv abhängigen Verteilung (das Produkt der Mittelwertdifferenzen ist positiv). Eine Verteilung, die im Wesentlichen links vom Nullpunkt der Abzisse liegt, spricht für eine segregierte Verteilung. Symmetrische Verteilungen um den Nullpunkt (Uhrglasform) deuten ein zufälliges Verhalten der Intensitätswerte der Pixelpaare zueinander hin. In dieser Arbeit wurden für jede der verschiedenen Bedingungen ICQ Werte von mehr als 10 ROIs bestimmt (Details s. Ergebnisse). Diese wurden mit Methoden der Inferenzstatistik (s. Ergebnisse) analysiert, um vergleichende Aussagen treffen zu können. Die verschiedenen untersuchten Bedingungen sind: Doppelfärbung auf Calbindin D-28k und RanBPM, Doppelfärbung mit monoklonalen und polyklonalen Calbindin D-28k Antikörpern (Situation einer weitgehend positiv abhängigen Verteilung), Doppelfärbung gegen Calbindin D-28k und Parvalbumin (Situation der Zufallsverteilung; sowohl Parvalbumin als auch Calbindin D-28k werden in Purkinje Zellen stark cytosolisch und nukleär exprimiert (s. bspw. Schwaller et al., 2003), ohne dass Interaktion beider Proteine miteinander oder Vorliegen im selben Komplex bekannt wäre), Doppelfärbung auf Calbindin D-28k und GFAP (Situation der segregierten Verteilung, da GFAP nicht in Purkinje Zellen, wohl aber in Bergmann Glia und Astrozyten vorkommt). Die drei letztgenannten Bedingungen stellen also drei verschiedene Kontrollen dar, welche statistisch mit der kritischen ersten Bedingung verglichen wurden.

# Kapitel 3

## Ergebnisse

### 3.1 Detektion von RanBPM

#### 3.1.1 Immunfärbungen

##### 3.1.1.1 Nachweis von RanBPM und Calbindin D-28k mittels Immunfluoreszenz in Gefrierschnitten und primären Zellkulturen des Mausgehirns

Es ist bekannt, dass RanBPM in einer Vielzahl von Geweben vorkommt, unter anderem auch im Kleinhirn und in der Netzhaut (Siehe beispielsweise [65],[18],[60], für *H. sapiens* systematisch auch [www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)). Ziel war zunächst die Untersuchung des Lokalisationsmusters von RanBPM, um ein Gewebe zu identifizieren, das sich für die Studie der Kolo-kalisation von RanBPM und Calbindin D-28k eignet. Zu diesem Zweck wurden Gefrierschnitte aus dem Kleinhirn der Maus gefärbt, da Calbindin D-28k dort in den Purkinjezellen reichlich exprimiert ist und auch RanBPM Protein in diesen Zellen nachgewiesen wurde (Literatur wie oben, und Einleitung). Um RanBPM nachzuweisen, wurden im Rahmen von indirekten Immunfärbungen verschiedene primäre Antikörper gegen Epitope dieses Proteins angewendet. Zu klären war zunächst, ob mit der gewählten Methodik überhaupt RanBPM detektierbar ist. Deswegen wurden am Anfang nur Einzelfärbungen durchgeführt. Wenn nicht anders vermerkt, dann wurden diese Untersuchungen am Weitfeld-Epifluoreszenzmikroskop durchgeführt. Schon die ersten Färbungen mit dem polyklonalen Antikörper gegen RanBPM der Firma Millipore zeigten immunpositive Zellen sowohl im Kleinhirn als auch im Hirnstamm. Ein starkes Signal war bei vielen Präparaten direkt unterhalb der Pia mater zu sehen, außerdem traten längliche Strukturen hervor, die das Stratum moleculare der Kleinhirnrinde durchliefen und auf Höhe der Purkinje-Zellschicht endeten. Diese zeigten sich sowohl in der Weitfeldepifluoreszenzmikroskopie als auch im konfokalen Mikroskop (Abb. 3.1, A). Der Verlauf und die palisadenartige Anordnung dieser Strukturen könnten denen der Fortsätze von Bergmanngliazellen entsprechen.[21],[37] Im Stratum purkinjense zeigten sich die Zelleiber der Purkinjezellen als gegen den Hintergrund wenig hervortretende Strukturen. Zwischen ihnen, an der Grenze zum Stratum granulosum, kamen intensiv gefärbte rundliche Gebilde vor, die vermutlich auf Grund ihrer Lokalisation als die Perikarya der Bergmanngliazellen zu identifizieren sind. Dafür sprach auch die Tatsache, dass die oben erwähnten Fortsätze daraus hervorgingen.

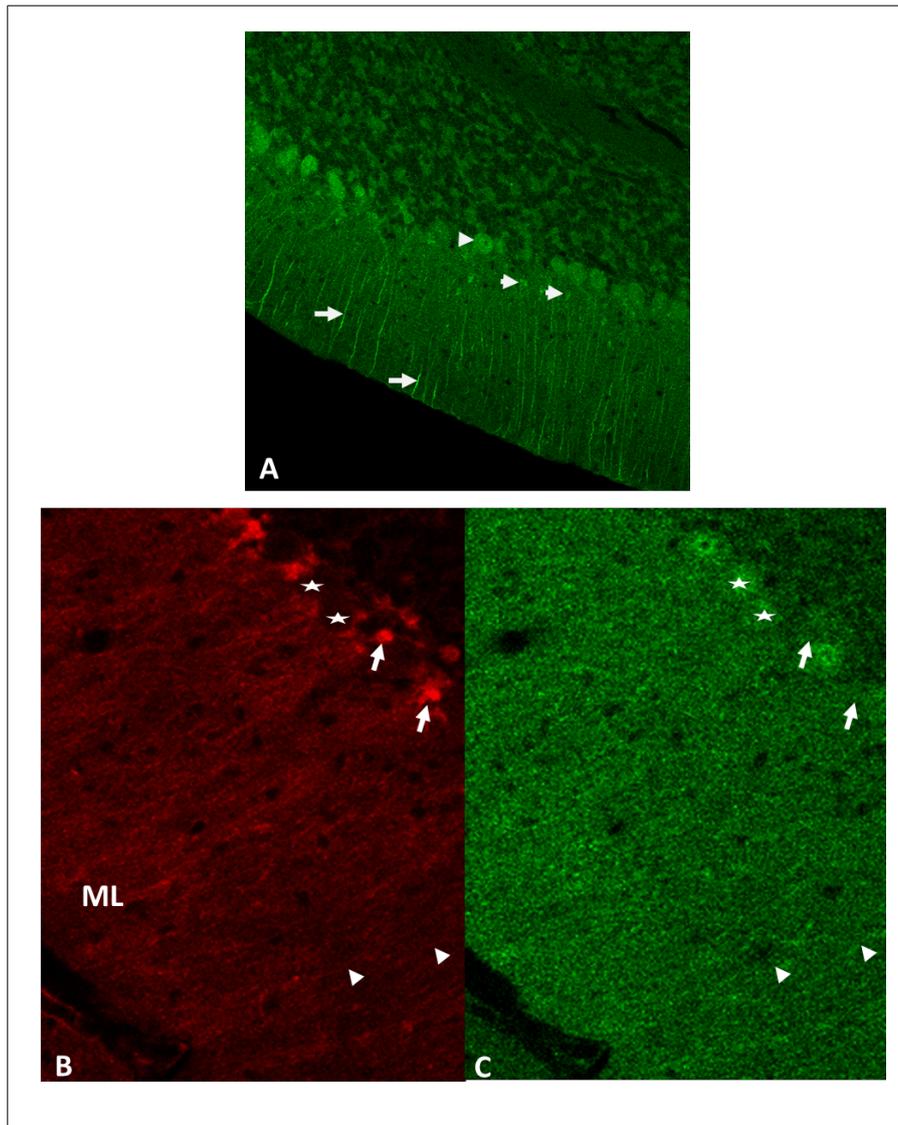


Abbildung 3.1: Rinde des Mauskleinhirns (A) Immunfärbung mit RanBPM Antikörpern (Millipore), deutlich gefärbt sind unter anderem Purkinjezellen (Pfeilspitze) und die Fortsätze (lange Pfeile) und Somata (kurze Pfeile) von Bergmann-Gliazellen, Konfokalmikroskop, offenes pinhole. (B,C) Doppelfärbung gegen S100 (B, rot) und RanBPM (Millipore), ML Molekularschicht, Pfeil: Somata von Bergmann-Glia, Sterne: Somata von Purkinjezellen (als Aussparungen in (B), da nicht S100-positiv). Doppeltgefärbte Fasern, vermutlich Fortsätze von Bergmann-Gliazellen sind erkennbar (Pfeilspitzen). Konfokale Mikroskopie, mittleres Bild aus einem Z-Stack.

Aus embryologischen Untersuchungen ist bekannt, dass die Bergmann-Gliazellen Vertreter protoplasmatischer Astrozyten sind und als Radialglia Leitstrukturen für die wandernden Proneurone darstellen.[40] Sie kommen nur im Stratum purkinjense und im Stratum moleculare vor und bilden, neben der Membrana limitans glialis perivascularis, an der Oberfläche dieser letzten Schicht die Membrana limitans glialis superficialis. Aus dieser könnte das intensive Signal unterhalb der Pia mater entstehen, das oben erwähnt wurde. Im Zelleib kommen bei den Bergmann-Gliazellen die typischen Bestandteile vor, die auch in üblichen Astrozyten zu finden sind, wie zum Beispiel das saure gliofibrilläre Protein (GFAP) und reichlich Glykogen.[50] Angesichts dieser ersten Beobachtungen wurden weitere Kleinhirngefrierschnitte aus denselben Tieren auch mit Antikörpern gegen GFAP und S100 gefärbt. Tatsächlich konnten wieder ähnliche längliche, durch die Molekularschicht hindurch laufende, RanBPM und S100 beziehungsweise GFAP doppeltgefärbte Strukturen, beobachtet werden (Abb. 3.1 B, C; Daten für GFAP nicht gezeigt). Um eine Vorstellung zu gewinnen, ob RanBPM auch in Neuronen detektierbar ist, wurden zusätzlich zu den Doppelfärbungen mit den Antikörpern gegen GFAP auch Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen neuronenspezifisches

beta-Tubulin III (TU-20) durchgeführt. Auch diese Gefrierschnitte wurden nach dem Standardprotokoll gefärbt und anschließend am Weitfeld-Epifluoreszenzmikroskop betrachtet. In diesem Versuch war in den TU-20 positiven Zellen kein RanBPM detektierbar. Dieser Befund war insofern überraschend, als neuronales RanBPM von anderen durchaus beschrieben ist ([www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)). Allerdings wurde auch dort deutliche Unterschiede in der Signalstärke zwischen verschiedenen Antikörpern beobachtet. Purkinjezellen, in denen in free-floating Schnitten (s. u.) neuronales Tubulin III nachweisbar ist, waren in Gefrierschnitten mit dem TU-20 Antikörper nur schwach markiert. Um die Antikörper in weniger komplexen Umgebungen weiter zu testen, wurden auch Primärkulturen aus dem Gehirn der Maus (ohne Kleinhirn und ohne Hirnstamm) aus wenige Tagen alten Mäusen eingesetzt (Kulturen freundlicherweise überlassen von Frau Jie Xu, Physiologie, LMU; hergestellt nach dem Protokoll von Puschmann et al., 2010).[72] Somit konnten die Färbungen auch an dissoziierten Nerven- und Gliazellen getestet werden. Dafür wurden sowohl Einzelfärbungen jeweils mit den primären Antikörpern gegen RanBPM (Millipore), gegen GFAP und Tubulin III durchgeführt als auch Doppelfärbungen auf RanBPM/GFAP und auf RanBPM/Tubulin III. In GFAP positiven Zellen war RanBPM detektierbar. Außerdem sprach auch die Morphologie dieser doppelt gefärbten Zellen dafür, dass es sich um Astrozyten handelte und nicht um Nervenzellen.(Abb. 3.2).

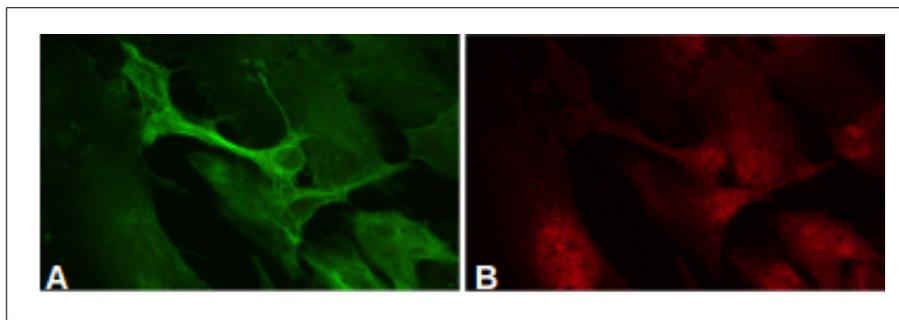


Abbildung 3.2: Primärkulturen aus dem Mausgehirn, Doppelfärbung mit primären Antikörpern gegen (A) GFAP und (B) RanBPM (Millipore). Deutlich zu sehen sind die fibrillären Strukturen unter Aussparung der Zellkerne in (A) und die homogene Füllung des Cytoplasmas und der Nuklei in (B). Weitfeldepifluoreszenz, 100x Objektiv.

Hingegen war bei den Tubulin III positiven Zellen kein RanBPM sichtbar (Daten nicht gezeigt). Bei Präparaten, die nur gegen RanBPM gefärbt wurden, wurde auch DAPI eingesetzt, um den Zellkern zu färben und dadurch eine bessere Vorstellung von der intrazellulären Verteilung des RanBPM zu bekommen. Es ist bekannt, dass RanBPM zytosolisch, aber auch in Assoziation mit den Zellmembranen und intranukleär vorkommt (Nishitani et al., Denti et al.).[47],[18] Bei den Zellen aus den Primärkulturen konnte das Protein cytosolisch und im Kern nachgewiesen werden, nicht dagegen eine Anreicherung in der Membran (Abb. 3.2). Das Protein scheint besonders perinukleär konzentriert zu sein. Unterschiede in der intrazellulären Verteilung erklären sich vermutlich durch die Abhängigkeit der intrazellulären Lokalisation von der Modifikation des Proteins (bspw. Phosphorylierung; Denti et al.). [18] Zusätzlich zum polyklonalen Antikörper von Millipore wurden primäre Antikörper von anderen Firmen eingesetzt, um zu prüfen, ob diese ähnliche Ergebnisse liefern. Primäre Antikörper gegen RanBPM von Santa Cruz und von abcam wurden an Gefrierschnitten vom Kleinhirn, aber auch an den oben beschriebenen isolierten Zellen verwendet. Die primären Kaninchenantikörper von Santa Cruz lieferten selbst nach Antigendemaskierung (Kochen in Citratpuffer) keine Signale, weder an den Gefrierschnitten des Kleinhirns noch in den Präparaten dissoziierter Hirnzellen. Von abcam wurden sowohl primäre Antikörper aus Kaninchen als auch aus Ziege verwendet. Beide Antikörper lieferten Ergebnisse in Einzel- sowie in Doppelfärbungen, die vergleichbar mit denjenigen sind, die bei dem Einsatz von den primären Antikörpern von Millipore gewonnen wurden (Daten nicht gezeigt). Allerdings schien das Signal bei der Anwendung der aus Kaninchen gewonnenen Antikörper stärker zu sein. Bemerkenswert war die Tatsache, dass auch hier in den Kleinhirnpräparaten längliche Strukturen sichtbar waren, die das Stratum moleculare durchquerten und im Stratum purkinjense auf Höhe der Purkinjezellen endeten, und welche wie oben als Bergmannglia interpretiert werden. Das Signal-Hintergrundverhältnis schien beim Antikörper aus Ziege schlechter zu sein (Daten nicht gezeigt). Um die primären Antikörper gegen RanBPM weiter zu charakterisieren, wurden sie auch an anderen Geweben getestet. Es ist bekannt, dass RanBPM unter anderem auch in Eierstöcken und in Hoden von Mäusen vorkommt.[53] Deswegen wurden Einzelfärbungen gegen RanBPM auch an Gefrierschnitten dieser Organe angefertigt. In beiden Fällen konnten einzelne gefärbte Zellen nachgewiesen

werden (Daten nicht gezeigt). Diese Befunde entsprachen veröffentlichten Daten.[53] Da beim Nachweis von RanBPM in Gefrierschnitten aus dem Kleinhirn das Signal-Hintergrundsverhältnis in Nervenzellen sehr gering war, wurde nach alternativen Geweben für die Kollokalisationsanalyse gesucht. Aus diesem Grund wurden Gefrierschnitte aus der Netzhaut angefertigt, die sich durch eine sehr klare zytologische Struktur auszeichnet.

### **3.1.1.2 Das Vorkommen von RanBPM und Calbindin D-28k in Gefrierschnitten der murinen Netzhaut**

Nicht nur die zytologische Struktur der Netzhaut war von Vorteil, sondern auch die Tatsache, dass in der Literatur in voneinander unabhängigen Publikationen sowohl RanBPM als auch Calbindin D-28k dort beschrieben werden. Seebahn et al. [60] demonstrieren in ihrer Arbeit, dass RanBPM in zwei horizontalen Schichten in der inneren plexiformen Schicht vorkommt. Calbindin D-28k ist ebenfalls in der inneren plexiformen Schicht exprimiert, es kann aber zusätzlich auch in anderen Schichten nachgewiesen werden, wie es in der Arbeit von Wassle et al [43]. dargestellt wird.

Zunächst wurden Einzelfärbungen mit den Kaninchenantikörpern gegen RanBPM der Firmen Millipore und abcam durchgeführt. Neben den Antikörpern wurde auch der Kernfarbstoff DAPI eingesetzt, um die Schichtung der Netzhaut besser darzustellen. Das Vorkommen von RanBPM in zwei definierten Schichten innerhalb der inneren plexiformen Schicht konnte dabei nicht bestätigt werden, vielmehr kamen intensiver gefärbte Strukturen in der äusseren plexiformen Schicht und in der Ganglienzellschicht vor, auch zeigten die Fortsätze der Stäbchen und Zapfen ein starkes Signal, besonders die Teile, die direkt in Kontakt mit dem Pigmentepithel waren (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu zeigten die Einzelfärbungen mit den mono- und polyklonalen Antikörpern gegen Calbindin D-28k deutliche Signale. Besonders intensiv gefärbt waren einzelne Ganglienzellen in der Ganglienzellschicht sowie eine horizontale Zellschicht an der Grenze zwischen der äußeren plexiformen Schicht und der inneren Körnerzellschicht. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um die horizontalen Zellen, die auch in der Arbeit von Wassle[43] beschrieben werden (Daten nicht gezeigt). Für die weiteren Versuche wurde abweichend vom Standardprotokoll die nach Seebahn adaptierte Färbemethode verwendet.[60] Beim Einsatz der monoklonalen Antikörpern SP1 177 wurden Strukturen in der inneren plexiformen Schicht sichtbar, die bei der Anwendung von den polyklonalen Antikörpern von Millipore und abcam nicht zu sehen waren. Der Hintergrund blieb aber so intensiv, dass die Durchführung der Färbung nochmal so verändert wurde, wie Denti in ihrer Arbeit beschreibt.[18] Die übliche Permeabilisierung und Blockierung fanden nicht statt, die Präparate wurden stattdessen fünf Minuten lang in eiskaltem Methanol und anschließend dreißig Sekunden lang in Chloroform eingetaucht. Durch diese Methode konnte die Hintergrundfärbung massiv reduziert werden. Nach dem neuen Protokoll wurden Einzelfärbungen mit den Kaninchenantikörpern von Millipore und abcam wiederholt, sowie Doppelfärbungen mit diesen Antikörpern und dem monoklonalen Antikörper gegen Calbindin D-28k durchgeführt. Auch wurden Einzelfärbungen mit dem monoklonalen Antikörpern SP1 177 gegen RanBPM wiederholt und Doppelfärbungen mit den polyklonalen Antikörpern gegen Calbindin D-28k angefertigt (Abb. 3.3). Durch die reduzierte Hintergrundfärbung waren gefärbte Strukturen in der inneren plexiformen Schicht nun auch bei Anwendung der Kaninchenantikörper gegen RanBPM sichtbar, wobei ein intensiveres Signal wiederum von der Ganglienzellschicht und von der äußeren plexiformen Schicht ausstrahlte (nicht gezeigt). Die monoklonalen Antikörper schienen weniger Hintergrund zu verursachen (Abb. 3.3, B). Ob das auf einer höheren Spezifität oder darauf beruht, dass der monoklonale Antikörper nicht alle Formen des Proteins bindet, bleibt offen. Auch bei Anwendung der monoklonalen Antikörper waren nun gefärbte Strukturen in der inneren und äußeren plexiformen Schicht sowie in der Ganglienzellschicht vorhanden, so dass die Ergebnisse für poly- und monoklonale Antikörper vergleichbar waren.

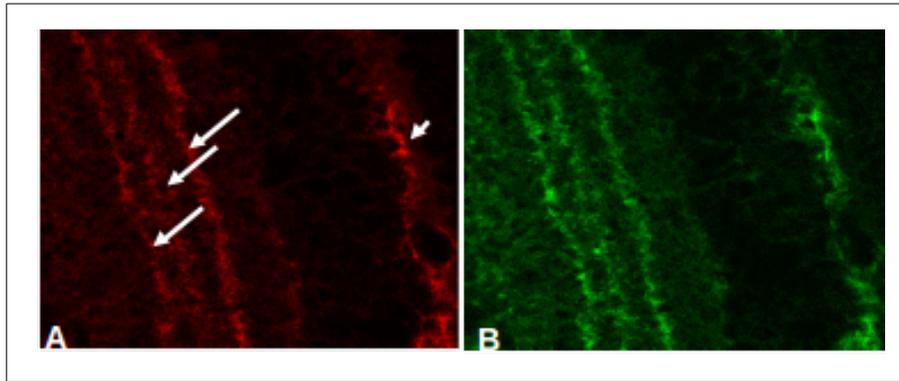


Abbildung 3.3: Mause retina, Doppelfärbung mit primären Antikörpern gegen (A) Calbindin D-28k (polyklonal) und (B) RanBPM (monoklonal). Deutlich zu sehen sind die drei horizontalen Banden (lange Pfeile) und die Färbung in der Horizontalschicht (kurzer Pfeil). Die Muster sind ähnlich, aber nicht vollständig deckungsgleich. Konfokale Mikroskopie, 63x Objektiv, mittlere Schicht aus einem Z-Stack.

Auch wenn diese Doppelfärbungen der Retina deutliche Hinweise auf eine Kolo-kalisation von RanBPM und Calbindin D-28k geben und eine Korrelationsanalyse interessant wäre, wurde diese Arbeit auf die Purkinjezelle fokussiert. Gründe für diese Entscheidung sind die sehr gute Charakterisierung dieser Nervenzellen bezüglich des Vorkommens und der intrazellulären Verteilung von Calbindin D-28k sowie die in der Einleitung beschriebenen Ansätze zum Verständnis der Funktion dieses Proteins in diesen Zellen. Daher wurden nun im Verlauf dieser Arbeit weitere Hinweise auf die Spezifität der schwachen RanBPM Fluoreszenz in Neuronen sowie Färbemethoden gesucht, die bezüglich Purkinjezellen das Verhältnis von Signal zu Hintergrund erhöhen können.

### 3.1.1.3 Immunhistochemischer Nachweis von RanBPM in Gefrierschnitten des Kleinhirns

Um zu prüfen, ob das schlechte Signal-Hintergrundsverhältnis der RanBM Färbung auf die Detektion mittels Fluoreszenz zurück zu führen ist, wurden zunächst einige Serien von Präparaten zusätzlich immunhistochemisch untersucht. Das Ausgangsmaterial waren wiederum Gefrierschnitte aus dem Kleinhirn der Maus. Diese wurden mit dem polyklonalen Antikörpern gegen RanBPM von Millipore und biotinylierten sekundären Antikörpern nach der Vectastain-Methode gefärbt. Im Weitfeld-Hellfeld konnten die länglichen Strukturen, die das Stratum moleculare durchqueren und schon bei der indirekten Immunfluoreszenz beobachtet wurden, ebenfalls identifiziert werden. Diese wie oben als Fortsätze von Bergmannglia identifizierten Strukturen waren wegen des sehr geringen Hintergrundes besonders gut zu sehen. Purkinjezellen waren allerdings nicht deutlicher gefärbt als bei der indirekten Immunfluoreszenz (Daten nicht gezeigt). Der in manchen immungefärbten Schnitten entstandene Eindruck einer inhomogenen Färbung in Form parasagittaler Muster, wie für manche Kleinhirnantigene beschrieben,[17],[40] bestätigte sich nicht. Zur Qualitätskontrolle der verwendeten Schnitte wurden andere Gefrierschnitte nach derselben Methode mit polyklonalen Antikörpern gegen Calbindin D-28k gefärbt. Die Purkinjezellen traten dabei im Stratum purkinjense hervor. Massiv gefärbt waren die birnenförmigen Zellkörper, weniger intensiv gefärbt waren die dendritischen Bäume, die in das Stratum moleculare bis hin zur Oberfläche hineinragen. An der Basis der Purkinjezellen war, je nach Schnittführung des Präparats, auch das Axon sichtbar, das in das Stratum granulosum hineinzieht und als einzige Efferenz die Kleinhirnrinde in Richtung der Kleinhirnerne verlässt (Daten nicht gezeigt). Mit diesen und den vorhergehenden Experimenten war klar, dass die Standardimmunfärbung auf Gefrierschnitten für die geplante Kolo-kalisationsanalyse nicht geeignet ist.

### 3.1.1.4 Nachweis mittels Immunfluoreszenz in free-floating Schnitten des Kleinhirns der Maus

Auf der Suche nach Immunfluoreszenz-Protokollen mit günstigeren Signal-Hintergrundsverhältnisse bei Nervenzellen und insbesondere Purkinjezellen wurde daraufhin die Methodik der free-floating Schnitte getestet. Eindrücklich war die Tatsache, dass nun auch die Purkinjezellen in den Färbungen mit den Kaninchenantikörpern gegen RanBPM deutlich hervortraten (Abb. 3.4 A, C). In doppeltgefärbten Präparaten gegen RanBPM und Calbindin D-28k waren die Purkinjezellen eindeutig doppeltgefärbt (Abb.

3.4). Zusätzlich wurden auch monoklonale anti-RanBPM Antikörper verwendet: In diesen Färbungen war der Hintergrund weniger intensiv, sodass die einzelnen Strukturen noch besser zu sehen waren. Von den Purkinjezellen war das Soma bei Verwendung sowohl der poly- als auch der monoklonalen RanBPM Antikörper zytosolisch und im Kern gefärbt. Die großen dendritischen Abzweigungen waren ebenso deutlich sichtbar (Abb. 3.4 A, C). In den Calbindin-gefärbten Präparaten waren die Verästelungen der dendritischen Bäume bis hin zu den Dornen sichtbar (Abb. 3.4 B, D). Genaue Inspektion zeigt eine weitgehend deckungsgleiche Färbung. Es finden sich aber auch Stellen in den Präparaten, an denen Unterschiede sichtbar werden. Die mit dem Pfeil markierte Purkinjezelle zeigt im Rotkanal (RanBPM) eine anderes Verhältnis von zytosolischer zu nukleärer Färbung als im Grünkanal (Calbindin D-28k) (Abb. 3.4 C, D).

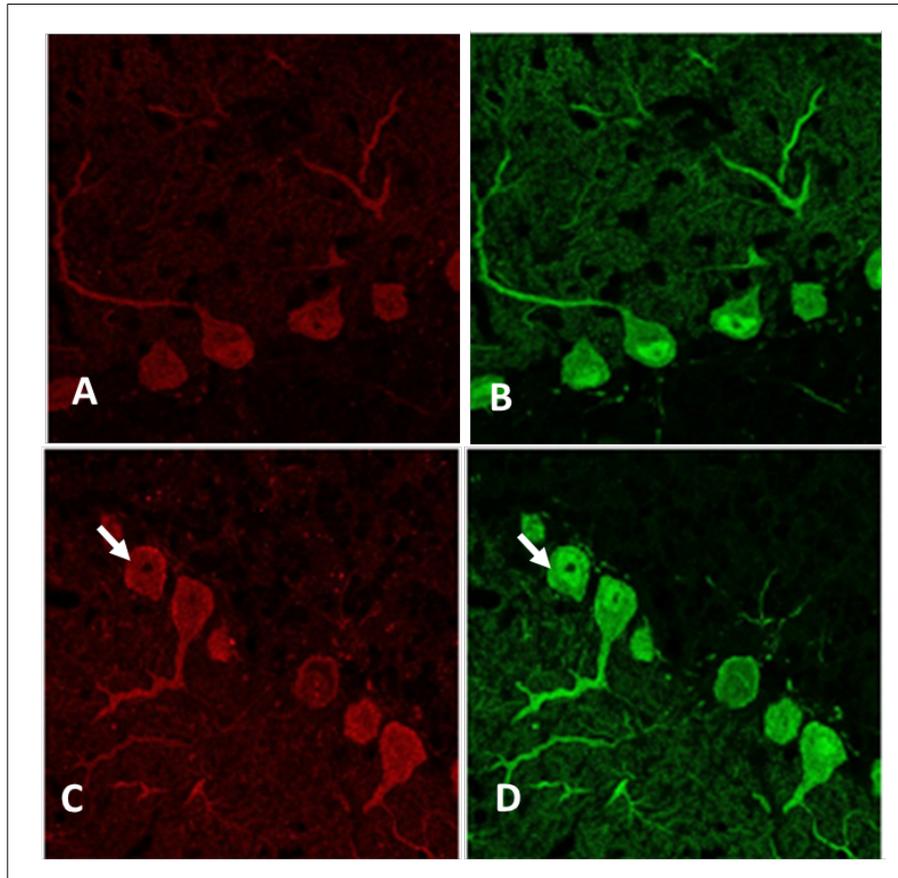


Abbildung 3.4: Zwei Beispiele zur Doppelfärbung gegen RanBPM (rot) und Calbindin D-28k (grün) von free-floating Schnitten des Kleinhirns der Maus. A, B polyklonaler Antikörper gegen RanBPM (Millipore); C, D polyklonaler Antikörper gegen Calbindin D-28k. Die Signale beider Kanäle sind weitgehend überlappend, zeigen allerdings auch kleine Unterschiede, wie beispielsweise in Verhältnis von Kern- und Zytosolfärbung der mit dem Pfeil markierten Zelle. Konfokale Bilder, aus der Mitte eines Z-Stacks, 63x Objektiv.

Um die Qualität der Schnitte und die Spezifität der Signale weiter zu testen, wurden auf ähnlichen free-floating Schnitten des Kleinhirns weitere Färbungen mit Antikörpern gegen neuronenspezifisches Tubulin III und *pcp-2* durchgeführt. Es ergaben sich die für diese Antigene bekannten Muster (Abb. 3.5, A, C). Bei den Färbungen gegen Tubulin III wurde, wie für ein Protein des Zytoskelettes erwartet, keine homogene sondern eher eine gestreifte Färbung ausschließlich im Zytosol gefunden.

Zusätzliche Experimente wurden mit Antikörpern gegen Parvalbumin, Calretinin und *pcp-2* durchgeführt, zum Teil als Einzelfärbung, zum Teil in Kombination jeweils mit Antikörpern gegen Calbindin D-28k. Es zeigten sich die erwarteten Signale in Purkinjezellen und Interneuronen für Parvalbumin (Abb. 3.5, E) und in Körnerzellen für Calretinin (nicht gezeigt) (z.B. Schwaller et al. 2003)[8] und in Purkinjezellen für *pcp-2* (Abb. 3.5, D). Bei letzteren waren die Purkinjezellen wiederum zytosolisch homogen gefärbt, auch intranukleär konnte ein Signal nachgewiesen werden, wobei die Nukleolen meistens ausgespart blieben. Das entspricht publizierten Daten.[16] In den gegen GFAP gefärbten Präparaten waren die bereits

beschriebenen länglichen Strukturen sichtbar, die am ehesten mit den Fortsätzen der Bergmanngliazellen vereinbar sind (Abb. 3.5, C).

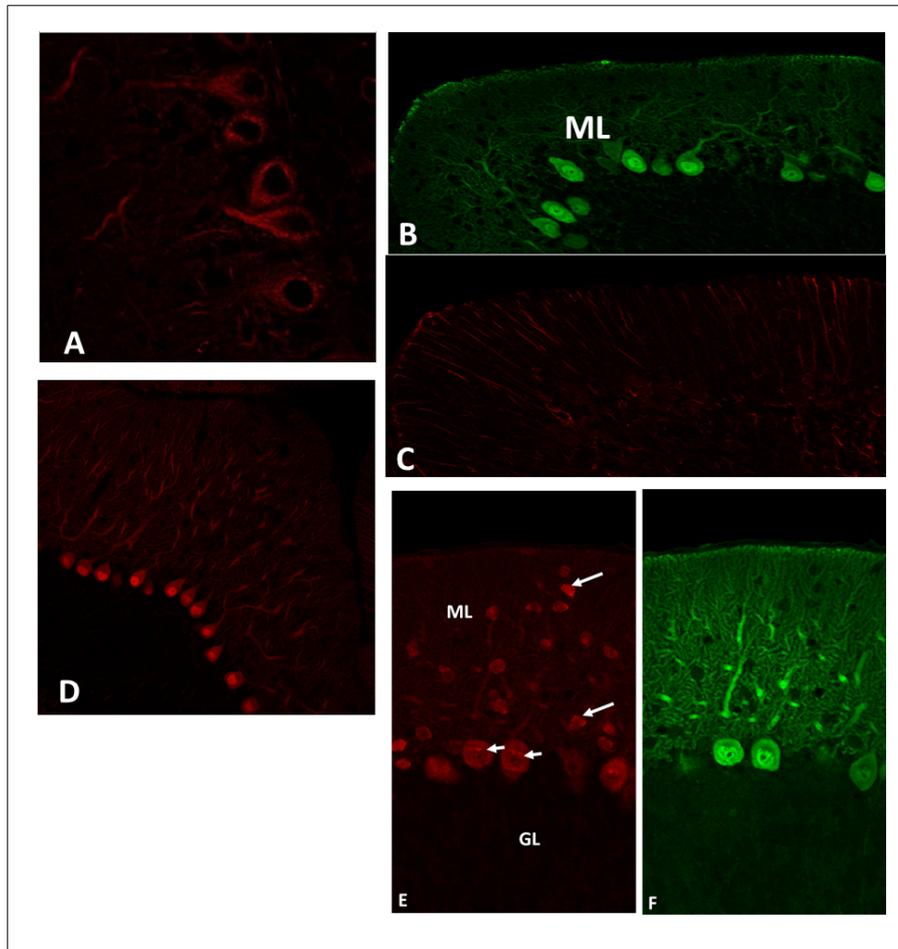


Abbildung 3.5: Immunfärbungen von free-floating Schnitten des Kleinhirns der Maus. (A) Gegen neurospezifisches Tubulin III (TU-20), (B, C) Doppelfärbung auf Calbindin D-28k (B, grün) und GFAP (C, rot). (D) Färbung gegen pcp-2. (E, F) Doppelfärbung auf Parvalbumin (E, rot) und Calbindin D-28k (F, grün). (A) zeigt die erwartete inhomogene extranukleäre Verteilung eines Bestandteiles des Zytoskelettes, (B und F) die typische Calbindinfärbung im Kleinhirn; alle Anteile der Purkinjezellen sind gefärbt, (C) die bereits beschriebenen Fortsätze von Bergmanngliazellen in der Molekularschicht (ML); (D) die homogene zytosolische und nukleäre Verteilung des kleinen nicht-sezernierten Proteins pcp-2, und (E) das typische Muster von Parvalbumin (kurze Pfeile: Purkinjezellen, lange Pfeile: Interneurone in der Molekularschicht (ML), Körnerzellschicht (GL)). Konfokalmikroskop, mittlere Bilder von Z-Stacks., 63x Objektiv.

Somit war in der indirekten Immunfluoreszenz auf free-floating Schnitten eine Technik gefunden, an der die Kolokalisationsanalyse durchgeführt werden konnte. Vor der Anfertigung der für diese Analyse notwendigen Präparate sollte jedoch zunächst noch die Spezifität der dafür einzusetzenden RanBPM Antikörper weiter untersucht werden. In der Literatur (s. Einleitung und folgendes Kapitel) sind sehr unterschiedliche Formen des Proteins beschrieben. Bei den Angaben zu kommerziellen Antikörpern ist aufgrund dieser Vielfalt nicht immer klar, wie spezifisch diese RanBPM detektieren. Daher wurden die für die vorliegende Arbeit zur Verfügung stehenden RanBPM Antikörper einer rigorosen Analyse im Westernblot unterzogen. Als Proben wurden Homogenate aus Geweben der Maus und Lysate transfizierter Zellen eingesetzt. Die verwendeten mono- und polyklonalen Antikörper gegen Calbindin sind dagegen so gut charakterisiert, dass ähnliche Analyse nicht nötig war (s. bspw. Schwaller et al. 2003; vielfältige Erfahrungen in der AG Molekulare Neurophysiologie, in welcher diese Arbeit entstand).

## 3.1.2 Spezifität der Antikörper gegen RanBPM

### 3.1.2.1 Westernblot Analyse

Lysate von Geweben der Maus wurden mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert, wie im Kapitel 2 beschrieben. Zur Detektion wurden dieselben Primärantikörper eingesetzt, die auch im Rahmen der Immunfärbungen verwendet wurden. Aus dem Gehirn wurden Proben aus dem parietalen Cortex, dem Hippocampus und dem Kleinhirn untersucht. Da RanBPM aber auch in anderen Geweben beobachtet wurde, wurden zusätzlich Proben aus der Milz, den Nieren, dem Herz und den Gonaden entnommen und analysiert. Da das Kleinhirn im Mittelpunkt dieser Arbeit steht, werden Ergebnisse zu diesen Proben ausführlich dargestellt. Stellvertretend für ein aus der Literatur gut bekanntes RanBPM exprimierendes nicht-neurales Gewebe wird auf die Analyse der Testes der Maus fokussiert. Endogenes RanBPM konnte in beiden Geweben identifiziert werden. Ohne ersten Antikörper wurden keine Banden detektiert (Abb. 3.6 B). Auffällig sind grundsätzliche Unterschiede zwischen den beiden Geweben und zwischen den poly- und monoklonalen Antikörpern. In Kleinhirnlysaten ergeben sich mit polyklonalen Antikörpern, unabhängig von der zur Immunisierung verwendeten Spezies, multiple Banden. Besonders deutlich sind eine Dublette bei etwa 95 kDa und Banden zwischen 72 und 95 kDa, bei 52 kDa, zwischen 42 und 52 kDa, eine Dublette bei ca. 42 kDa, eine Bande bei 34 kDa, eine zwischen 26 und 34 kDa, eine bei 26 kDa und eine bei etwa 17 kDa. Auffällig ist, dass diese Banden im Kleinhirnlisat sowohl bei Verwendung der Kaninchen- als auch bei Verwendung der Ziegenantikörper ähnlich ausgeprägt sichtbar sein (Abb. 3.6 A, C). Kaninchenantikörper einer anderen Firma, Santa Cruz, geben schwächere Banden, die aber soweit beurteilbar auf dem Gel ähnlich laufen (Abb. 3.6, D). Deutlich anders ergibt sich im Kleinhirn mit dem monoklonalen Antikörper eine einzelne dominante Bande von etwa 95 kDa (Abb. 3.6 D). Weitere schwache Banden können nicht ausgeschlossen werden, insbesondere eine Bande zwischen 42 und 52 kDa. Anders ist das Muster bei der Analyse der Testis-Lysate (Abb. 3.6 F, G). Der Ziegenantikörper ergibt zwei dominante Banden, eine bei etwa 95 kDa und eine bei etwa 26 kDa. Weiter scheint die 95 kDa Bande von einer deutlich schwächeren langsamer laufenden Bande zu einer Dublette ergänzt zu werden (Abb. 3.6 G). Auch einige der weiteren für das Kleinhirn beschriebenen Banden scheinen, wenn auch deutlich schwächer vorhanden zu sein (bspw. zwischen 72 und 95 kDa, bei 52 kDa und zwischen 42 und 52 kDa). Mit dem monoklonalen Antikörper wird eine deutliche Bande bei 95 kDa und eine schwache Bande zwischen 42 und 52 kDa sichtbar (Abb. 3.6 F).

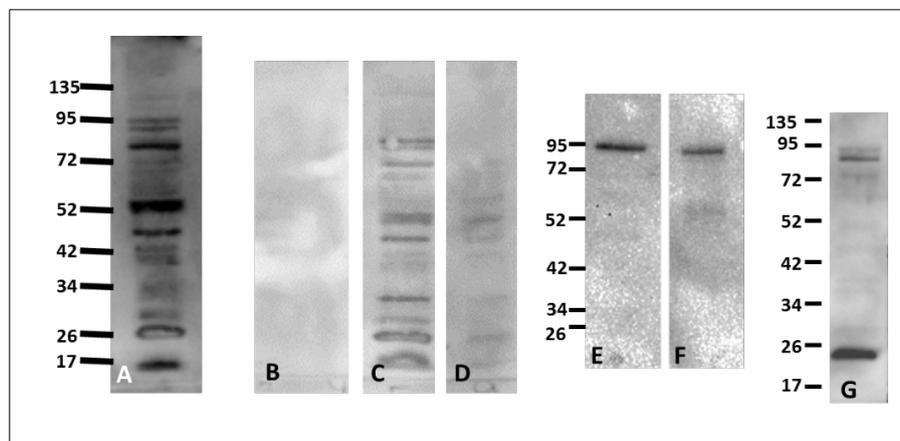


Abbildung 3.6: Westernblot Analyse verschiedener Gewebe der Maus detektiert mit unterschiedlichen Antikörpern gegen RanBPM. (A-E) Kleinhirn: (A) Ziegenantikörper, 1:1000. (B) Ohne ersten Antikörper, zweiter Antikörper wie für primären Kaninchenantikörper. (C) Kaninchenantikörper (abcam), 1:2000. (D) Kaninchenantikörper (Santa Cruz), 1:500. (E) Monoklonaler Antikörper, 2,5 µg/ml. (F-G) Testes: (F) Monoklonaler Antikörper, 2,5 µg/ml. (G) Ziegenantikörper, 1:1000. (A-D, G) 20 µg Gesamtprotein; (E, F) 23 µg Gesamtprotein.

Insgesamt lassen sich soweit folgende Schlüsse ziehen:

- Unterschiedliche polyklonale Antikörper detektieren multiple Banden ähnlicher Größe, die in den beiden untersuchten Geweben relativ zueinander unterschiedlich stark ausgeprägt sind.
- Die Ergebnisse mit dem monoklonalen Antikörper sind konsistent mit der Vorstellung, dass dieser in beiden untersuchten Geweben im Wesentlichen eine langsam laufende Form detektiert.

Der Vergleich dieser Ergebnisse mit der Literatur ist schwierig, da es nicht viele publizierte Daten dazu gibt und weil häufig nicht die gesamten Gelspuren auf den Westernblots gezeigt werden. Ursprünglich für Gewebe beschriebene Formen von 55 – 57 kDa (Nakamura)[45] wurden später revidiert zu einer 90 - 94 kDa Form (Nishitani)[47], die aber in dieser Publikation nur in Extrakten verschiedener Zelllinien, nicht in Geweben, beschrieben wurde. Diese Form könnte der oben beschriebenen Dublette bei 90 kDa entsprechen. Je nach für die Immunisierung verwendeten Epitop zeigen sich in diesen Lysaten von Zelllinien in dieser Publikation weitere, nicht genauer charakterisierte Banden zwischen 67 und 94, bei 43 kDa und zwischen 43 und 67 kDa. Deren Beziehung zu den oben in Kleinhirn und Testes beschriebenen Banden ist unklar. Für den Kaninchenantikörper von abcam zeigt die Firmenwebseite eine Westernblot Analyse, von U2OS Zellen (von einem humanen Osteosarkom stammend), die sehr ähnliche multiple Banden wie die oben für Kleinhirn beschriebenen zeigt ([www.abcam.com/ranbp9-antibody-ab64275.html](http://www.abcam.com/ranbp9-antibody-ab64275.html), aufgerufen im Mai 2016). Für den Ziegenantikörper findet sich auf dieser Webseite die Westernblotanalyse eines fetalen Hirnlysates einer nicht genannten Spezies, die nur eine dominante Bande etwas unter 100 kDa aufweist. Dabei könnte es sich um eine der oben beschriebenen Banden bei 95 kDa handeln. Die Uniprot Datenbank gibt für RanBPM zwei Isoformen von 78 bzw. 42 kDa an ([www.uniprot.org/uniprot/Q96S59#Q96S59-1](http://www.uniprot.org/uniprot/Q96S59#Q96S59-1), aufgerufen im Oktober 2016). Damit ließen sich ähnliche Banden in den oben beschriebenen Gewebslysaten erklären. Für den auch in dieser Arbeit verwendeten monoklonalen Antikörper wird nach in vitro Translation der RanBPM cDNA eine Länge von etwa 97 kDa beschrieben (Denti).[18] Die auch in dieser Arbeit gezeigten Westernblots zu Lysaten verschiedener Mausgewebe zeigen keine vollständigen Gelspuren und sind ohne Größenstandard abgebildet (Abb. 1.2 D in Denti).[18] Vermutlich ist eine dominante Bande bei etwa 95-97 kDa gezeigt. In der Arbeit wird weiter erwähnt, dass in einigen Geweben dazu ein oder zwei höhermolekulare Banden beobachtet wurden. Die 95-97 kDa Bande könnte der oben für Mauskleinhirn und –testis beschriebenen dominanten Bande bei 95 kDa entsprechen. Eine unabhängige Publikation findet mit demselben monoklonalen Antikörper in E14 fetalem Rattenhirnlysate ebenfalls eine Bande bei ca.95 kDa.[10] Insgesamt bleibt die Bewertung der Spezifität der mit den verschiedenen Antikörpern auf Gewebslysaten erzielten Ergebnisse im Westernblot schwierig. Ähnliche Banden bei Verwendung polyklonaler Antikörper aus verschiedenen Spezies sind ebenso wie die Abwesenheit von Signalen bei Auslassen des ersten Antikörpers Hinweise auf Spezifität. Banden, wie sie mit den Kaninchen- oder Ziegenantikörpern gegen RanBPM detektiert wurden, wurden mit Antikörpern dieser Spezies gegen andere Antigene (wie Calbindin D-28k, Calretinin oder GFAP) in Westernblot Analyse derselben Gewebe im Labor nie beobachtet. Unklar bleibt die molekulare Natur der multiplen detektierten Banden und die Frage, welche davon durch Proteinmodifikation erklärt werden können. Zumindest Phosphorylierung und Ubiquitylierung mit folgendem Abbau spielen vermutlich eine Rolle [18] ([www.uniprot.org/uniprot/Q96S59#Q96S59-1](http://www.uniprot.org/uniprot/Q96S59#Q96S59-1), aufgerufen im November 2016). Weiter zur Frage der Spezifität und weiterer Möglichkeiten, diese zu prüfen, siehe auch die Diskussion. Verschiedene Analysen wurden mit dem Ziel durchgeführt, die im Gewebe beobachteten endogenen Banden mit den auf ein RanBPM Expressionsplasmid zurückzuführenden zu vergleichen und damit weitere Hinweise auf Spezifität der Antikörper zu erhalten. Dazu wurden Westernblotanalysen und Immunfärbungsexperimenten mit transfizierten Zellen durchgeführt. Verwendet wurde ein RanBPM-Expressionsplasmid, welches nach Überzeugung sowohl der ursprünglich beschreibenden Arbeitsgruppe [47] als auch unabhängiger Gruppen [18] eine RanBPM cDNA voller Länge enthält. Diese ist mit einem Flag-Tag fusioniert.[18] Auch in Lysaten der transfizierten Zellen der beiden Zelllinien HN10e und MDCK waren mit allen Antikörpern im Westernblot Banden detektierbar. Die Kaninchenantikörper von Millipore und abcam detektieren übereinstimmend eine dominante Bande bei etwa 90 kDa (Abb. 3.7 A, B und Abb. 3.8 A, B). Bei langer Exposition lässt sich ebenfalls übereinstimmend eine schwache Bande bei etwa 52 kDa finden ((Abb. 3.7 A\*, B\* und Abb. 3.8 A\*, B\*). Das Vorhandensein weiterer schwacher Banden ist nicht sicher beurteilbar. In Lysaten von Zellen, die mit einem EGFP Expressionsplasmid transfiziert wurden, lassen sich mit keinem der beiden Antikörper Banden zeigen. Das überrascht, da man bisher in den meisten transfizierten Zelllinien endogenes RanBPM hat nachweisen können. Allerdings gibt es zu der hier verwendeten HN10e Linie bisher keine Daten, so dass wir vermuten, dass die endogene Expression in diesen Zellen sehr niedrig ist.

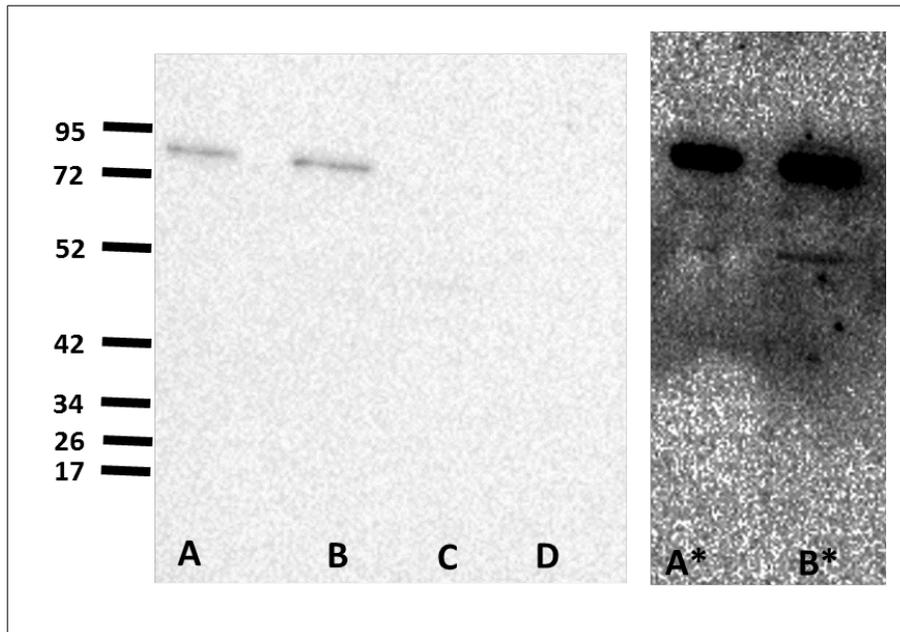


Abbildung 3.7: Westernblot Analyse von HN10e Zellen. (A, B) Zwei Proben HN10e Zellen transfiziert mit Flag-RanBPM, Detektion mit Kaninchenantikörpern gegen RanBPM (Millipore) (C, D) Zwei Proben HN10e Zellen transfiziert mit EGFPN3, gleiche Detektion wie in A, B. (A\*, B\*) Lange Exposition von (A, B).

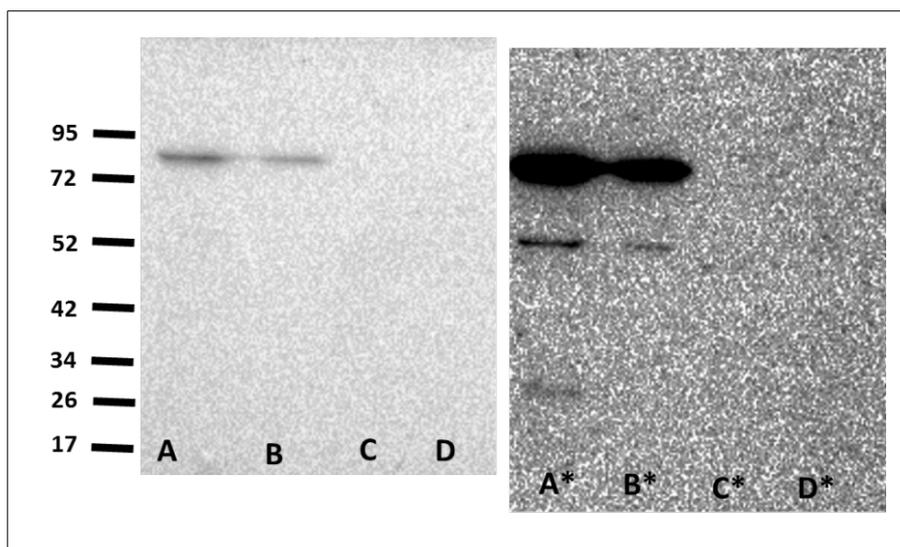


Abbildung 3.8: Westernblot Analyse von HN10e Zellen. (A, B) Zwei Proben HN10e Zellen transfiziert mit Flag-RanBPM, Detektion mit Kaninchenantikörpern gegen RanBPM (abcam) (C, D) Zwei Proben HN10e Zellen transfiziert mit EGFPN3, gleiche Detektion wie in A, B. (A\*, B\*) Lange Exposition von (A, B).

Ganz ähnlich sind die Befunde bei Verwendung des Ziegenantikörpers (Abb. 3.9).

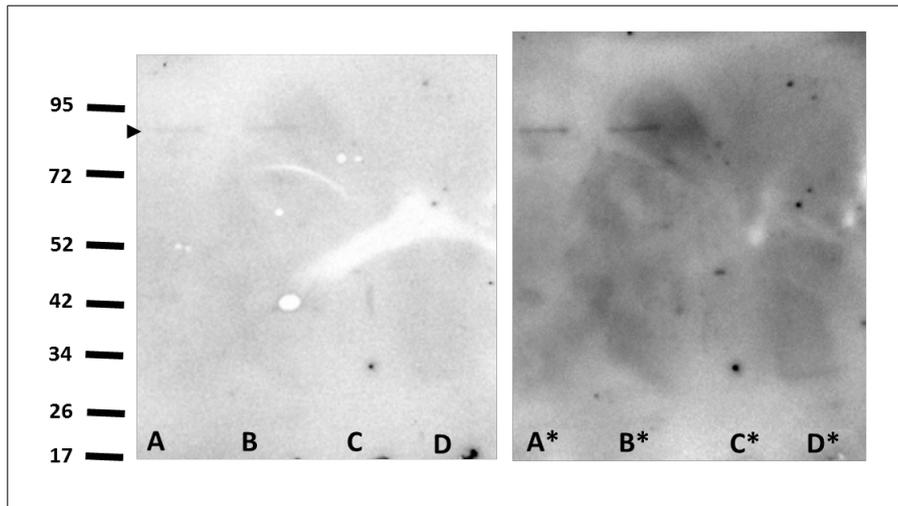


Abbildung 3.9: Westernblot Analyse von HN10e. (A, B) Zwei Proben HN10e Zellen transfiziert mit Flag-RanBPM, Detektion mit Ziegenantikörpern gegen RanBPM (abcam). Der Pfeilkopf zeigt auf eine schwache Bande unterhalb 95 kDa. (C, D) Zwei Proben HN10e Zellen transfiziert mit EGFPN3, gleiche Detektion wie in A, B. (A\*, B\*) Lange Exposition von (A, B).

Da das verwendete Expressionsplasmid eine Flag-tag Fusion mit RanBPM kodiert, wurden auch Anti-Flag Antikörper für die Analyse eingesetzt (Abb. 3.10). In den RanBPM transfizierten Zellen zeigt sich eine spezifische Bande von ähnlicher Größe wie bei Verwendung von Kaninchen- oder Ziegenantikörpern gegen RanBPM. Diese Bande findet sich nicht in EGFP transfizierten Zellen (Abb. 3.10 A, B). An diesen wird aber sichtbar, dass der verwendete Flag-Antikörper unspezifisch Banden bei etwas über 42 kDa, bei 26 kDa und zwischen 17 und 26 kDa detektiert. Bezüglich der Detektion des Flag-tags scheint der Antikörper zuverlässig, er bspw. auch ein mit Flag fusioniertes Calbindin D-28k detektiert.

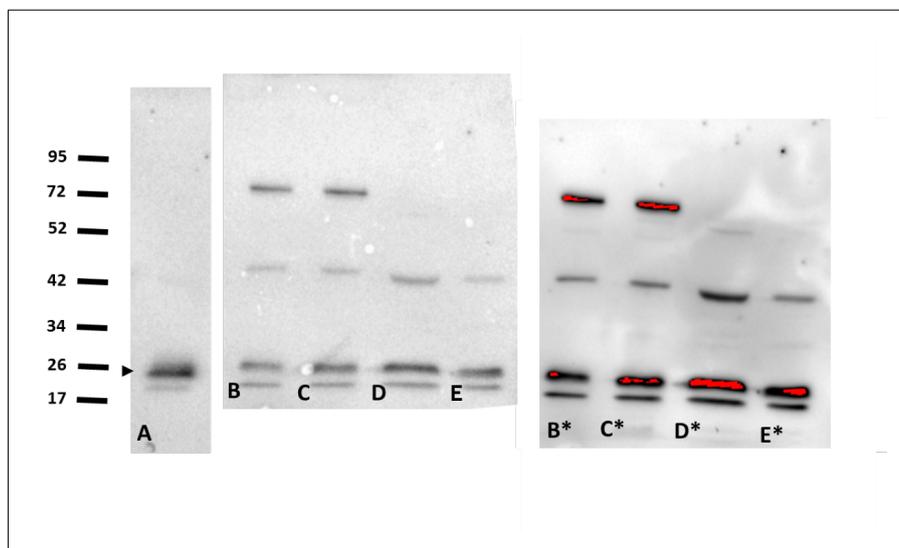


Abbildung 3.10: Westernblot Analyse von HN10e Zellen. (A) HN10e Zellen transfiziert mit einem Flag-Calbindin-D-28k Expressionsplasmid. (B, C) Zwei Proben HN10e Zellen transfiziert mit Flag-RanBPM, Detektion mit Antikörpern gegen Flag (abcam) (D, E) Zwei Proben HN10e Zellen transfiziert mit EGFPN3, gleiche Detektion wie in A, B. (B\* - E\*) Lange Exposition von (B - E). Spezifische Banden sind in (A) bei etwa 28 kDa (Molekulargewicht von Calbindin D-28k) und in (B, C, B\*, C\*) die Banden zwischen 72 und 95 kDa. Die Bande zwischen 42 und 52 kDa ist unspezifisch, da sie auch in Proben auftritt, die Flag nicht exprimieren (EGFPN3 enthält keine Flag Sequenz).

Membranständiges RanBPM wurde von Denti et al. insbesondere in MDCK Zellen beobachtet und auf Phosphorylierung zurückgeführt.[18] Um die Reaktion der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper mit solche Formen von RanBPM zu prüfen, wurden auch MDCK Zellen mittels Westernblot untersucht (Abb. 3.11).

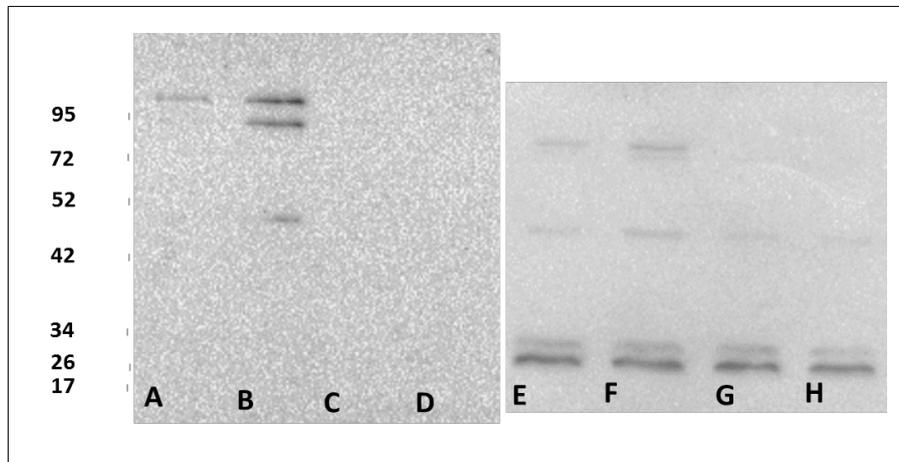


Abbildung 3.11: Westernblot Analyse von MDCK Zellen. (A, B) Zwei Proben MDCK Zellen transfiziert mit Flag-RanBPM, Detektion mit Kaninchenantikörpern gegen RanBPM (Millipore) (C, D) Zwei Proben MDCK Zellen transfiziert mit EGFPN3, gleiche Detektion wie in A, B. (C, D) Proben wie in (A,B), Detektion mit Antikörpern gegen Flag (abcam). (G, H) Proben wie in (C, D), Detektion mit Flag-Antikörpern.

Im Unterschied zu den HN10e Zellen zeigt sich nun eine weitere klare Bande, die etwas größer als 95 kDa ist. Diese Bande scheint allerdings über den Flag-tag nicht detektierbar zu sein (Abb. 3.11, E, F). Sie ist allerdings spezifisch, dass sie in Extrakten von EGFP transfizierten Zellen nicht auftaucht (Abb. 3.11, C, D).

### 3.1.2.2 Immunfärbung an Zelllinien

Da sich Epitope im Westernblot meist anders präsentieren als in der Immunfärbung und Ziel der Bemühungen zur Charakterisierung der RanBPM Antikörper ihr Einsatz für eine auf Immunfluoreszenz basierende Kolokalisationsanalyse war, wurden einige Zelllinien nativ oder transfiziert mittels Immunfluoreszenz untersucht. Zur Zelltransfektion wurden zwei Methoden angewendet, die ähnliche Ergebnisse, sowohl qualitativ als auch quantitativ, lieferten. Dabei handelte es sich um die BES-Calcium-Phosphat-Methode und um die Lipofektion. Unterschiedliche Zelllinien wurden mit RanBPM-Flag10 transfiziert. Vor allem wurden HN10e und MDCK-Zellen eingesetzt, die auch in der vorstehenden Westernblot Analyse im Zentrum standen. Es wurden die polyklonalen Antikörper gegen RanBPM von abcam und Millipore eingesetzt. Zudem wurde der anti-Flag Antikörper verwendet. Die unterschiedlichen polyklonalen Antikörper lieferten sehr ähnliche Färbemuster. Abbildung 3.12 zeigt exemplarisch den Vergleich von Kaninchenantikörpern (Millipore) (Abb. 3.12, A) mit Ziegenantikörpern (Abb. 3.11, B).

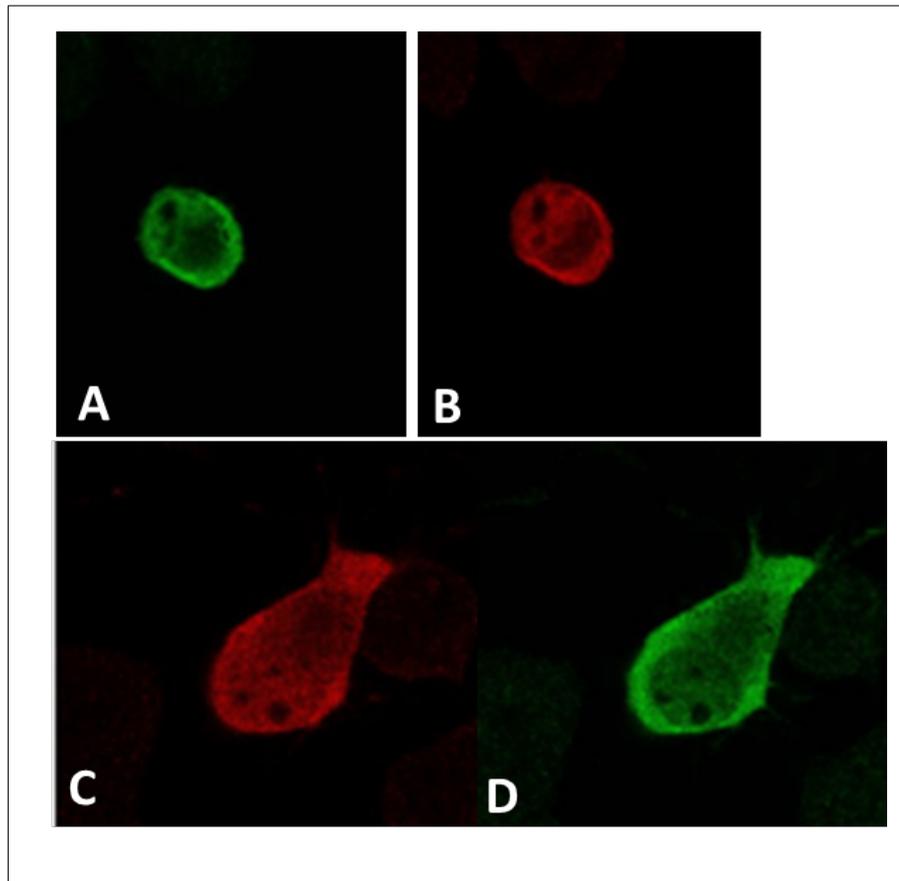


Abbildung 3.12: Doppelfärbung von Flag-RanBPM transfizierten HN10e Zellen. (A) Kaninchenantikörper gegen RanBPM (Millipore). (B) Ziegenantikörper gegen RanBPM. (C) Anti-Flag. (D) Kaninchenantikörper gegen RanBPM (abcam).

Auch der Vergleich der Färbung mit RanBPM Antikörper mit derjenigen mit Flag-Antikörper zeigt eine weitgehend übereinstimmende Färbung (Abb. 3.12 C, D). Die im Westernblot deutlich sichtbare unspezifische Reaktion des Flag-Antikörpers scheint die Immunfärbung nicht zu dominieren.

MDCK Zellen wurden nicht transfiziert und transfiziert untersucht. Flag-RanBPM transfizierte Zellen zeigen sowohl in der Färbung auf RanBPM (nicht gezeigt) als auch in der Flag-Färbung eine sehr zellmembrannahе Färbung (Abb. 3.13 A, B). Mittels der von Denti et al. beschriebenen Methanol/Chloroform Behandlung [18] lässt sich in diesen Zellen auch endogenes RanBPM mittels der verschiedenen Primärantikörper nachweisen (Abb. 3.13 C). In Übereinstimmung mit der genannten Literatur befindet es sich ebenfalls im Wesentlichen randständig.

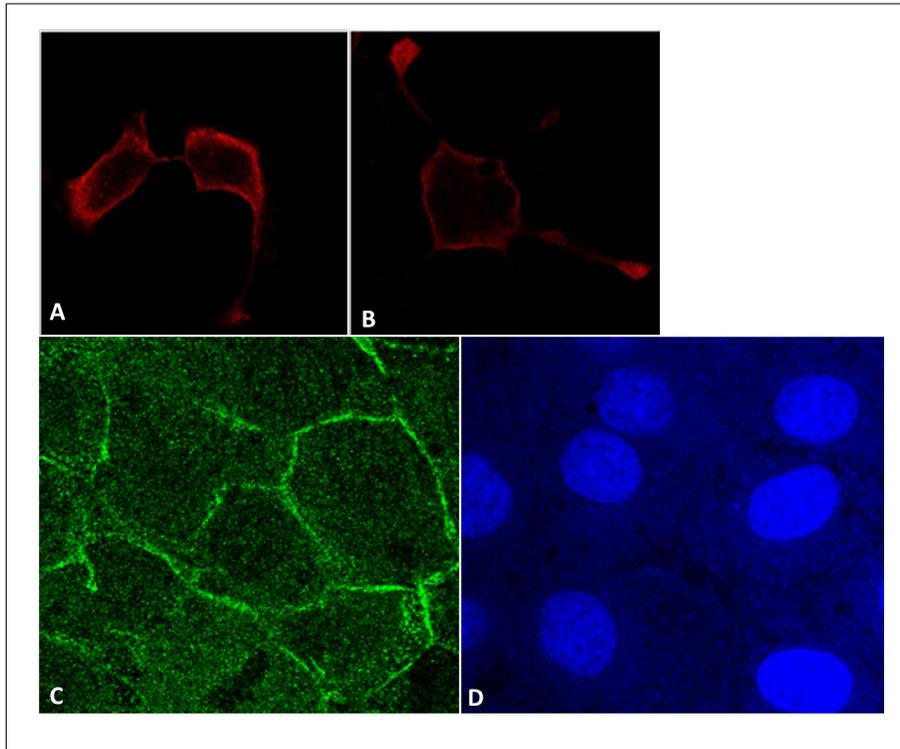


Abbildung 3.13: Färbung von MDCK-Zellen: (A, B) Zwei Beispiele von Flag-RanBPM transfizierten Zellen gefärbt mit Flag-Antikörpern (rot). (C) Nicht-transfizierte Zellen gefärbt mit Kaninchenantikörpern gegen RanBPM (Millipore). (D) Zellkerne aus (C) dargestellt mittels DAPI.

Bei allen durchgeführten Färbungen von Zellen ließen sich beim Auslassen der Inkubation mit dem ersten Antikörper keine Signale nachweisen.

## 3.2 Intensity-Correlation-Analysis

### 3.2.1 Beschreibung der Daten

Um eine mögliche Kollokalisierung der beiden Proteine genauer zu untersuchen führten wir eine quantitative Analyse der Färbung mittels ICA/ICQ-Methoden durch.[39] Diese Methode erlaubt Aussagen darüber, ob die Intensitäten zweier Signale abhängig variieren als Hinweis darauf, dass die Strukturen aus denen die Signale ausstrahlen, möglicherweise interagieren. Die vorstehenden Daten zur Charakterisierung der Antikörper im Westernblot und in der Immunfärbung sind konsistent mit der Annahme, dass sie spezifisch RanBPM detektieren. Einige Kontrollen, welche Spezifität weiter belegen könnten, hätten Materialien gebraucht, die für diese Arbeit nicht verfügbar waren. Sie werden in der Diskussion erörtert. Weiter ist die Charakterisierung der Primärsequenzen und ggf. Modifikationen der verschiedenen Formen des RanBPM Proteins eine wichtige zukünftige Aufgabe, die ebenfalls in der Diskussion angesprochen wird. Für die Immunfärbungen, welche der ICA zugrunde liegen, wurden die poly- und monoklonalen Antikörper gegen Calbindin D-28k und die monoklonalen Antikörper gegen Parvalbumin von Swant, der polyklonale anti-RanBPM Antikörper von abcam und ein Ziegenantikörper gegen GFAP, ebenfalls von abcam, verwendet. Die Swant-Antikörper sind durch Arbeiten in vielen Labors hinsichtlich ihrer Spezifität immer wieder bestätigt worden. Die Verwendung des monoklonalen Antikörpers gegen RanBPM war leider wegen der geringen verfügbaren Mengen nicht systematisch möglich. Diese Färbungen wurden alle an den oben beschriebenen 25  $\mu\text{m}$  dicken free-floating Schnitten des Kleinhirns der adulten Maus durchgeführt. Konzeptionell wurden vier theoretisch verschiedene und klare Situationen untersucht. Der Vergleich der mittels ICA erhaltenen Ergebnisse mit dem theoretisch Erwarteten ermöglicht eine Abschätzung der Validität der Methode. Kritik an Grundlagen und Annahmen der ICA Methodik werden in der Diskussion ausführlich weiter behandelt. In der ersten Situation wurde dasselbe Präparat mit mono- und

polyklonalen Antikörpern gegen Calbindin D-28k doppelgefärbt. Theoretisch sollte sich hier eine komplett überlappende Verteilung in beiden Kanälen ergeben. Diese Situation entspricht also einer positiven Kontrolle. Eine Kritik der zugrundeliegenden Annahme, inwieweit Bindung des einen Antikörpers mit der Bindung des anderen interferiert, findet sich in der Diskussion. Weiter wurde als zweite Situation eine negative Kontrolle untersucht. Dazu wurden Doppelfärbungen mit polyklonalen Kaninchenantikörpern gegen Calbindin D-28k und polyklonalen Ziegenantikörpern gegen GFAP untersucht. Grundlage ist, dass Calbindin D-28k in intakten Astrozyten und Gliazellen nicht gefunden wird [9] und GFAP nicht in normalen Purkinjezellen. Dieses entspricht daher der vom Li et al. als Segregation bezeichneten Situation.[39] Drittens wurden Doppelfärbungen mit polyklonalen Antikörpern gegen Calbindin D-28k und monoklonalen Antikörpern gegen Parvalbumin analysiert. Da beide Antigene in Purkinjezellen und all ihren Kompartimenten vorkommen [8] und eine direkte oder indirekte (als Teil eines größeren Komplexes) Interaktion beider Proteine weder in vitro noch in vivo jemals beschrieben wurde, wird in diesem Versuch die von Li et al. als zufällige Verteilung bezeichnete Situation untersucht.[39] Die vierte Situation war dann die Experimentalsituation, bei welcher mit polyklonalen RanBPM Antikörpern und monoklonalen Calbindin D-28k Antikörpern doppelgefärbt wurde. Brauchbare Verdünnungen der Primärantikörper wurden zu 1:4000 (polyklonaler Antikörper gegen Calbindin D-28k), 1:2000 (monoklonaler Antikörper gegen Calbindin D-28k und Parvalbumin, polyklonaler Antikörper gegen RanBPM) und 1:500 (GFAP) ermittelt und eingesetzt. Als Fluoreszenzfarbstoffe am zweiten Antikörper kamen Alexa 488, 555 und 564 zum Einsatz, diese Antikörper wurden jeweils 1:2000 verdünnt. Die Bilder wurden mit dem x63, 1,4 NA Objektiv am konfokalen Mikroskop als Z-Stack mit dem in Methoden beschriebenen Gerät und Einstellungen durchgeführt. Eine mittlere Ebene aus einem Z-Stack, in welcher ein ausgedehnter Anschnitt des Zellkernes vorhanden sein musste, wurde für die ICA ausgewählt. Eine Region of Interest (ROI) wurde mit dem Freihandwerkzeug so an den Rand des Purkinjezellsomas gelegt, dass keine extrazellulären Pixel in die ROI aufgenommen wurden. Mithin umfasste der gewählte ROI den größten Teil des Somas einschließlich des Zellkerns. Dendritenbäume und Axone wurden nicht systematisch untersucht. Für Situation 1, die überlappende Verteilung, ergaben sich die folgenden Ergebnisse (Abb. 3.14). Hier wurden die Präparate mit mono- und polyklonalen Antikörpern gegen Calbindin D-28k gefärbt. Dasselbe Protein wurde also mit verschiedenen Antikörpern detektiert. Die ICA Kurve (Abb. 3.14 A) zeigt die für abhängige Verteilung theoretisch erwartete Neigung nach rechts. Die Produkte der Abweichungen vom Mittelwert für beide Kanäle sind also für die meisten analysierten Pixel positiv. Hier und im Folgenden ist in der Regel nur der ICA Plot für einen Kanal dargestellt, da der ICA Plot für den zweiten Kanal ähnlich ist und des Weiteren die endgültige Analyse über den Image Correlation Quotienten (ICQ) erfolgt. [39] Die für diese positive Kontrollsituation gemessenen ICQ überspannen einen Bereich von 0,144 bis 0,397 (Tabelle 3.1).

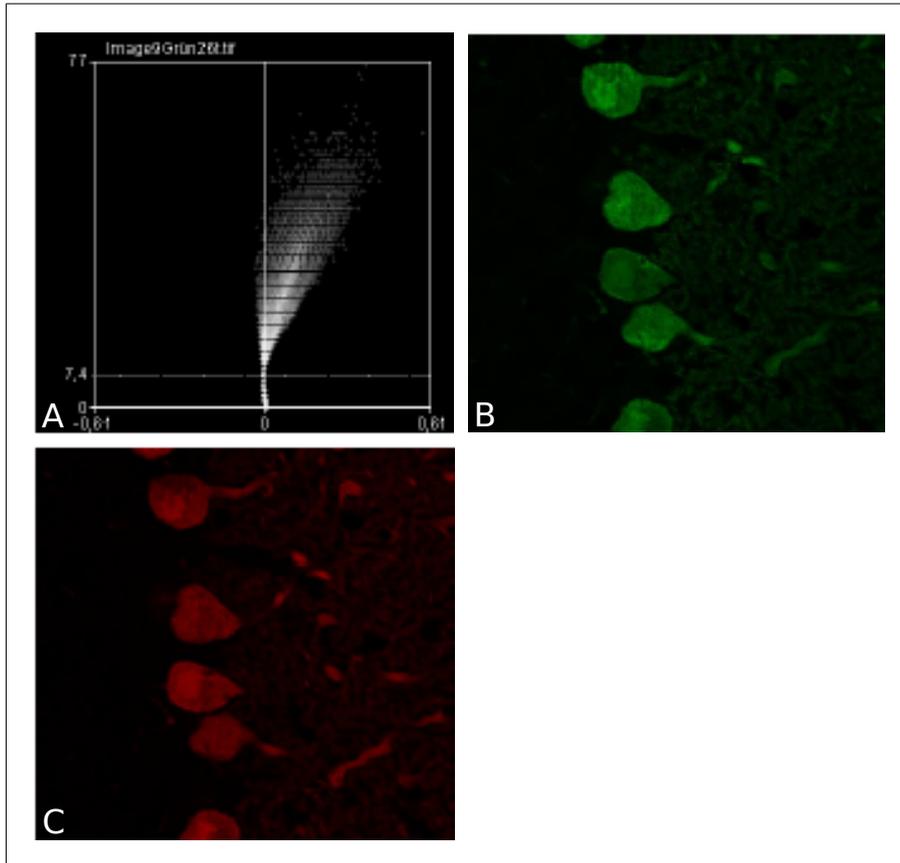


Abbildung 3.14: Image Correlation Analysis für die Positivkontrolle, Doppelfärbung mit poly- und monoklonalen Antikörpern gegen Calbindin D-28k. (A) ICA Plot für den Grün-Kanal. (B) Polyklonaler Calbindin D-28k Antikörper (grün). (C) Monoklonaler Calbindin D-28k Antikörper (rot).

Als Beispiel für eine segregierte, räumlich separate Verteilung wurden Präparate gegen Calbindin D-28k und GFAP angefertigt. In vivo zeigen nur wenige gliale Zellen eine Calbindin Immunreaktivität. Aus dem Kleinhirn sind solche Zellen bisher nicht beschrieben.[9] Calbindin-Färbung wird mithin ausschließlich in Purkinjezellen erwartet, während GFAP in Gliazellen, bspw. Bergmannlia, vorkommt. Am Präparat zeigte sich die erwartete deutliche räumliche Trennung der Signale von Calbindin und GFAP. Es gab keinen Hinweis auf doppeltgefärbte Strukturen. In der ICA-Analyse und ihrer graphischen Darstellung ergab sich eine eher nach links gebeugte Kurve (Abb. 3.15 A). Werte aus beiden Kanälen sind weniger segregierend als erwartet. Mögliche Gründe werden in der Diskussion angesprochen.

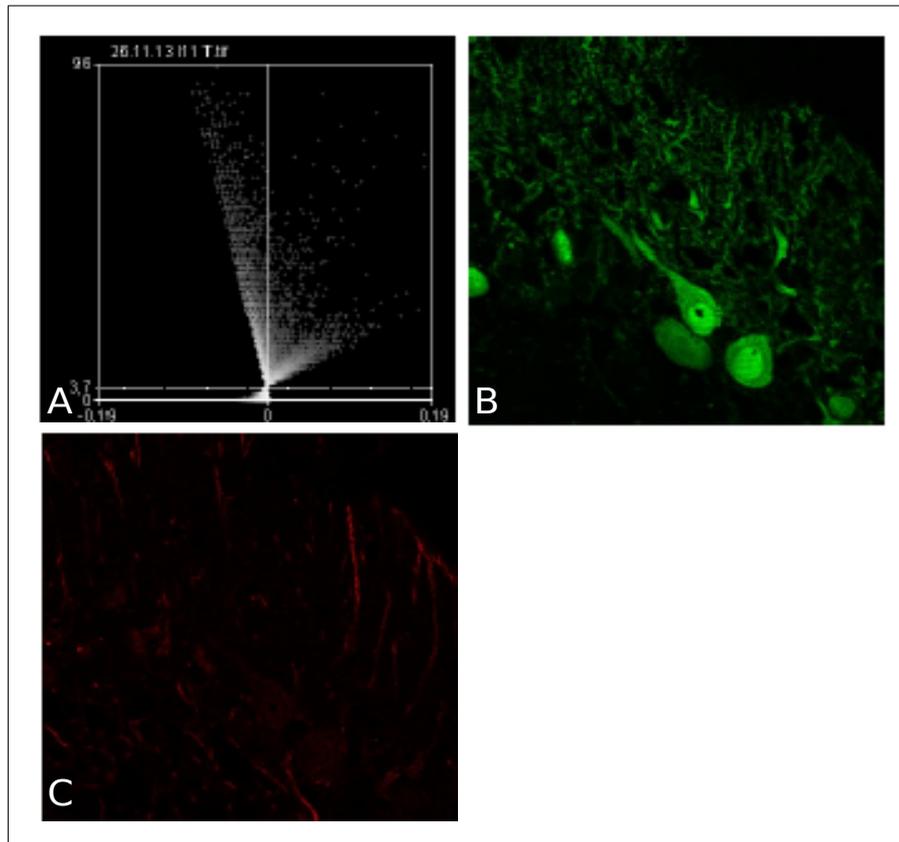


Abbildung 3.15: Image Correlation Analysis für die Negativkontrolle (segregierte Verteilung), Doppelfärbung mit poly- Antikörpern gegen Calbindin D-28k und GFAP. (A) ICA Plot für den Grün-Kanal. (B) Polyklonaler Calbindin D-28k-Antikörper (grün). (C) GFAP-Antikörper (rot).

Als weitere Kontrolle wurde die Doppelfärbung gegen Parvalbumin und Calbindin D-28k analysiert (Abb. 3.16). Parvalbumin ist ein EF-Hand Protein, dass in der Kleinhirnrinde lediglich in Purkinjezellen und Interneuronen (Stern- und Korbzellen) vorkommt.[9] Seine intrazelluläre Verteilung wird als zytosolisch und nukleär beschrieben. Parvalbumin-positive Glia oder nichtneuronale Zellen der Kleinhirnrinde sind nicht bekannt. Ebenso wenig ist eine Interaktion von Parvalbumin mit Calbindin D-28k oder RanBPM beschrieben. Aufgrund seiner Eigenschaften als ein in Purkinjezellen sehr ähnlich dem Calbindin D-28k verteiltes Protein, das nicht mit RanBPM interagiert, wurde Parvalbumin als geeignet für die Darstellung der Situation der Zufallsverteilung zweier Proteine gewählt. In der graphischen Darstellung der Analyseergebnisse zeigt sich eine uhrglasförmige Kurve, die für eine zufällige Verteilung beider Proteine spricht (Abb. 3.16 A).[39] Die ICQ Werte überspannten einen Bereich von -0.041 bis 0.210 (Tabelle 3.1).

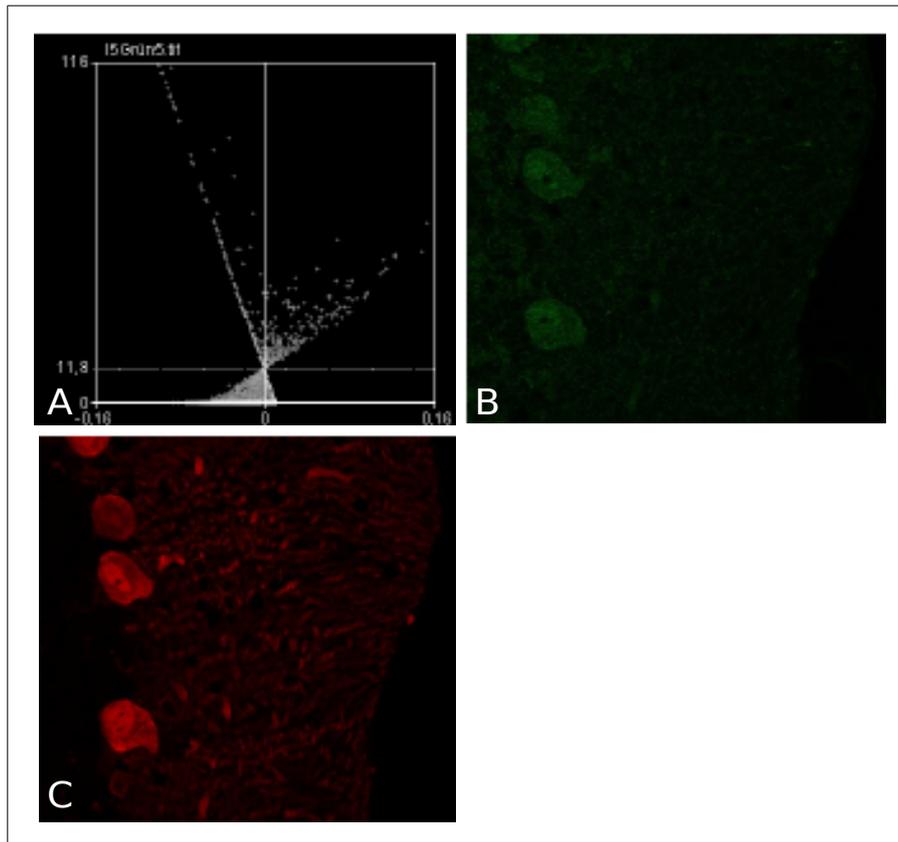


Abbildung 3.16: Image Correlation Analysis für die Zufallsverteilung, Doppelfärbung mit polyklonalen Antikörpern gegen Calbindin D-28k und monoklonalen Antikörpern gegen Parvalbumin. (A) ICA Plot für den Grün-Kanal. (B) Polyklonaler Calbindin D-28k-Antikörper (grün). (C) Monoklonaler Parvalbumin-Antikörper (rot).

Die ICA für Calbindin D-28k und RanBPM wurde systematisch mittels Doppelfärbung mit monoklonalen Antikörpern gegen Calbindin D-28k und polyklonalen Antikörpern gegen RanBPM (abcam) durchgeführt. RanBPM färbte Purkinjezellen deutlich bis in ihre Dendritenbäume (Abb. 3.17 B). Es zeigte sich eine diffuse zytosolische Verteilung mit Intensivierung im perinukleären Abschnitt aber auch im Zellkernbereich, wobei die Nukleolen ausgespart blieben. Das zytosolische Signal schien vor allem aus der Region direkt unterhalb der Zellmembran herzukommen. Die Intensität der Calbindin D-28k Färbung war trotz der hohen Verdünnung des primären Antikörpers sehr ausgeprägt (Abb. 3.17 C). Die Purkinjezellen konnten deutlich bis zu den feinsten Verästelungen des Dendritenbaums gesehen werden. In der graphischen Darstellung ergab sich eine Kurve mit deutlicher Neigung nach rechts (Abb. 3.17 A). Die ICQ Werte für die Somata lagen im Bereich von 0,011 bis 0,254 (Tabelle 3.1). Einzelne für Abschnitte primärer Dendriten durchgeführte ICA ergaben ebenfalls positive ICQ Werte (s. Diskussion), ebenso auch ICA von Färbungen, bei welchen statt des abcam polyklonalen RanBPM Antikörpers derjenige von Millipore verwendet wurde (Daten nicht gezeigt).

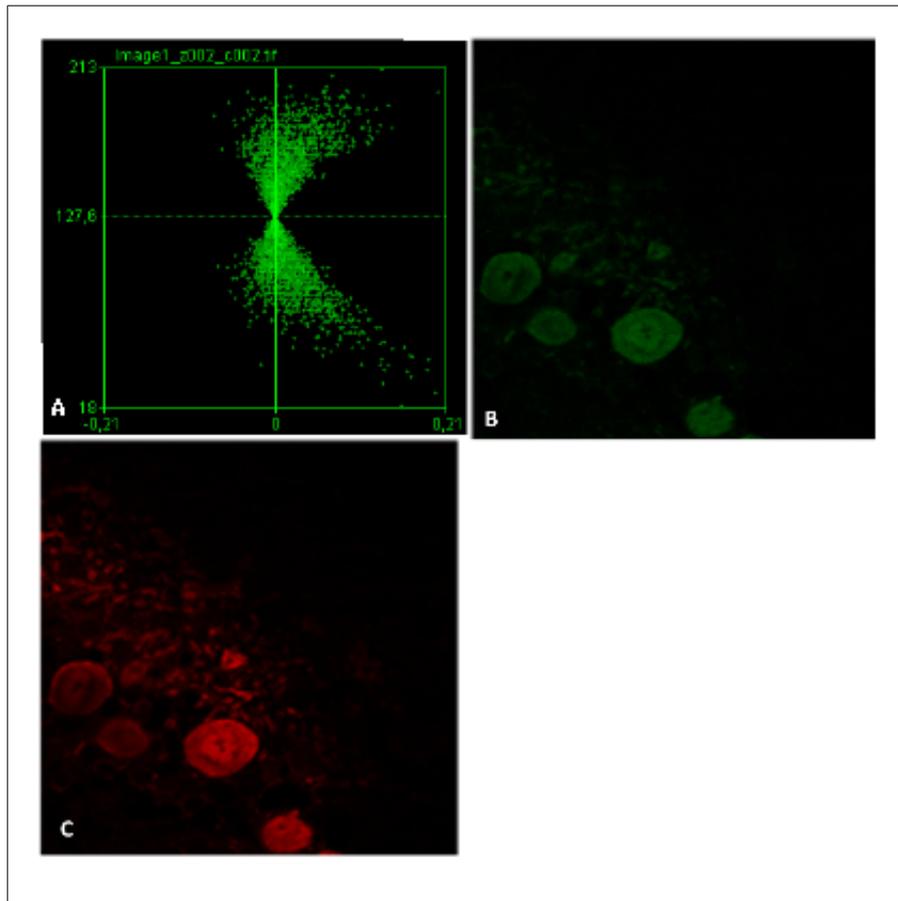


Abbildung 3.17: Image Correlation Analyse für die Doppelfärbung mit polyklonalen Antikörpern gegen RanBPM und monoklonalen Antikörpern gegen Calbindin D-28k. (A) ICA Plot für den Grün-Kanal. (B) Polyklonaler RanBPM-Antikörper (abcam) (grün). (C) Monoklonaler Calbindin D-28k-Antikörper (rot).

### 3.2.2 Analyse der Experimentaldaten

Die für die weitere Analyse eingesetzten Primärdaten sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Diese Analyse beschränkt sich auf Daten aus den oben beschriebenen ROIs der Somata von Purkinjezellen; Daten zu Dendriten sind nicht enthalten. Alle in der Tabelle enthaltenen Daten zu RanBPM wurden mittels des polyklonalen Kaninchen Antikörpers gegen RanBPM der Firma abcam gewonnen. Das angegebene n entspricht der Anzahl der untersuchten ROIs. Die ROIs zu jeder der 4 Situationen stammen jeweils von mindestens 3 unabhängigen Präparaten.

Parv - Calb n=34	Calb Mono - Calb Poli n=23	GFAP - Calb n=12	RAN-Calb n=44
0.098	0.194	0.134	0.124
0.099	0.198	-0.5	0.095
0.148	0.391	0.098	0.069
0.074	0.391	0.058	0.105
0.081	0.391	0.049	0.112
0.067	0.286	0.082	0.096
0.031	0.326	0.088	0.157
0.025	0.297	0.080	0.011
0.076	0.251	0.041	0.145
-0.035	0.216	0.049	0.145
0.011	0.319	0.031	0.108
0.009	0.144	0.065	0.132

-0.015	0.264	0.140
0.049	0.223	0.202
-0.041	0.255	0.147
0.013	0.310	0.165
0.197	0.219	0.190
0.198	0.197	0.134
0.174	0.328	0.175
0.210	0.298	0.136
0.181	0.353	0.162
0.170	0.311	0.173
0.120	0.230	0.143
0.120		0.201
0.167		0.104
-0.012		0.185
0.133		0.135
0.170		0.190
0.095		0.162
0.104		0.161
0.027		0.156
0.057		0.246
0.084		0.119
0.107		0.167
		0.186
		0.189
		0.254
		0.244
		0.219
		0.247
		0.146
		0.141
		0.179
		0.150

Tabelle 3.1: ICQ-Werte aus der ICA für die verschiedenen Situationen

*Abkürzungen:* Calb, Calbindin D-28k; Calb Mono, monoklonale Antikörper gegen Calbindin D-28k; Calb Poli, polyklonale Antikörper gegen Calbindin D-28k; GFAP, gliofibrilläres saures Protein; ICA, Intensity Correlation Analysis; ICQ, Intensity Correlation Quotient; n, Nummer; Parv, Parvalbumin.

Die ICQ Werte der einzelnen experimentellen Gruppen wurden zunächst mit Methoden der beschreibenden Statistik analysiert, und nach dem Ausschluss von Extremwerten mittels inferenzstatistischer Methoden untersucht. Sämtliche Berechnungen wurden mit Hilfe der Software Maple durchgeführt.

### 3.2.3 Box-Plot aus den Experimentaldaten und Ausschluss von Extremwerten

Ein effizientes Instrument für die Interpretation von Experimentaldaten ist deren Darstellung als Box-Plot; dieser erlaubt eine übersichtliche Beschreibung der vorliegenden Daten, an welchen dann die statistische Analyse durchgeführt wurde. Aus dem Box-Plot kann einerseits die Distribution der einzelnen Daten innerhalb einer Datenpopulation eruiert werden, auf der anderen Seite können die Datenpopulationen untereinander in Bezug auf ihre Mittelwerte und Varianz verglichen werden. In jedem Box-Plot werden die Daten jeweils in der Reihenfolge von unten nach oben dargestellt: Beginnend mit dem kleinsten Wert folgt das erste Quartil, dann das zweite (auch Median genannt), das dritte und schließlich der größte Wert. Die Raute stellt den Mittelwert dar. Wenn der Mittelwert sich eindeutig vom Median unterscheidet, spricht das für eine asymmetrische Verteilung der Experimentaldaten.

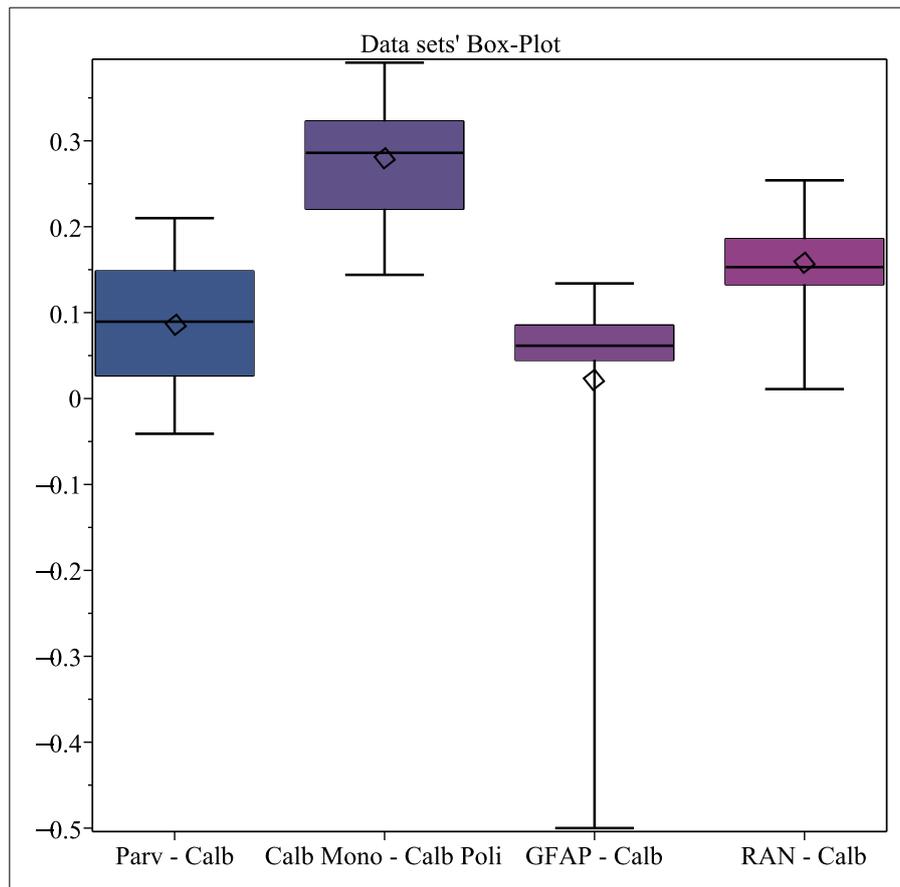


Abbildung 3.18: Box-Plot aus den Experimentaldaten,  
*Abkürzungen:* Calb, Calbindin D-28k; Calb Mono, monoklonale Antikörper gegen Calbindin D-28k; Calb Poli, polyklonale Antikörper gegen Calbindin D-28k; GFAP, gliofibrilläres saures Protein; Parv, Parvalbumin.

Wie aus dem oberen Box-Plot zu entnehmen ist, enthalten die Datenpopulationen einzelne Werte, die als outliers betrachtet werden können und die weiteren Analyse kompromittieren würden.

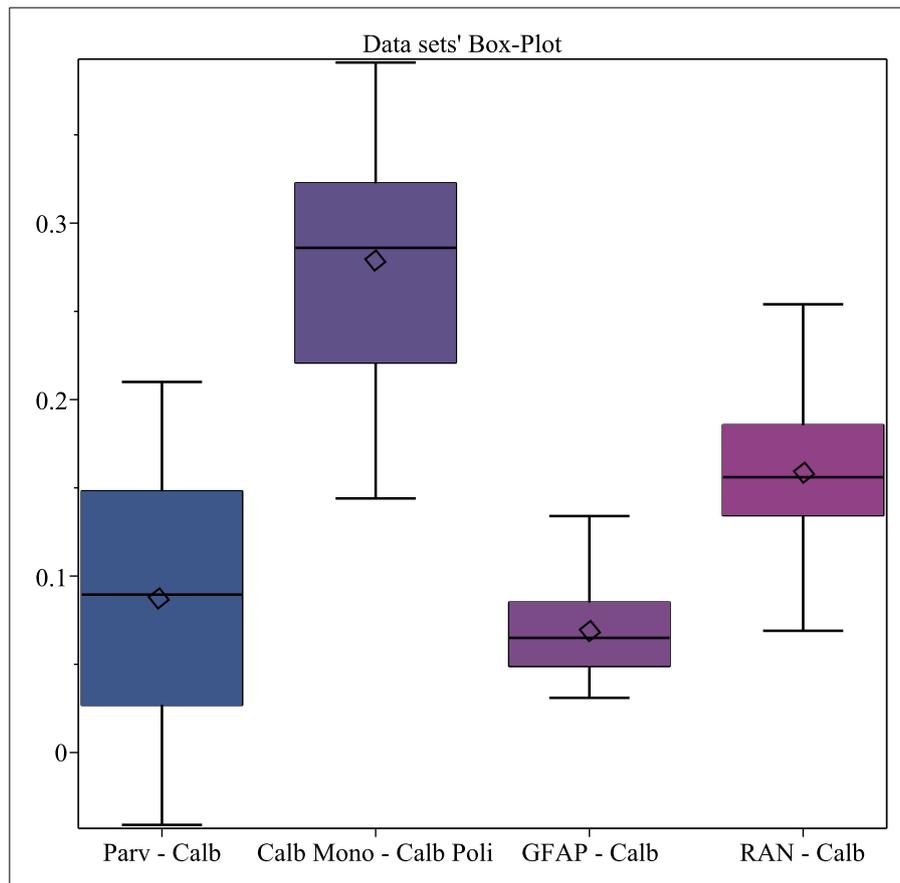


Abbildung 3.19: Box-Plot aus den Experimentaldaten ohne *outliers*,  
 Abkürzungen: Calb, Calbindin D-28k; Calb Mono, monoklonale Antikörper gegen Calbindin D-28k; Calb Poli, polyklonale Antikörper gegen Calbindin D-28k; GFAP, gliofibrilläres saures Protein; Parv, Parvalbumin.

Die Funktion Box-Plot der Software Maple identifiziert als outliers die Daten, die sich mehr als eineinhalb mal die Differenz zwischen erstem und drittem Quartil vom Mittelwert unterscheiden. Nach Entfernung der outliers erscheint die Verteilung der Daten innerhalb der untersuchten Populationen nun symmetrisch (Abb. 3.19). Diese Daten ohne outliers werden im Folgenden als bereinigte Experimentaldaten bezeichnet.

### 3.2.4 Analyse der Normalität der bereinigten Experimentaldaten

Um die Normalverteilung der Daten vor Durchführung des Student-t-Tests zu überprüfen, wurde auf einer Seite eine graphische Darstellung eingesetzt, die optisch zeigt, wie die Daten sich von der Normalreferenz entfernen und die auch Hinweise bezüglich der Varianz der einzelnen Populationen liefert. Auf der anderen Seite wurde ein Shapiro-Test durchgeführt. Die Analyse der Normalität ist unverzichtbar für die nachfolgenden Tests und auch, um einen systematischen Fehler möglichst auszuschließen.

Parv - Calb	Calb Mono - Calb Poli	GFAP - Calb	RAN-Calb
$\mu$ 0.088	$\mu$ 0.277	$\mu$ 0.070	$\mu$ 0.158
$\sigma$ 0.071	$\sigma$ 0.069	$\sigma$ 0.029	$\sigma$ 0.043

Tabelle 3.2: Geschätzte Mittelwerte ( $\mu$ ) und Varianzen ( $\sigma$ ),

*Abkürzungen:* Calb, Calbindin D-28k; Calb Mono, monoklonale Antikörper gegen Calbindin D-28k; Calb Poli, polyklonale Antikörper gegen Calbindin D-28k; GFAP, gliofibrilläres saures Protein; Parv, Parvalbumin.

Die Daten in der Tabelle 3.2 zeigen eine Schätzung der Mittelwerte und der Standardabweichung für jede der vier analysierten Datenpopulationen. Diese Ergebnisse wurden mittels der Softwareapplikation NormalPlot in Maple erzielt. Folgend werden die graphische Darstellung der Normalitätsanalyse für jede Datenpopulation (die Ordinate zeigt die experimentellen ICQ Daten; die Abszisse die bei Vorliegen einer Normalverteilung erwarteten Werte) sowie der Shapiro Test gezeigt.

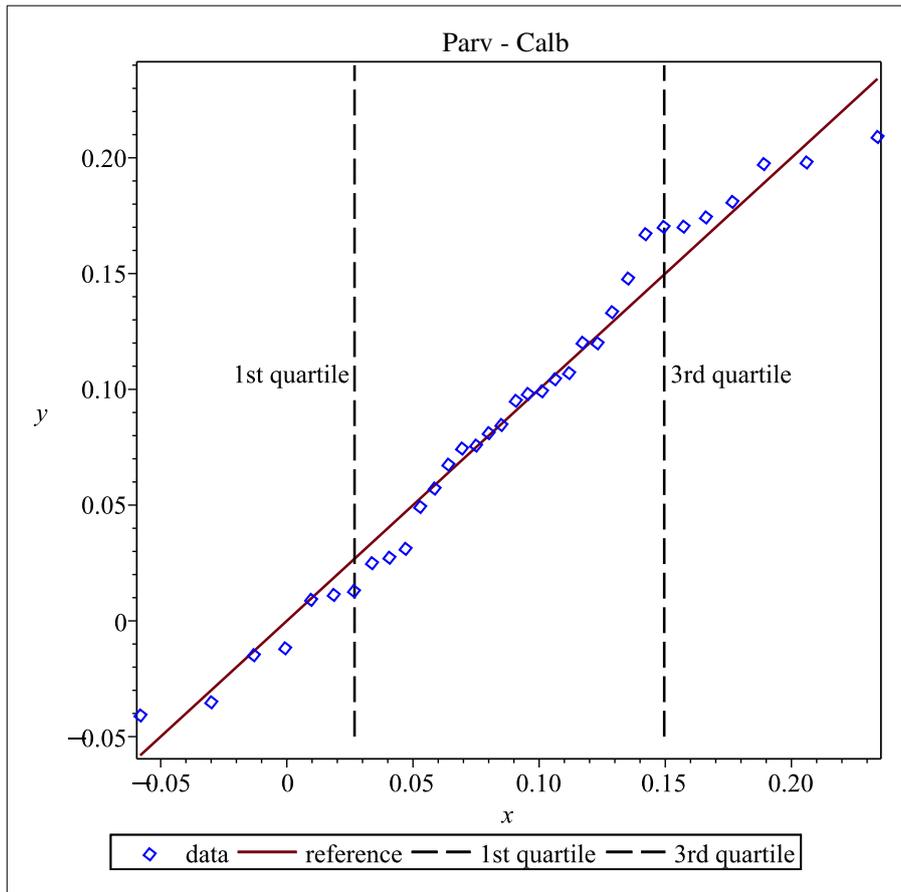


Abbildung 3.20: Normal Plot, Parvalbumin - Calbindin D-28k.

```

Shapiro and Wilk's W-Test for Normality
-----
Null Hypothesis:

Sample drawn from population that
follows a normal distribution

Alt. Hypothesis:

Sample drawn from population that
does not follow a normal distribution

Sample size:                34
Computed Statistics:         0.96014
Computed pvalue:            0.303363
Result: [Accepted]
This statistical test does not provide enough evidence
to conclude that the null hypothesis is false
    
```

Abbildung 3.21: Ergebnisse des Shapiro-Tests, Parvalbumin - Calbindin D-28k.

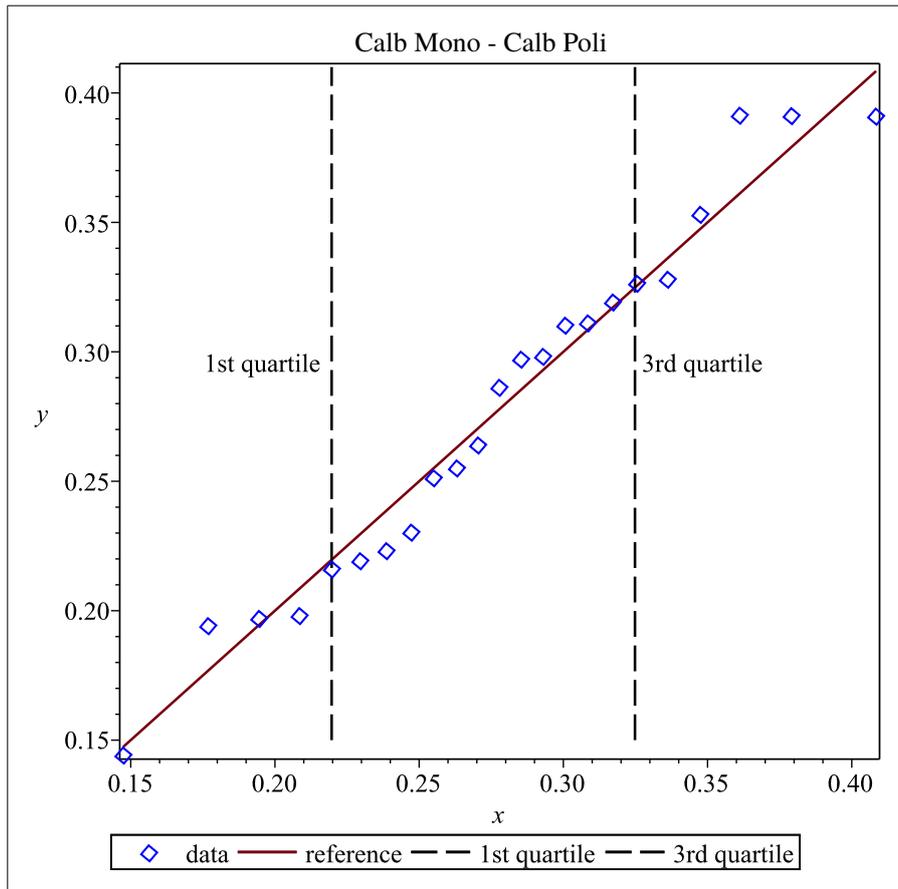


Abbildung 3.22: Normal Plot, monoklonales Calbindin D-28k - polyklonales Calbindin D-28k.

```

Shapiro and Wilk's W-Test for Normality
-----
Null Hypothesis:

Sample drawn from population that
follows a normal distribution

Alt. Hypothesis:

Sample drawn from population that
does not follow a normal distribution

Sample size:                23
Computed Statistics:        0.96192
Computed pvalue:           0.502587
Result: [Accepted]
This statistical test does not provide enough evidence
to conclude that the null hypothesis is false

```

Abbildung 3.23: Ergebnisse des Shapiro-Tests, monoklonales Calbindin D-28k - polyklonales Calbindin D-28k.

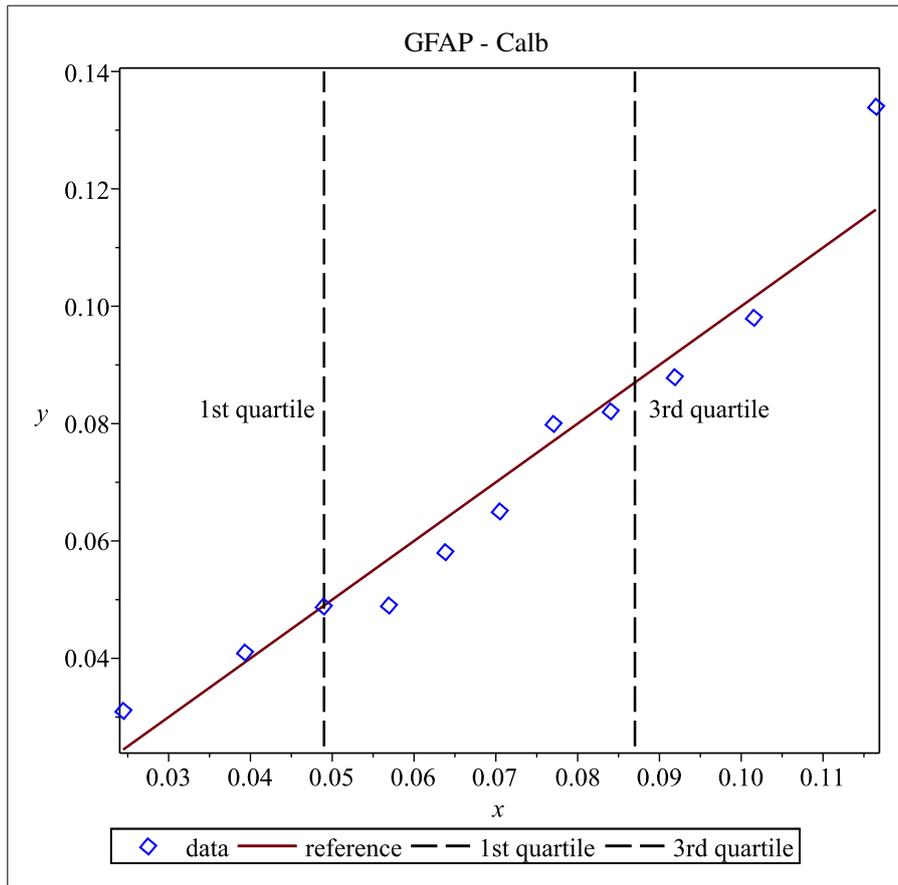


Abbildung 3.24: Normal Plot, GFAP - Calbindin D-28k.

```

Shapiro and Wilk's W-Test for Normality
-----
Null Hypothesis:

Sample drawn from population that
follows a normal distribution

Alt. Hypothesis:

Sample drawn from population that
does not follow a normal distribution

Sample size:                11
Computed Statistics:        0.948253
Computed pvalue:           0.599305
Result: [Accepted]
This statistical test does not provide enough evidence
to conclude that the null hypothesis is false

```

Abbildung 3.25: Ergebnisse des Shapiro-Tests, GFAP - Calbindin D-28k.

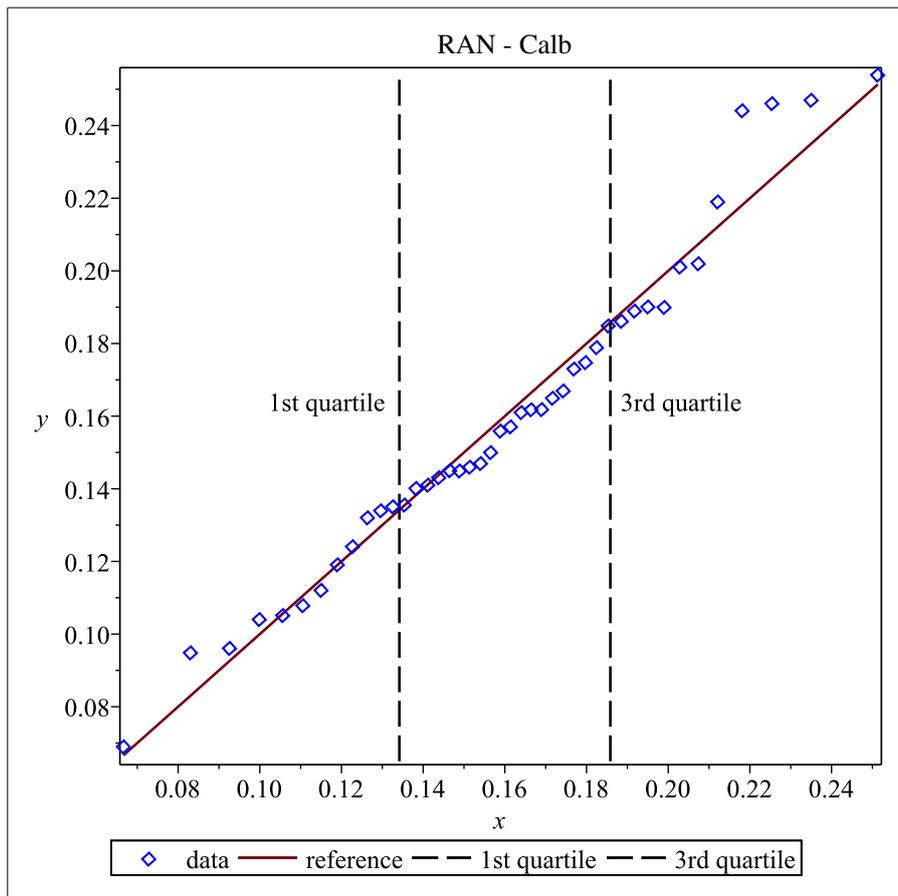


Abbildung 3.26: Normal Plot, RanBPM - Calbindin D-28k.

```

Shapiro and Wilk's W-Test for Normality
-----
Null Hypothesis:

Sample drawn from population that
follows a normal distribution

Alt. Hypothesis:

Sample drawn from population that
does not follow a normal distribution

Sample size:                43
Computed Statistics:        0.965969
Computed pvalue:           0.330569
Result: [Accepted]
This statistical test does not provide enough evidence
to conclude that the null hypothesis is false

```

Abbildung 3.27: Ergebnisse des Shapiro-Tests, RanBPM - Calbindin D-28k.

Schlussfolgerung dieser Analyse ist, dass die Sets von ICQ-Daten zu den unterschiedlichen Kontroll- oder Experimentalsituationen in sich als normalverteilt betrachtet werden können.

### 3.2.5 Inferenzstatistische Analyse über die Vergleichbarkeit der Mittelwerte

#### 3.2.5.1 Der Student-T-Test

Der Student-t-Test untersucht die Richtigkeit zweier Hypothesen: Die erste Hypothese ist die sogenannte Nullhypothese  $H_0$ , die zweite ist die Alternativhypothese  $H_1$ . Der Test liefert auch ein Konfidenzintervall, anhand dessen die statistische Signifikanz der Testhypothesen überprüft werden kann. Weil die Varianz der Datenpopulationen nicht a priori bekannt ist, muss der Test anhand einer Student-Verteilung durchgeführt werden. Wie aus der oben wiedergegebenen Tabelle 3.2 zu entnehmen ist, variieren die Varianzen der Datenpopulationen nicht maßgeblich. Nach Bestimmung der Freiheitsgrade konnten die Grenzen der kritischen Region für die Annahme/Ablehnung der Nullhypothese festgelegt werden. Der Student-t-Test wurde zuerst gemäß den Formeln durchgeführt, die in der statistischen Literatur beschrieben sind (s.u.). In einem zweiten Schritt wurde zur Bestätigung die Softwareapplikation TwoSampleTT angewendet.

#### 3.2.5.2 Test über die Mittelwerte der normalverteilten ICQ-Werte: RanBPM-Calbindin D-28k vs. GFAP-Calbindin D-28k

$$\nu = n_1 + n_2 - 2;$$

$$S_p^2 = \frac{(n_1 - 1) S_1^2 + (n_2 - 1) S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}; \quad (3.1)$$

$$t_0 = \frac{\bar{y}_1 - \bar{y}_2}{S_p \cdot \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}.$$

(Diese und folgende Formeln stammen aus [15].)

Die bezeichneten Parameter sind in Tabelle 3.3 erläutert. Wobei alle Größen mit dem Zeichen 1 sich auf RanBPM-Calbindin D-28k und diejenigen mit dem Zeichen 2 sich auf GFAP-Calbindin D-28k beziehen. Wie oben schon erklärt, ist die Varianz unbekannt und als gleich zwischen den beiden.

Relevante Größen		
Beschreibung der Größen	Symbol	Wert
Größe Population 1	$n_1$	43
Größe Population 2	$n_2$	11
Freiheitsgrade	$\nu$	52
Schätzung des Mittelwerts für Population 1	$\bar{y}_1$	0.158
Schätzung des Mittelwerts für Population 2	$\bar{y}_2$	0.070
Schätzung der Varianz für Population 1	$S_1^2$	0.00185
Schätzung der Varianz für Population 2	$S_2^2$	0.00088
Schätzung der gekoppelten Varianz	$S_p^2$	0.00166
Test Statistik	$t_0$	6.413
Test Signifikanz	$\alpha$	0.05
Grenze der kritischen Region	$t_{\alpha/2,\nu}$	2.01

Tabelle 3.3: Statistische Größen und ihre Werte für den Vergleich der ICQ Wert von RanBPM-Calbindin D-28k vs. GFAP-Calbindin D-28k

Die Größe  $t_{\alpha/2,\nu}$  identifiziert die kritische Region, innerhalb derer die Nullhypothese angenommen beziehungsweise verworfen werden kann. Ihr Wert hängt von der Anzahl der Freiheitsgrade  $\nu$  sowie von der Signifikanz des Tests  $\alpha$  ab. Folgend werden die Ergebnisse des Student-t-Tests für die oben erwähnte Datenpopulation gezeigt.

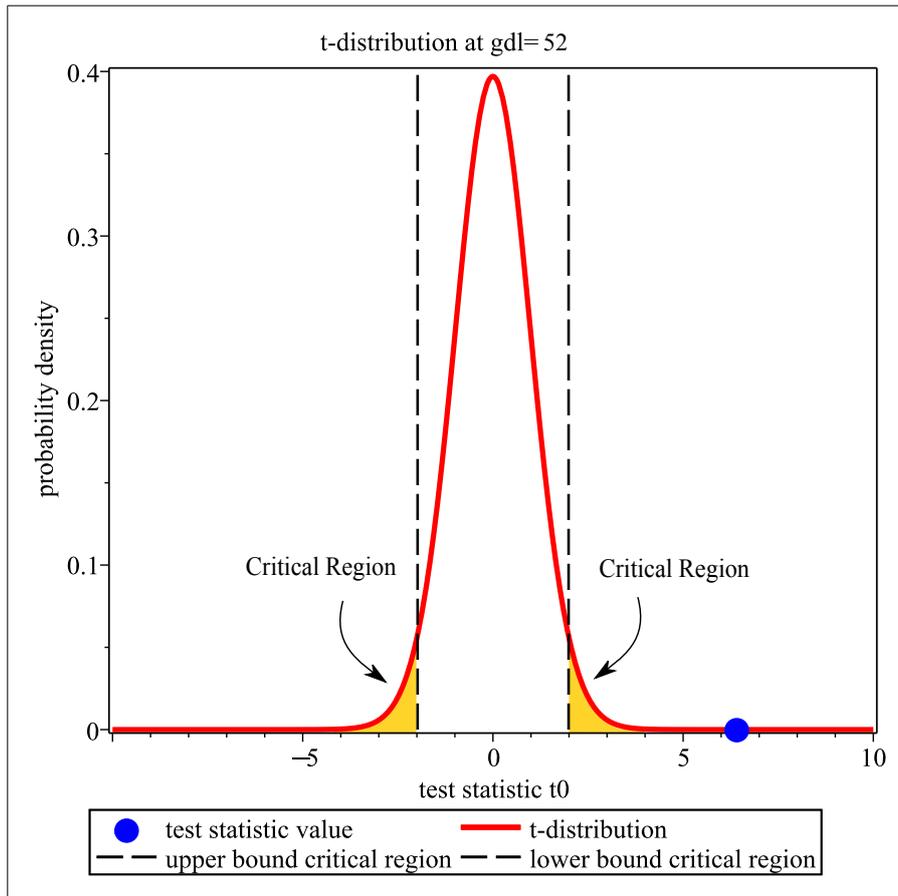


Abbildung 3.28: Graphische Interpretation des Student-T-Tests.

```

Standard T-Test on Two Samples (Equal Variances)
-----
Null Hypothesis:
Sample drawn from populations with difference on means equal to 0
follows a normal distribution

Alt. Hypothesis:
Sample drawn from populations with difference on means not equal to 0

Sample sizes:          43, 11
Sample means:          0.158, 0.070
Sample standard devs:  0.043, 0.029
Difference in means:   0.088
Distributions:         StudentT(52)
Computed Statistics:   6.4134
Computed pvalue:      4.25802e-008
Confidence interval:  0.0608..0.1162
                      (difference of population means)

Result: [Rejected]
This statistical test provide evidence that the null hypothesis is false

```

Abbildung 3.29: Ergebnisse des Student-t-Tests für den Vergleich RanBPM-Calbindin D28k vs. GFAP-Calbindin D-28k.

Als Schlussfolgerung ergibt sich, dass die ICQs aus der ICA für RanBPM-Calbindin D-28k und GFAP-Calbindin D-28k, d.h. zwischen Experimentalsituation und einer Negativkontrolle, auf dem gewählten Signifikanzniveau von 5%, signifikant unterschiedlich sind. Konsistent mit einer abhängigen Verteilung sind die ICQs für RanPBM-Calbindin D-28k positiv und deutlich größer als diejenigen für GFAP-Calbindin D28k. Gründe, warum letztere nicht negative ICQ-Werte liefert, wie für eine segregierte Verteilung erwartet, werden in der Diskussion angesprochen.

### 3.2.5.3 Test über die Mittelwerte der normalverteilten ICQ-Werte: RanBPM-Calbindin D-28k vs. Calbindin D-28k Monoklonal - Polyklonal

Die Formeln sind oben angegeben, die Parameter und Werte für diese Situation folgen in Tabelle 3.4. Alle Größen mit dem Index 1 sich auf die Werte aus der ICA von RanBPM-Calbindin D-28k und diejenigen mit dem Index 2 auf diejenigen aus der ICA zu Calbindin D-28k monoklonal-polyklonal.

Relevante Größen		
Beschreibung der Größen	Symbol	Wert
Größe Population 1	$n_1$	43
Größe Population 2	$n_2$	23
Freiheitsgrade	$\nu$	64
Schätzung des Mittelwerts für Population 1	$\bar{y}_1$	0.158
Schätzung des Mittelwerts für Population 2	$\bar{y}_2$	0.277
Schätzung der Varianz für Population 1	$S_1^2$	0.00185
Schätzung der Varianz für Population 2	$S_2^2$	0.00479
Schätzung der gekoppelten Varianz	$S_p^2$	0.00286
Test Statistik	$t_0$	-8.601
Test Signifikanz	$\alpha$	0.05
Grenze der kritischen Region	$t_{\alpha/2, \nu}$	2

Tabelle 3.4: Statistische Größen und ihre Werte für den Vergleich der ICQs von RanBPM-Calbindin D-28k vs. Calbindin D-28k monoclonal-polyklonal

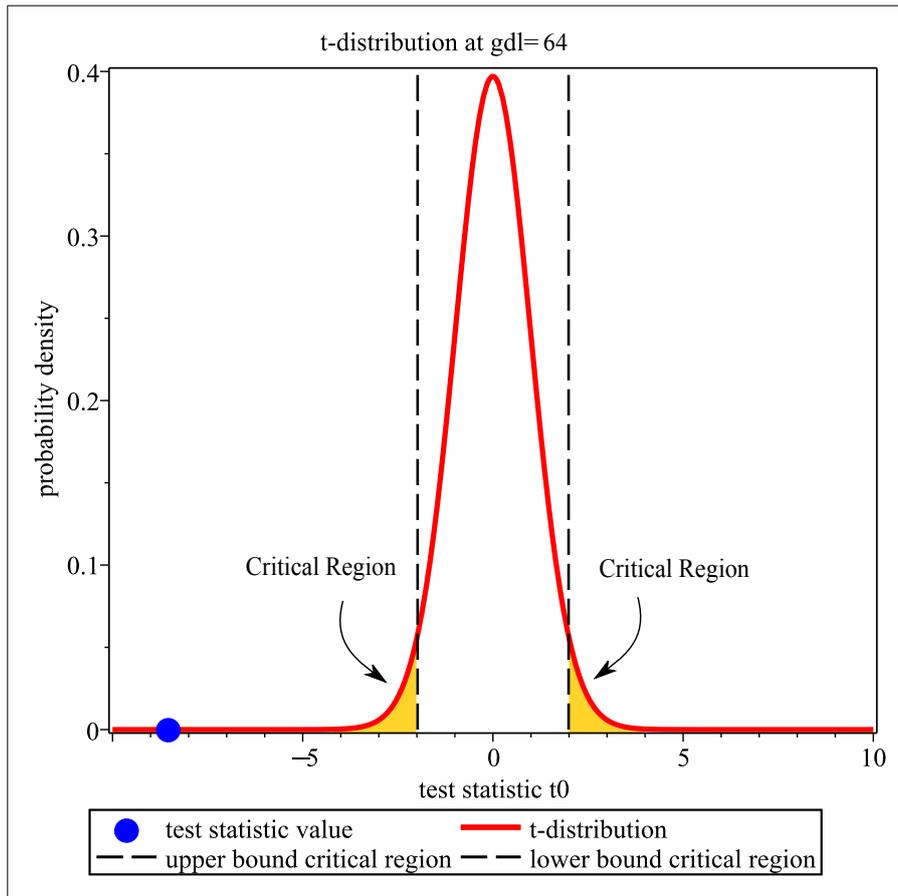


Abbildung 3.30: Graphische Interpretation des Student-T-Tests

```

Standard T-Test on Two Samples (Equal Variances)
-----
Null Hypothesis:
Sample drawn from populations with difference on means equal to 0
follows a normal distribution

Alt. Hypothesis:
Sample drawn from populations with difference on means not equal to 0

Sample sizes:           43, 23
Sample means:          0.158, 0.277
Sample standard devs:  0.043, 0.069
Difference in means:   -0.118
Distributions:         StudentT(64)
Computed Statistics:   -8.6017
Computed pvalue:      2.81575e-012
Confidence interval:  -0.1465..-0.0913
                      (difference of population means)

Result: [Rejected]
This statistical test provide evidence that the null hypothesis is false
  
```

Abbildung 3.31: Ergebnisse des Student-t-Tests für den Vergleich RanBPM-Calbindin D28k vs. Calbindin D-28k monoklonal-polyklonal.

Damit ergibt sich, dass die ICQs aus der ICA für RanBPM-Calbindin D-28k und Calbindin D-28k monoklonal-polyklonal, d.h. zwischen Experimentalsituation und einer Positivkontrolle, auf dem gewählten Signifikanzniveau von 5%, signifikant unterschiedlich sind. Wie erwartet sind die Mittelwer-

te beider Populationen größer als 0. Mögliche Gründe für den signifikanten Unterschied werden in der Diskussion angesprochen.

### 3.2.5.4 Test über die Mittelwerte der normalverteilten ICQ-Werte: RanBPM-Calbindin D-28k vs. Parvalbumin-Calbindin D-28k

Parameter und Werte für diese Situation folgen in Tabelle 3.5. Alle Größen mit dem Index 1 beziehen sich auf die ICQ-Werte aus der ICA von RanBPM-Calbindin D-28k und diejenigen mit dem Index 2 auf diejenigen zu Parvalbumin-Calbindin D-28k.

Relevante Größen		
Beschreibung der Größen	Symbol	Wert
Größe Population 1	$n_1$	43
Größe Population 2	$n_2$	34
Freiheitsgrade	$\nu$	75
Schätzung des Mittelwerts für Population 1	$\bar{y}_1$	0.158
Schätzung des Mittelwerts für Population 2	$\bar{y}_2$	0.088
Schätzung der Varianz für Population 1	$S_1^2$	0.00185
Schätzung der Varianz für Population 2	$S_2^2$	0.00507
Schätzung der gekoppelten Varianz	$S_p^2$	0.00327
Test Statistik	$t_0$	5.405
Test Signifikanz	$\alpha$	0.05
Grenze der kritischen Region	$t_{\alpha/2, \nu}$	1.99

Tabelle 3.5: Statistische Größen und ihre Werte für den Vergleich der ICQs von RanBPM-Calbindin D-28k vs. Parvalbumin-Calbindin D-28k

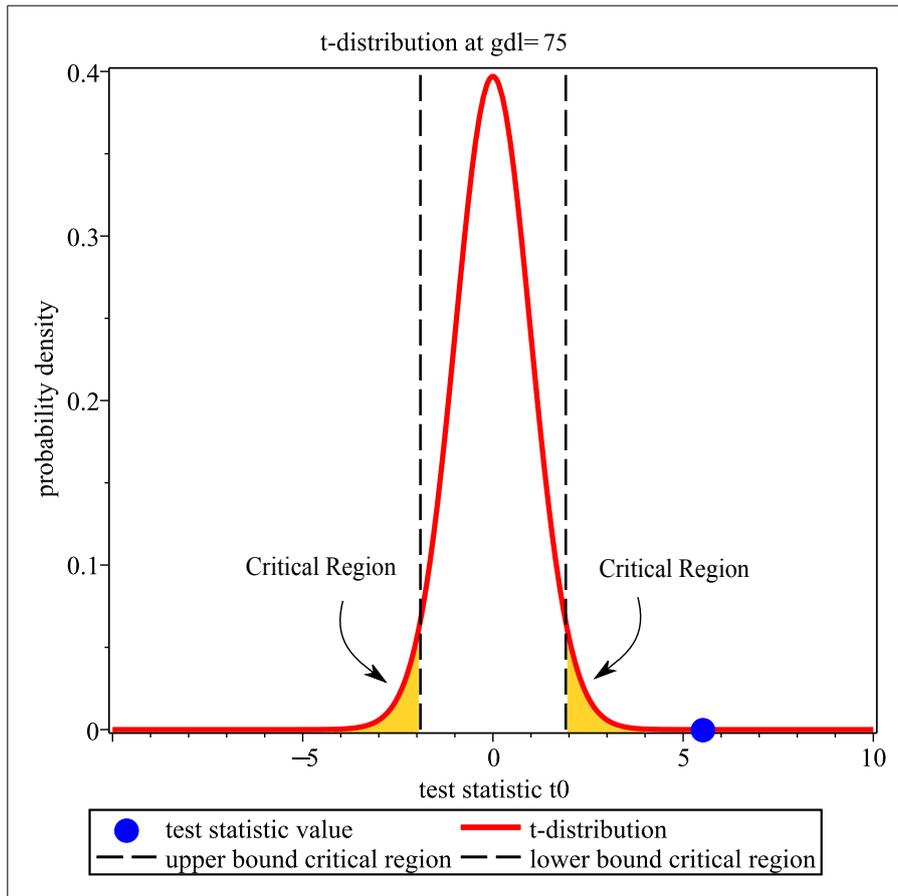


Abbildung 3.32: Graphische Interpretation des Student-T-Tests

```

Standard T-Test on Two Samples (Equal Variances)
-----
Null Hypothesis:
Sample drawn from populations with difference on means equal to 0
Alt. Hypothesis:
Sample drawn from populations with difference on means not equal to 0

Sample sizes:          43, 34
Sample means:          0.158, 0.088
Sample standard devs:  0.043, 0.0712
Difference in means:   0.070
Distributions:         StudentT(75)
Computed Statistics:   5.4054
Computed pvalue:       7.36884e-007
Confidence interval:   0.0448..0.0971
                        (difference of population means)

Result: [Rejected]
This statistical test provide evidence that the null hypothesis is false

```

Abbildung 3.33: Ergebnisse des Student-t-Tests für den Vergleich RanBPM-Calbindin D28k vs. Parvalbumin-Calbindin D-28k

Somit ergibt sich, dass die ICQs aus der ICA für RanBPM-Calbindin D-28k und Parvalbumin-Calbindin D-28k, d.h. zwischen Experimentalsituation und einer weiteren Negativkontrolle, auf dem gewählten Signifikanzniveau von 5%, signifikant unterschiedlich sind.

### 3.2.5.5 Einseitiger Student-T-Test: Vergleich zwischen Mittelwert von ICQ-Werten aus Daten einer Subpopulation von RanBPM-Calbindin D-28k und gegebenem Mittelwert von 0.1

Für die Experimentalsituation RanBPM-Calbindin D-28k wurde des Weiteren untersucht, ob der Mittelwert dieser ICQ-Werte größer als 0.1 ist. Nullhypothese ist also, dass die Werte aus einer Gesamtpopulation stammen, deren Mittelwert größer als 0.1 ist

$$\nu = n - 1$$

$$t_0 = \frac{\bar{y} - \mu_0}{\frac{S}{\sqrt{n}}} \quad (3.2)$$

Relevante Größen		
Beschreibung der Größen	Symbol	Wert
Größe Population	$n$	43
Freiheitsgrade	$\nu$	42
Mittelwert bekannter Population	$\mu_0$	0.1
Schätzung des Mittelwerts für Population	$\bar{y}$	0.158
Schätzung der Standardabweichung für Population	$S$	0.043
Test Statistik	$t_0$	8.978
Test Signifikanz	$\alpha$	0.05
Grenze der kritischen Region	$t_{\alpha,\nu}$	1.684

Tabelle 3.6: Statistische Größen und ihre Werte für den Vergleich RanBPM-Calbindin D-28k vs. einen gegebenen Mittelwert von 0.1

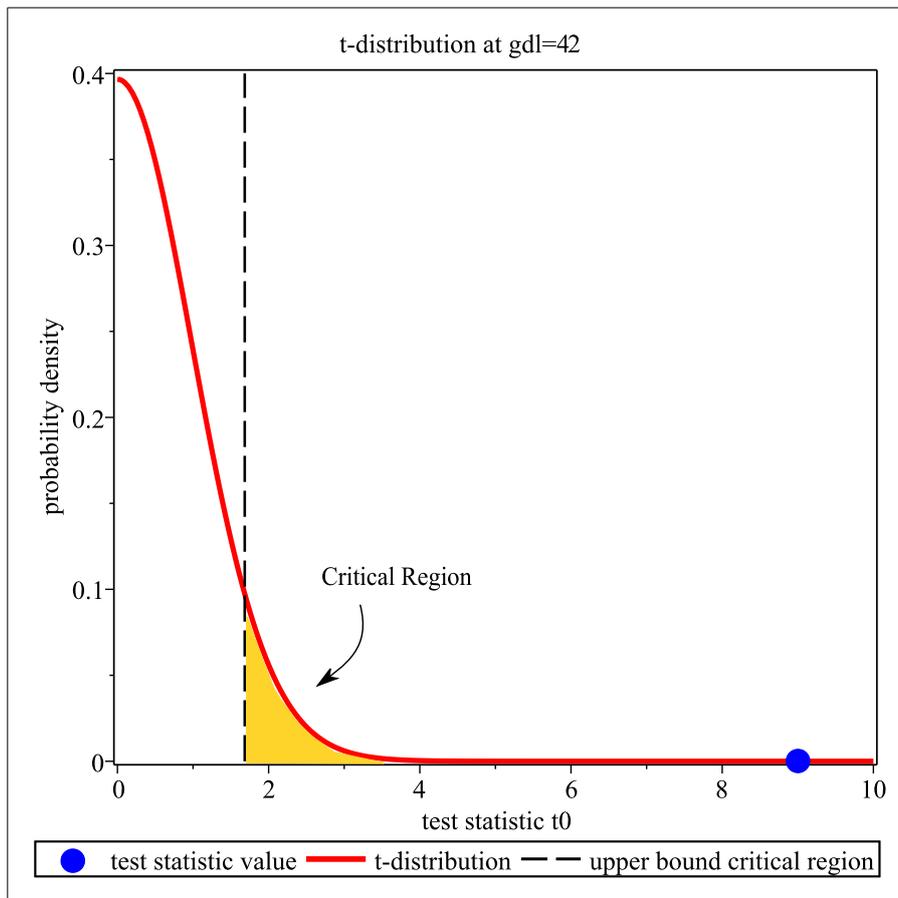


Abbildung 3.34: Graphische Interpretation des Student-T-Tests

```

Standard T-Test on One Sample
-----
Null Hypothesis:
Sample drawn from population with mean greater than 0.1
Alt. Hypothesis:
Sample drawn from population with mean less than 0.1

Sample size:                43
Sample mean:                0.158
Sample standard dev:       0.043
Distributions:              StudentT(42)
Computed Statistics:        8.97891
Computed pvalue:           1
Confidence interval:       -infinity.. .17002

Result: [Accepted]
This statistical test does not provide enough evidence
to conclude that the null hypothesis is false

```

Abbildung 3.35: Ergebnisse des einseitigen Student-t-Tests für den Vergleich RanBPM-Calbindin D28k vs. Mittelwert von 0.1

Diese Nullhypothese kann auf dem gewählten Signifikanzniveau nicht abgelehnt werden. Das bedeutet allerdings nicht, dass sie zutreffend ist.

# Kapitel 4

## Diskussion

Ausgangsfrage dieser Arbeit war, ob die mittels biochemischer Methoden *in vitro* festgestellte Interaktion von Calbindin D-28k und RanBPM auch in intakten Zellen, *in situ*, stattfindet. Diese Frage nach der physiologischen Bedeutung einer biochemisch nachgewiesenen Interaktion ist von allgemeinem Interesse. Sie ist einerseits inhaltlich mit Bezug auf die Funktion vieler Proteine wichtig. Das hier gewählte Beispiel Calbindin D-28k ist in diesem Zusammenhang interessant, weil bisher wenig über seine physiologische Funktion bekannt ist und unklar ist, wie dieses Wenige die hohe evolutionäre Konservierung des Proteins erklären kann. In den letzten Jahren wurden zunehmend Interaktionspartner des Calbindin D-28k beschrieben, die seine Funktion auch als Calciumsensor nahelegen.[41] Eine solche Funktion des Calbindin D-28k in wichtigen zellulären Signaltransduktionskaskaden könnte zur evolutionären Stabilität seiner Primärsequenz beitragen.

Andererseits stellt sich in der Frage nach dem *in situ* Nachweis einer Interaktion nativer Moleküle ein schwieriges methodisches Problem. Vor der weiteren Diskussion soll klargestellt werden, was mit dem verwendeten Begriffen gemeint ist: *in situ* wird verwendet für in ganzen, lebenden oder fixierten Zellen; Interaktion meint chemische Prozesse, die sich als räumliche Nähe der Interaktionspartner im Sinne der Abstände üblicher chemischer Wechselwirkungen ausdrückt; *nativ* meint endogen unverändert. Außer für Spezialfälle gibt es gegenwärtig keine Methoden, welche den Nachweis von Interaktionen *in situ* in nativen Geweben oder Zellen erlauben. Kryo-Elektronentomographie kann dieses Problem für sehr große, isoliert liegende Proteine und Proteinkomplexe lösen. Die kürzlich publizierte Arbeit von Fukuda et al. welche die Interaktion der Tripeptidyl-Dipeptidase (vorkommend als ca. 6 MDa großer Komplex) mit dem 26S-Proteasom (Proteinkomplex von ca. 2.5 MDa) in hippocampalen Neuronen zeigt, ist ein eindruckliches Beispiel für einen solchen Sonderfall [20]. Für kleine Proteine wie Calbindin D-28k und RanBPM (beide < 100 kDa) sind diese Methode bisher nicht anwendbar. Viele Interaktionen werden lichtmikroskopisch mittels verschiedener Variante des Förster-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) untersucht.[5],[49] Dabei wird ein physikalisch-chemisches Phänomen genutzt, das nur über kurze Distanzen, im Bereich des oben für Interaktion definierten, auftritt. FRET kann in ganzen, lebenden oder fixierten, Zellen untersucht werden. Allerdings ist es in der Regel nicht möglich, die endogenen Proteine zu untersuchen, da beide Interaktionspartner in spezifischer Weise fluoreszent sein müssen. Solche Experimente nutzen typischerweise die Expression genetisch zur Fluoreszenz modifizierter Proteine. Anwendung des FRET für die vorliegende Fragestellung hätte vorausgesetzt, dass man passend, im Sinne eines FRET-Paares, modifiziertes Calbindin D-28k und RanBPM in Purkinjezellen des Kleinhirnes entweder in transgenen Tierlinien oder nach *in vivo* Gentransfer in das Gehirn untersucht. Die Beobachtung der Interaktion der endogenen, nativen Proteine ist nicht möglich. Analoge Einschränkungen betreffen auch Verfahren der Fluoreszenz-Correlations-Spektroskopie (FCS) und verwandter Methodiken.[29],[70] Lichtmikroskopisch bleiben Verfahren der Kolokalisationsanalyse. Diese reichen von rein subjektiven Beurteilungen bis zu verschiedenen korrelativen Verfahren.[7] Von letzteren wurde die Image-Correlation-Analysis (ICA) [39] für diese Arbeit ausgewählt, da sie einige Probleme anderer korrelativer Verfahren (bspw. Manders-Koeffizienten)[7],[36] vermeidet und eine einfache und statistisch robuste Interpretation verspricht.[39] Alle diese Verfahren, einschließlich der ICA, können zumindest in fixierten Zellen und Geweben auf die endogenen nativen Proteine (bspw. sichtbar gemacht mittels Immunfärbung) angewandt werden. Die Auflösung der verwendeten lichtmikroskopischen Verfahren ist allerdings zu gering, um Interaktion wie oben definiert nachzuweisen. Korrelative Kolokalisation nachgewiesen mittels solcher Methodik ist mithin eher eine notwendige, aber nicht eine hinreichende, Bedingung für den Nachweis von Interaktion im obigen Sinne. Dennoch ist ein solcher Nachweis ein wichtiger Schritt in Richtung Verständnis der physiologischen Bedeutung einer bio-

chemisch gezeigten Interaktion.

Die folgende Diskussion ist einerseits methodenorientiert und versucht, die einzelnen experimentellen Varianten kritisch im Hinblick auf das Ziel der Arbeit zu erörtern. Interessante Einzelbefunde zu den untersuchten Proteinen, die über bisher Bekanntes hinausgehen, oder Publiziertes bestätigen oder nicht mit diesem konform sind, werden an passender Stelle integriert.

## 4.1 Spezifität der eingesetzten Antikörper und Immundetektion

Spezifität und Sensitivität der Detektion der beiden Interaktionspartner sind grundlegend für die möglichen Schlussfolgerungen. Die Sensitivität wird in den folgenden Abschnitten genauer erörtert, hier geht es zunächst um die Spezifität der eingesetzten Antikörper und der indirekten Immunfluoreszenz. Für den Nachweis von Calbindin D-28k wurden zwei sehr lange bekannte und gut charakterisierte Antikörper eingesetzt, an deren Spezifität sowohl in der Immunfärbung als auch im Westernblot weder in der Literatur noch in den Erfahrungen vieler diese Antikörper nutzenden Laboratorien Zweifel bestehen. Auch die Arbeitsgruppe, in welcher diese Arbeit entstanden ist, arbeitet seit Jahrzehnten mit diesen Antikörpern und kommt zu derselben Schlussfolgerung. Unter bestimmten Bedingungen wurde in der Vergangenheit Kreuzreaktivität zwischen Antikörpern gegen Calbindin D-28k und Calretinin berichtet; ein Befund, der theoretisch nicht unerwartet ist, da beide Proteine ähnlichen Aufbau (6 EF-Hand Motive) und ähnliche Größe haben, von einem gemeinsamen Vorläufer stammen und ca. 30-40% Homologie aufweisen. So ist unter Bedingungen der Sättigung mit Calciumionen Calbindin D-28k in Purkinjezellen von Mäusen, welche Calretinin nullmutant sind, mittels indirekter Immunfluoreszenz mit Calretinin-Antikörpern nachweisbar.[57] Diese Kreuzreaktivität wird in wildtyp Mäusen nicht beobachtet. Für die vorliegende Untersuchung relevanter ist eine geringe Kreuzreaktivität gegen Calretinin, welche für den eingesetzten polyklonalen Antikörper gegen Calbindin D-28k berichtet worden ist ([https://www.swant.com/pdfs/Rabbit\\_anti\\_calbindin\\_D-28k\\_CB38.pdf](https://www.swant.com/pdfs/Rabbit_anti_calbindin_D-28k_CB38.pdf), abgerufen 03. 2017). Verschiedene Gründe sprechen dafür, dass diese geringe Kreuzreaktivität für die vorliegende Arbeit irrelevant ist. Zum einen wurde die Verdünnung dieses Antikörpers austitriert, so dass Körnerzellen (welche im Kleinhirn der wildtyp Maus Calretinin enthalten) nicht gefärbt werden. Zum anderen zeigt die gesamte umfangreiche bisherige Literatur, dass die Purkinjezellen von allen bisher untersuchten Säugetierspezies Calretinin nicht exprimieren.[8] Aus der Arbeit der Arbeitsgruppe ist auch bekannt, dass beide eingesetzten Calbindin D-28k Antikörper in Geweben Calbindin D-28k nullmutanter Mäuse keine spezifischen Signale generieren,[59] so dass Kontrollen an solchen Geweben im Rahmen dieser Arbeit nicht wiederholt wurden. Kompetitionsversuche mit Antigen wurden daher nicht durchgeführt. Die einfachen Färbekontrollen (Auslassen des Primärantikörpers) waren darüber hinaus immer negativ.

Schwieriger ist die Situation bezüglich der Antikörper gegen RanBPM. Unsicherheit entsteht schon mit den ersten Publikationen zu diesem Protein [45],[47] in welchen Antikörper gegen unterschiedliche Epitope generiert wurden, welche im Westernblot nicht einfach miteinander zu vereinbarende Signale ergaben. Offen ist auch die Frage, in welchen verschiedenen Formen (N-, C-terminal trunkiert, alternative Slicingprodukte, posttranslationale Modifikation) dieses Protein physiologisch vorkommt. Hier wäre in der Zukunft eine rigorose Analyse mittels moderner biochemischer Verfahren (bspw. Massenspektroskopie) wünschenswert. Für diese Arbeit wurden verschiedene polyklonale und ein monoklonaler Antikörper gegen RanBPM in der Immunfärbung und im Westernblot getestet. Auch wenn die Reaktivität von Antikörpern in beiden Verfahren unterschiedlich sein kann, schien eine Prüfung auch im Westernblot sinnvoll. Ein polyklonaler Antikörper aus der Ziege und zwei aus dem Kaninchen (abcam, Millipore) geben im Westernblot mit Kleinhirnllysaten weitgehend identische Muster multipler Banden. Ähnliches wurde für Lysate transfizierter Zellen beobachtet. Auffällig ist allerdings, dass in letzteren das Bandenmuster wesentlich weniger komplex ist. Weitere Anhaltspunkte für Spezifität ist das Fehlen von Signalen in nichttransfizierten Zellen. Offenbar ist die endogene Expression von RanBPM in den in dieser Arbeit eingesetzten Zelllinien und unter den verwendeten Kulturbedingungen sehr gering. Auch die Detektion vermutlich derselben Bande mittels Primärantikörper gegen RanBPM und gegen das Flag-Epitop bestätigt die Spezifität der Färbung in den Flag-RanBPM transfizierten Zellen. Der eingesetzte monoklonale RanBPM Antikörper zeigte die aus der Literatur gut bekannte prominente Bande bei ca. 95 kDa. Er konnte mangels ausreichender Verfügbarkeit allerdings nur für wenige Experimente und nicht für die ICA am Kleinhirn eingesetzt werden. Bei den Unklarheiten zu den RanBPM Isoformen (s.o.) muss auch offenbleiben, ob der Einsatz dieses Antikörpers für die Analyse vorteilhaft gewesen wäre, oder dadurch für die Interaktion relevante Isoformen unentdeckt bleiben würden. Einer der untersuchten polyklonalen Antikörper aus Kaninchen (Santa Cruz) ergab nur sehr schwache Signale und wurde daher nicht weiter eingesetzt. Irrelevante Antikörper aus Kaninchen (bspw. gegen Calbindin D-28k, Calretinin, Parvalbu-

min) zeigen unter vergleichbaren Bedingungen im Westernblot die jeweils für das betreffende Antigen spezifischen Signale und kein Muster multipler Banden. Ebenso führte Auslassen der Primärantikörper zum Fehlen aller Signale. Experimente an Geweben von RanBPM nullmutanten Tieren oder mit kompetierendem Antigen waren mangels Verfügbarkeit dieser Materialien nicht durchführbar.

Die Antikörper gegen RanBPM wurden weiter in der indirekten Immunfluoreszenz auf Geweben (s. folgende Abschnitte), in Primärkulturen und in transfizierten Zelllinien getestet. Während in den primären Hirnkulturen ähnliche Signale mit den beiden polyklonalen Kaninchenantikörpern gegen RanBPM auf Zellen erhalten wurden, die sich mittels GFAP-Doppelfärbung größtenteils als Astrozyten identifizieren ließen, überraschte der Befund, dass die in den Kulturen vorhandenen TU-20 (neuronales Tubulin III) positiven Zellen durchweg RanBPM negativ waren. Offenbar sind neuronale RanBPM Konzentrationen geringer als die in nichtneuronalen Zellen. Dieser Befund deckt sich auch mit den an Gewebe gemachten Beobachtungen (s.u.). Ein weiteres Argument für Spezifität ist die weitgehende Deckungsgleichheit von Flag – und RanBPM-Färbung in Flag-RanBPM exprimierenden Kulturen. Auch die Reproduzierbarkeit der in der Literatur solide beschriebenen submembranären Verteilung von RanBPM in MDCK Zellen [18] war mittels der für diese Arbeit eingesetzten Färbetechnik gut reproduzierbar. Auch für die Immunfluoreszenzexperimente waren Kompetitionsexperimente mangels Verfügbarkeit des Antigens nicht möglich; aus ebendiesen Gründen konnte auch nicht mit primären Hirnkulturen RanBPM nullmutanter Tiere kontrolliert werden.

Die Immunfärbungen für die ICA wurden daher mit den polyklonalen Antikörpern gegen RanBPM (abcam, Milipore) durchgeführt. Trotz der oben genannten vielfältigen Hinweise auf die Spezifität dieser Antikörper sind für die Zukunft auch die stringenten Kontrollen (nullmutante Gewebe, Kompetition) wünschenswert. Solange bleiben Vorbehalte und der Ausdruck ‚RanBPM-Signal‘ in dieser Arbeit soll vorsichtig operational verstanden werden, im Sinne: ein RanBPM-Signal ist das, was mit den genannten Antikörpern und unter den experimentellen Bedingungen dieser Arbeit detektiert wurden.

## 4.2 Sensitivität der Immunfärbung

Weder in den TU-20-positiven Zellen in primären Hirnkulturen noch in der neuronalen Zelllinie HN10e war endogenes RanBPM in der indirekten Immunfluoreszenz detektiert. Auch in konventionellen Gefrierschnitten des Mausgehirns waren keine TU-20 und RanBPM doppelpositiven Zellen sichtbar. Andererseits war RanBPM in beiden Situationen in TU-20 negativen Zellen deutlich vorhanden; ebenso war in beiden Fällen die TU-20 Färbung deutlich und soweit untersucht spezifisch (d.h. in GFAP-negativen Zellen). Weiter war endogenes RanBPM in MDCK Zellen wie in der Literatur beschrieben nachweisbar. Diese Befunde sind mit der Schlussfolgerung konsistent, dass RanBPM in Neuronen und neuronähnlichen Zellen, im Unterschied zu nichtneuronalen Zellen wie kultivierten Astrozyten und MDCK Zellen, nur sehr wenig vorhanden ist. Bevor in Abschnitt 4.5 die zur Verbesserung der Sensitivität durchgeführten Modifikationen besprochen werden, sollen hier in den nächsten beiden Abschnitten zunächst die aus diesen ersten Experimenten resultierenden interessanten Befunde dargestellt werden.

## 4.3 RanBPM in Bergmanngliazellen

Bereits die ersten Immunfärbungen mit polyklonalen Antikörpern gegen RanBPM an sagittalen Gefrierschnitten von Mauskleinhirnen zeigten längliche, faserförmige Strukturen, welche die gesamte Molekularschicht durchquerten und an der Oberfläche des Folium cerebelli endeten. Ihre palisadenartige Anordnung ließ an Fortsätze von Bergmanngliazellen denken. Diese Vermutung bestätigte sich, indem gleichartige Strukturen auch in gegen GFAP-gefärbten Kleinhirnpräparaten beobachtet wurden. Wie für die Bergmannglia charakteristisch, waren ihre Zellkörper ebenfalls GFAP-positiv und um die Zellsomata der Purkinjezellen verteilt. Endogenes RanBPM war auffallend prominent in den Fortsätzen der Bergmanngliazellen, aber auch in ihren Somata, vorhanden. Es ist bekannt, dass schon in frühen Entwicklungsphasen die Fortsätze der Bergmannglia aus den Zellsomata in der Purkinjezellschicht radial in Richtung Oberfläche sprossen, um dort in der Membrana limitans glialis superficialis zu enden.[58] Die dichte palisadenartige Anordnung der Fortsätze unterstützt die Migration der Körnerzellen und die Entwicklung der dendritischen Bäume der Purkinjezellen. Neben dem räumlichen Verhältnis zwischen den longitudinal zum Folium cerebelli verlaufenden Fortsätzen der Bergmanngliazellen und den transversal gerichteten Dendriten der Purkinjezellen sind auch funktionelle Interaktionen zwischen diesen Zellen von

Interesse.[37] Es gibt Hinweise in der Literatur, dass es in großen Netzwerken von Bergmanngliazellen zu einem koordinierten Anstieg des freien Calciums während der Ausführung motorischer Prozesse kommt, der gleichzeitig zu einer Zunahme der Blutperfusion in denselben Arealen führt. In der Entstehung und Regulierung des motorischen Verhaltens spielen auch die Purkinjezellen als einzige efferente Zellen der Kleinhirnrinde eine entscheidende Rolle; zudem ist bekannt, dass das Calbindin D-28k ein Calciumbindendes Protein ist, welches im intrazellulären Calciumstoffwechsel von zentraler Bedeutung ist.[8],[41],[59] Ob überhaupt und inwiefern Prozesse in Bergmannglia im Rahmen neuronaler motorischer Programme einen Einfluss auf die Purkinjezellen haben, ist offen. Ebenso spekulativ ist die mögliche Rolle dieser auffallend prominenten RanBPM-Spiegel in Bergmannglia. Nicht nur in den Bergmanngliazellen, sondern auch in anderen Gliazellen, konnte endogenes RanBPM detektiert werden. In den Zellkulturen aus Mausgehirn waren in den Immunfärbungen gegen RanBPM viele Zellen positiv, die aufgrund ihrer morphologischen Eigenschaften und ihrer Färbbarkeit mit GFAP-Antikörpern als Gliazellen identifiziert wurden. Dass in den Zellkulturen mehr RanBPM enthaltende Gliazellen als Neuronen beobachtet wurden, liegt sicher auch an der Tatsache, dass Gliazellen in den Kulturen zahlreicher sind als Neurone und proliferieren.

## 4.4 RanBPM und Calbindin D-28k in der Retina

Wegen der schlechten Anfärbbarkeit des RanBPM in Gefrierschnitten des Kleinhirnes wurden alternative Präparate für die ICA gesucht. Die Retina wurde ausgewählt, weil im Literaturstudium zu Beginn dieser Arbeit auffiel, dass unterschiedliche Arbeitsgruppen ähnliche Färbemuster von RanBPM und Calbindin D-28k in der Retina der Maus publiziert hatten. Aus der Arbeit von Seebahn et. al. ist bekannt, dass endogenes RanBPM in horizontalen Banden in der inneren plexiformen Schicht vorkommt.[18] Dieser Befund wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt und ausgeweitet. RanBPM scheint in der Netzhaut nicht im Zellkern vorzukommen, sondern ausschließlich zytosolisch und innerhalb der Zellmembranen lokalisiert zu sein. Wie weiter oben bezüglich der Isoformen und Modifikationen dieses Proteins verschiedentlich angesprochen, ist unklar worauf diese differenzierte intrazelluläre Verteilung beruht. Da RanBPM als Interaktionspartner einer Vielzahl von Proteinen fungiert, besteht die Möglichkeit, dass das unterschiedliche intrazelluläre Vorkommen nicht nur vom RanBPM an sich, sondern möglicherweise auch von Interaktionspartnern, die selbst unterschiedliche intrazelluläre Lokalisationen aufweisen, abhängt. In der Retina könnten metabotrope Glutamatrezeptoren hier eine Rolle spielen.[18] Von Calbindin D-28k ist bekannt, dass es ebenfalls in der inneren plexiformen Schicht exprimiert ist.[43] Somit war die Netzhaut das optimale Organ, um nicht nur die beiden Proteine einzeln, sondern auch eine mögliche Kolokalisation zwischen den beiden zu untersuchen. Einzelfärbungen mit poly- und monoklonalen Antikörpern gegen Calbindin D-28k bestätigten die Befunde von Wassle et al.[43] Die Betrachtung von Calbindin D-28k- und RanBPM- doppeltgefärbten Präparate am Epifluoreszenzmikroskop und in der konfokalen Mikroskopie war sehr eindrucklich. Es gab in der inneren plexiformen Schicht eindeutig doppeltgefärbte Strukturen, deren Intensitätsfärbeprofile in beiden Kanälen recht kongruent und homogen variierten. Dieser Befund zur Kolokalisation von Calbindin D-28k und RanBPM in der Retina ist neu und bisher nicht beschrieben. Er ist sicher ein weiterer, interessanter zukünftiger Ansatzpunkt für die Frage, ob RanBPM in situ mit Calbindin D-28k interagiert und welche physiologische Rolle diese Interaktion spielt. Mit dem Befund von Seebahn et al.[60], dass RanBPM in der Retina biochemisch mit Typ II metabotropen Glutamatrezeptoren interagiert und mikroskopisch diese beiden Proteine in den oben genannten Strukturen co-lokalisiert sind, ergibt sich die attraktive, und experimentell prüfbare Hypothese, dass Calbindin D-28k in einem Komplex mit solchen Rezeptoren vorkommt, der durch RanBPM organisiert wird. Dass RanBPM als eine Komponente sehr großer Proteinkomplexe vorliegen kann, ist in anderem Zusammenhang in der Literatur beschrieben.[32] Für diese Arbeit wurde die ursprüngliche Frage nach der Kolokalisation zwischen RanBPM und Calbindin D-28k im Kleinhirn aber noch nicht aufgegeben. Es wurde zunächst die Herausforderung angenommen, durch Variation der Färbemethodik eine ausreichend sensitive Detektion von RanBPM in Purkinjezellen zu erreichen.

## 4.5 Der Einsatz von free-floating sections

Wie bereits erwähnt waren in den konventionellen Gefrierschnitten die Purkinjezellen beim Einsatz der polyklonalen Antikörper gegen RanBPM nur sehr schwach gefärbt, vor allem im Vergleich zu den Färbungen mit den poly- und monoklonalen Antikörpern gegen Calbindin D-28k, in denen die Purkin-

jezellen, selbst bei hohen Antikörperverdünnungen, ein sehr starkes Signal ausstrahlten. Dieses Problem ließ sich auch durch Wechsel von einem Fluorochrom-markierten Sekundärantikörper zu einer Biotin-Streptavidin-Detektion nicht beheben. Daher wurde nach alternativen Färbemethoden gesucht. Die Verwendung von 25  $\mu\text{m}$  dicken *free-floating* Schnitten resultierte in einer deutlichen Färbung. Neben den bereits beschriebenen Bergmanngliazellen traten nun auch Purkinjezellen eindeutig hervor. Somit konnten wir mit dieser optimierten Methode die Anwesenheit von endogenem RanBPM auch in diesen Zellen nachweisen. Im Soma der Purkinjezellen war RanBPM vor allem zytoplasmisch und auch im Bereich der Zellkerne vorhanden. Der Zellkern zeigte meistens Aussparungen im Bereich der Nukleolen. Auch die dendritischen Abzweigungen bis hin zu den Dornen sowie die Axone waren klar gefärbt. Sehr ähnliche Färbungen ergaben sich mit beiden für die ICA verwendeten polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen RanBPM. Die Frage, warum diese Färbung als spezifisch und nicht als Hintergrund zu betrachten ist, ist grundsätzlich berechtigt. Für Spezifität spricht, dass (1) Signalintensitäten über Purkinjezellen bei Verwendung irrelevanter Kaninchenantikörper (bspw. gegen Calretinin oder S100) sehr viel niedriger waren, (2) die Signale sich von den durch die Calbindin D-28k-Antikörper hervorgerufenen Signalen unterscheiden (d.h. es gab keinen Crosstalk zwischen den beiden Detektionskanälen), (3) unterschiedliche polyklonale Antikörper sehr ähnliche Färbungen ergaben, (4) Detektor Gain und Laserleistung am konfokalen Mikroskop zur Sichtbarmachung der RanBPM Signale nicht exzessiv hochreguliert werden mussten, und (5) Kontrollen ohne ersten Antikörper keine Signale ergaben. Natürlich wäre, wie oben erwähnt, für weitere Kontrollen die Verfügbarkeit von Antigen zur Konkurrenz und von Geweben aus nullmutanten Mäusen wünschenswert gewesen. Es ist nicht ganz klar, worin der für diese Experimente kritische Unterschied zwischen Kryoschnitten und *free-floating* Schnitten liegt. Die Dicke beider war mit 16 bzw. 25  $\mu\text{m}$  nicht sehr verschieden. Zugänglichkeit von Reagenzien, wie Antikörpern, von beiden Seiten wird üblicherweise als ein wichtiger Vorteil der *free-floating* Technik angesehen. Einbettung in ein Kryomedium mit Einfrieren waren vorbereitende Schritte bei der Herstellung der Kryoschnitte, während die *free floating* Schnitte direkt von fixierten Gewebsblöcken angefertigt wurden. Die bei beiden Methoden angewandte Fixierung war ähnlich; allerdings folgte bei den Kryoschnitten dann die übliche, aus Gründen des Gefrierschutzes, durchgeführte Impregnation in aufsteigender Sucrose, die bei den *free-floating* Schnitten entfiel. So ist es möglich, dass eine Kombination von Sucrose, Einfrieren und schlechter Zugänglichkeit zu den wenig intensiven RanBPM Signalen in Purkinjezellen auf Kryoschnitten beigetragen hat.

## 4.6 Das konfokale Laserscanningmikroskop

Quantitative Analysen mittels des konfokalen Laserscanningmikroskopes hängen von den Einstellungen verschiedener Parameter am Gerät ab.[48] Da ohne deren vernünftige Wahl und Kenntnis eine Beurteilung der Ergebnisse nicht möglich ist, sollen diese hier kurz diskutiert werden. Die Möglichkeit einzelne Schichten eines Z-Scans zu analysieren, führte durch eine erhebliche Reduktion des Hintergrundsignals zu einer insbesondere für die RanBPM Signale notwendigen klareren Darstellung. Auch wenn zur Reduktion des Analyseaufwandes nur jeweils eine Schicht aus dem Z-Scan für die ICA verwendet wurde, wurde die Größe des konfokalen pinhole für die beiden verwendeten Kanäle mit dem Ziel optimiert, Photoneinträge aus benachbarten Schichten zu minimieren (s. Methoden). Für die ICA Analyse wurden Schichten gewählt, welche einen großen Querschnitt von Kern und Soma der Purkinjezellen zeigten, und somit etwa mittig aus den Zellen stammen. Darin liegt eine subjektive Auswahl, die, da sie immer nur an einem Kanal getroffen wurde, allerdings hinsichtlich der mittels ICA gemessenen Korrelationen nicht zu einem Bias führen kann. Die Präparate wurden mit den für die beiden Kanäle verwendeten Laserlinien sequentiell gescannt, um cross-excitation zu vermeiden. Bleed-through wurde durch geeignete Einstellung des Detektionsweges minimiert. Der Erfolg dieser Maßnahmen wurde mittels Kontrollpräparaten überprüft. So wurde die kritische Doppelfärbung von Purkinjezellen auf Calbindin D-28k und RanBPM mittels monoklonaler bzw. polyklonaler Antikörper verglichen mit einer Doppelfärbung derselben Zellen mit demselben monoklonalen Calbindin D-28k-Antikörper und einem polyklonalen Antikörper gegen Parvalbumin, das ebenfalls in Purkinjezellen vorkommt. Die Sekundärantikörper mit ihren Fluorochromen, sowie die Anregungs- und Detektionskanäle waren in beiden Situationen identisch. Dennoch ergaben sich in der ICA unterschiedliche Korrelationen und ICQ Werte (s. Ergebnisse), was bei Vorliegen von cross-excitation oder bleed-through oder anderem Crosstalk nicht zu erwarten ist. Bei der Erzeugung der konfokalen Bilder wurde in beiden Kanälen auf die Vermeidung der Übersättigung von Pixeln geachtet, da quantitative Analyse mit solchen Pixeln nicht möglich ist. Es wurde versucht, den Wertebereich der gewählten 8 Bit Kodierung möglichst vollständig zu nutzen. Dass die Verwendung einer Kodierung mit 16 Bit oder höher große Auswirkung auf die Ergebnisse der ICA hat, ist unwahrscheinlich, da es für diese

Analyse auf die Vorzeichen von Produkten von Abweichungen vom Mittelwert ankommt. Welche Maßnahmen getroffen wurden, um die besonders kritische Frage nach der Unterscheidung von Hintergrund und spezifischen Signalen zu entscheiden, wurde in den vorhergehenden Kapiteln besprochen.

## 4.7 Ergebnisse der Intensity-Correlation-Analysis (ICA)

Die quantitative ICA, welche Li et al. in ihrer Arbeit schildern,[39] ist eine Methode, welche die Korrelation der Intensität zweier Signale in mikroskopischen Bildern untersucht (s. auch Methoden, Ergebnisse). Sie erlaubt bei Anwendung auf lichtmikroskopische Daten keine direkte Aussage zur Interaktion von Molekülen im weiter oben definierten Sinne, da die Auflösung dieser Mikroskopie zu gering ist. Sie kann aber als Hinweis auf Interaktion dienen. Ebenfalls aus den genannten Gründen ist es mittels lichtmikroskopischer ICA Analyse nicht möglich, zwischen direkter Interaktion der beiden untersuchten markierten Moleküle oder indirekter, durch nicht markierte weitere Moleküle vermittelter, Interaktion der markierten Partner zu unterscheiden. Das kann vorteilhaft sein, da sich Hinweise auf größere Molekülkomplexe ergeben können, die mit anderen Verfahren der *in situ* Analyse nicht erhältlich sind. So kann mit FRET Verfahren immer nur die Interaktion der beiden markierten Partner untersucht werden. Interagieren sie vermittelt durch weitere Moleküle wird der Energietransfer in der Regel nicht möglich sein. Vorteil der ICA ist wie weiter oben dargestellt, dass sie die Analyse nativer, endogener Proteine *in situ* in Zellen erlaubt. Bei der Entwicklung dieser Methode gingen die Autoren von der Annahme aus, dass die Signale zweier interagierender Moleküle ähnlich variieren, wohingegen die Intensitäten von Signalen aus unabhängig verteilten Molekülen sich eher zufällig oder separat zueinander verhalten.

Es gibt mittlerweile eine Reihe von Arbeiten, welche diese Methode erfolgreich auf verschiedene Proteine angewandt haben. Häufig, aber nicht immer, sind in diesen Publikationen ICA Daten und die Ergebnisse der biochemischen Interaktionsanalyse *in vitro* konsistent. In der ursprünglichen Publikation,[39] in welcher diese Methode entwickelt wurde, wurde die Methode für die Analyse der Beziehung verschiedener synaptischer Proteine und Komponenten von Signaltransduktionen (Syntaxin 1/Munc 18; Syntaxin 1/Calciumkanal; alpha Untereinheiten großer G-Proteine/Syntaxin 1 oder einem Calciumkanal) eingesetzt. Interessanterweise beschreiben die Autoren auch die Situation, in welcher die Co-Immunopräzipitation eines G-Proteins mit einem Calciumkanal nicht gelingt, die ICA im Gegensatz dazu aber klar auf Komplexbildung hinweist. Li et al. interpretieren diesen Befund als den Nachweis eher niederaffiner Interaktionen,[39] welche bei der Analyse *in situ* mittels ICA, nicht aber unter den Bedingungen der Zellyse bei der Immunpräzipitation, beständig sind. Wiederum Proteine der chemischen Synapse sind Gegenstand einer weiteren Studie zur Anwendung der ICA.[30] Auch in dieser Studie deutet ICA auf eine Interaktion in einem vermutlich größeren Komplex (zwischen einem Calciumkanal und dem RIM Protein), der in der Immunpräzipitation nicht nachweisbar ist. Letzteres wird wiederum als Unbeständigkeit des Komplexes unter den Bedingungen der Immunpräzipitation interpretiert. Die 2013 erschienene Studie von Puglisi et al. nutzt ICA zur Untersuchung möglicher Interaktionen des Torsin A.[52] Torsin A ist ein Protein für welches vielfältige zelluläre Funktionen beschrieben sind, und welches über Membranproteine mit intrazellulären Membranen und dem Zytoskelett interagieren kann. In den Präsynapsen der Parallelfasern an synaptischen Dornen von Purkinjezellen deuten positive ICQ Werte (0,111 bis 0,144) auf eine Interaktion von Torsin A mit dem vesikulären Glutamatttransporter hin. Besonders interessant im Hinblick auf die vorliegende Dissertation sind die ebenfalls in dieser Studie vorgelegten Daten aus der ICA zu Torsin A und Calbindin D-28k in den Dornen von Purkinjezellen. Auch hier werden positive ICQ Werte im Bereich von 0.140 bis 0.261 berichtet. Als Negativkontrolle wird die Beziehung zwischen präsynaptischem vesikulären Glutamatttransporter und nur postsynaptisch in der Purkinjezelle vorkommendem Calbindin D-28k analysiert. Hier ergeben sich die aufgrund der Theorie der ICA erwarteten negativen ICQ Werte (im Bereich von -0.1). Mithin gibt es in der Literatur mittlerweile Beispiele für ICA Analysen, die teilweise konsistent sind mit anderen Daten aus dem jeweiligen Feld, und darüber hinaus Hinweise auf Komplexe geben, die möglicherweise *in vitro* wenig stabil sind. Diese Beispiele betreffen häufig wenig mobile Proteine (wie die o.g. synaptischen Proteine, und Torsin A), aber mit Calbindin D-28k auch ein Protein, das als recht frei beweglich in Nervenzellen (Zytosol, Kern, Dendriten, Axone) gilt.

Bevor auf die eigenen Befunde zur ICA von Calbindin D-28k und RanBPM eingegangen werden wird, soll noch auf eine Annahme oder Voraussetzung der Methode hingewiesen werden, die so in der Literatur bisher nicht diskutiert wurde. Das mag damit zusammenhängen, das meistens nicht frei mobile Interaktionspartner untersucht worden sind.

Ausgehend von der Lichtmikroskopie stelle man sich das Soma einer Zelle als annähernd zusammengesetzt aus einzelnen Raumelementen, Voxel, vor, deren Dimensionen von der Auflösung bestimmt sind. Jedes Vo-

xel enthält auch Bereiche, die für im Zytosol frei bewegliche Proteine nicht zugänglich sind. So werden bspw. intrazelluläre Organellen oder große Moleküle bzw. Komplexe von Molekülen das durch Diffusion erreichbare Volumen in jedem Voxel unterschiedlich stark einschränken. Betrachtet man nun beispielhaft ein Voxel, in welchem 50%, und ein anderes, in welchem 90% des Raumes durch Diffusion zugänglich sind. Eine frei diffundierende Substanz würde sich so verteilen, dass sich in den durch freie Diffusion erreichbaren Kompartimenten dieselbe Stoffkonzentration einstellt. Mikroskopisch aber wird die absolute Stoffmenge in dem Voxel (bspw. sichtbar gemacht als Fluoreszenz in der indirekten Immunfluoreszenz) auf das gesamte Voxel, und nicht nur auf den frei zugänglichen Anteil bezogen. Daraus folgt, dass im 90% Voxel eine höhere Stoffmenge pro Voxel gemessen wird, als in dem 50% Voxel. Dasselbe gilt natürlich für jede betrachtete, frei diffundierende Substanz; mithin auch für die Situation mit zwei Proteinen, wie sie bei der ICA betrachtet wird. Nun wird der Mittelwert der im Mikroskop gemessenen Stoffmenge pro Voxel für beide Substanzen im obigen Beispiel irgendwo zwischen den beiden Extremen liegen. Und die Differenz vom Mittelwert hat in jedem Voxel für beide Substanzen dasselbe Vorzeichen. Damit ist das Produkt der Differenzen vom Mittelwert, welches die Grundlage der ICA bildet, immer positiv. ICA entsprechend der bisherigen Literatur würde also eine Abhängigkeit der Verteilung der beiden Substanzen feststellen, obwohl sie unabhängig voneinander diffundiert sind. Dieses Problem stellt sich grundsätzlich bezüglich Diffusion im dreidimensionalen Raum, aber auch bei der Diffusion in zwei Dimensionen, etwa in Membranen. Es überrascht, dass dieses Problem bisher nicht in Publikationen durchdacht ist. Tatsächlich ist es unklar, ob das Problem in realen Zellen auftritt. Theoretisch könnten die oben genannten Befunde in der Literatur, in welchen ein positiver ICQ zusammen mit einer negativen Co-Immunopräzipitation für dasselbe Proteinpaaar beschrieben wurde, auf dieses Problem zurückzuführen sein. Allerdings sind, wie erwähnt, in vielen Fällen auch die Ergebnisse der biochemischen Interaktionsanalyse und die der ICA konsistent. Auch die in dieser Arbeit vorgelegten Daten sprechen dagegen, dass die beschriebene Situation häufig auftritt. So sind die ICQ Werte bei der Betrachtung von Calbindin D-28k und Parvalbumin nahe 0.

Alle bisherige Arbeit zu diesen Proteinen legt nahe, dass beide Proteine in Purkinjezellen frei und unabhängig voneinander beweglich sind. Bestünde das oben skizzierte Problem bezüglich diese beiden Proteine, dann sollte die ICA deutlich positive ICQ Werte ergeben. Verschiedene Gründe, warum das Problem hier und anderswo nicht beobachtet wird, sind zu diskutieren. So geht die Modellbetrachtung oben davon aus, dass die Verteilung beider Proteine im Gleichgewicht ist (i.e. es verlassen pro Zeiteinheit so viele Moleküle das Voxel, wie in es hinein migrieren). Liegt kein Gleichgewicht vor (bspw. wegen Clearance Prozessen, Abbau, Sequestrierung, die schneller sind als die Synthese und Migration), werden vermutlich die Differenzen vom Mittelwert für beide Stoffe nicht immer das gleiche Vorzeichen haben. Möglicherweise ist auch der für die Bewegung der betrachteten Proteine zur Verfügung stehende Raum zwischen den verschiedenen Voxeln einer Zelle nicht so stark unterschiedlich, wie in der Modellbetrachtung angenommen. Dann wären die Differenzen vom Mittelwert sehr klein und mithin der ICQ nahe 0. Das in der Modellbetrachtung geschilderte Problem sollte für zukünftige Anwendungen der ICA genauer analysiert werden. An nativen Proteinen in situ wird das schwierig sein. Einfacher sind Modellexperimente vorstellbar, bei welchem ein artifizieller Raum mit mikroskopisch erkennbaren, für diffusible Stoffe nicht zugänglichen Bereichen mit zwei Stoffen gefüllt wird, die mit unterschiedlichen Fluorochromen markiert sind. Ein Gleichgewicht wird sich einstellen, da es keine Clearance gibt. Somit ließe sich der ICQ im Gleichgewicht messen. Definierte und umschriebene Clearance könnte durch lokalisiertes und selektives Photobleaching erreicht werden. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem Bleaching werden ICQ Werte bestimmt. Diese betreffen dann unterschiedliche Verteilungen, die nicht im Gleichgewicht sind. Nach ausreichender Zeit kann der dann erneut eintretende Gleichgewichtszustand ebenfalls untersucht werden. Zur Frage, wie groß die Unterschiede im frei zugänglichen Raum zwischen einzelnen Voxeln tatsächlich sind, lassen sich Hinweise möglicherweise auch in elektronenmikroskopischen und elektronentomographischen Analysen von Zellen finden.

Unter all diesen Vorbehalten sollen nun die ICA Daten dieser Arbeit diskutiert und eingeordnet werden. In der vorliegenden Arbeit wurden zuerst Kontrollpräparate angefertigt, die die drei möglichen Konstellationen „Kokalisation“, „getrenntes Vorkommen“ und „zufällige Verteilung“ darstellten. Erst im Anschluss wurden Präparate gegen Calbindin D-28k und RanBPM gefärbt. Als Beispiel einer sicheren Kokalisation wurden bei einem und demselben Präparat gleichzeitig mono- und polyklonale Antikörper gegen Calbindin D-28k eingesetzt: Da das Antigen das gleiche war, sollten die Intensitäten der ausgestrahlten Signale ähnlich variieren. Wie es bereits bei den Ergebnissen besprochen wurde, lagen die ICQ-Werte zwischen 0.14 und 0.39, die graphische Darstellung lieferte eine deutlich nach rechts gebogene Kurve. Allerdings erhielten wir nie höhere ICQ-Werte (theoretische bis +0,5 möglich), obwohl sich die Antikörper gegen das gleiche Protein richteten. Möglicherweise könnte das an der jeweiligen Größe dieser Proteine liegen:

Im Vergleich zu Calbindin D-28k sind die mono- und polyklonalen Antikörper recht große Moleküle, die eventuell aus rein räumlichen Gründen nicht mit sehr hoher Effizienz an ihrem Antigen gleichzeitig binden können. Auch zu bedenken ist wie weiter oben schon angedeutet, dass ein positiver ICQ aus der ICA nicht zwingend auf eine direkte Komplexbildung der beiden betrachteten Proteine zurückgehen muss. Es könnte sich auch um einen größeren Komplex handeln, in welchem die beiden betrachteten Proteine vermittelt durch andere, nicht in der ICA sichtbare, Moleküle eingebaut sind. Die im Kontrollexperiment mit mono- und polyklonalen Calbindin D-28k Antikörpern gefundenen positiven ICQs könnten also auch von homo- oder heteromeren Komplexen mit Calbindin D-28k stammen. Möglich wäre, dass neben solchen Komplexen auch einzelnmarkierte Calbindin D-28k-Moleküle (also solche, die nur den mono- oder nur den polyklonalen Antikörper gebunden haben) vorliegen. Diese einzelnmarkierten Moleküle wären dann voneinander unabhängig verteilt und könnten dafür sorgen, dass der ICQ nicht höher positiv wird. Bei der Analyse von Färbungen gegen Parvalbumin und Calbindin D-28k schwankten die ICQ-Werte um 0, was der Erwartung im Fall einer Zufallsverteilung entsprach. Auch konnte in der statistischen Analyse die Negativhypothese, dass es keinen Unterschied zwischen den Doppelfärbungen Parvalbumin vs. Calbindin D-28k und RanBPM und Calbindin D-28k gab, widerlegt werden. Diese Situation und ihre große Bedeutung für die Interpretation der ICA wurde weiter oben bereits behandelt. Dieser Befund ist konsistent mit allen gängigen Auffassungen zu Beweglichkeit und Beziehung von Parvalbumin und Calbindin D-28k in Purkinjezellen.

Bei der weiteren als Kontrolle konzipierten Färbung gegen Calbindin D-28k und GFAP waren die ICQ-Werte niedrig aber in den meisten Fällen nicht negativ. Das ist für eine streng separate Verteilung überraschend. Tatsächlich ist eine streng separate Verteilung mit negativen ICQ-Werten erwartet, da GFAP in glialen Zellen, nicht aber in Purkinjezellen vorkommt. Andererseits ist gut etabliert, dass Calbindin D-28k im Kleinhirn der Maus in Purkinjezellen, nicht aber in Gliazellen zu finden ist. Ganz allgemein ist astrozytäre Expression von Calbindin D-28k im intakten normalen adulten Nagergehirn nicht nachweisbar.[9] Eine Erklärung dieser Inkongruenz ist am ehesten ein nicht ganz kompensierter Hintergrund in der GFAP Färbung. Hier sind sorgfältige Analysen zur Frage der Spezifität der GFAP Färbung notwendig, wie sie bspw. mittels Antigenkompetition durchgeführt werden können. Unter der Annahme eines nicht kompensierten Hintergrundes ist allerdings der nicht erwartete ICQ bei etwa 0 interessant. Denn er zeigt erneut (analog zur Situation Parvalbumin-Calbindin D-28k), dass ein unabhängig von Calbindin D-28k auftretendes Signal (der Hintergrund) zu dem für zufällig verteilte Signale theoretisch erwarteten ICQ bei 0 führt. Bedenkenswert ist auch die Möglichkeit, dass ein Problem mit der optischen Trennung von Purkinjezellkörpern und Fortsätzen von Bergmanngliazellen zugrunde liegt. Die Fortsätze der Bergmanngliazellen sind sehr filigrane Strukturen, die nah an die Somata von Purkinjezellen herantreten und die bei einer Auflösung von 250-500 nm in z-Richtung möglicherweise nicht in jeder Z-Ebene getrennt vom Ausläufern und kleinen Unregelmäßigkeiten des Somas der Purkinjezelle darstellbar sind. Dieses Problem ließe sich möglicherweise umgehen, wenn ein anderes klar segregiertes Protein zusammen mit Calbindin D-28k untersucht würde. In Frage käme bspw. Calretinin, welches in zerebellären Körnerzellen, nicht aber in Purkinjezellen, vorkommt. Möglicherweise kommt es hier aber wegen der durch die Purkinjezellschicht tretenden Körnerzellaxone zu ähnlichen Problemen wie mit den Fortsätzen der Bergmannglia.

Die Analyse der gegen Calbindin D-28k und RanBPM gefärbten Präparate lieferten ICQ-Werte und graphische Darstellungen, die für eine Kolo-kalisation und abhängige Verteilung sprechen: die Kombination aus polyklonalen Antikörpern gegen RanBPM und monoklonalen Antikörpern gegen Calbindin D-28k führte zu ICQ-Werten, die zum Teil weit über 0.3 lagen. Bei der statistischen Beurteilung wurden die Mittelwerte der ICQ-Werte aus den verschiedenen Datenpopulationen verglichen. Obwohl kein statistisch signifikanter Unterschied bei dem Vergleich zwischen den Mittelwerten der ICQ-Werte von mono- und polyklonalem Calbindin D-28k vs. RanBPM und Calbindin D-28k erwartet wurde, fielen die Mittelwerte doch unterschiedlich aus. Eine mögliche Interpretation dieses Ergebnisses könnte in der Größe der Antikörper und ihrer räumlichen Verhältnis zum Zielprotein liegen: Die Bindung zweier Antikörper (mono- und polyklonale Antikörper gegen Calbindin D-28k) an einem einzigen Protein (Calbindin D-28k) ist mit hoher Wahrscheinlichkeit ineffizienter als die Bindung zweier Antikörper an unterschiedliche Proteine im RanBPM-Calbindin D-28k Komplex. Der Mittelwert der ICQ für die Situation Parvalbumin-Calbindin D-28k war signifikant unterschiedlich vom Mittelwert für die Situation RanBPM-Calbindin D-28k. Ferner wurde die Hypothese der abhängigen Verteilung nochmals mittels eines einseitigen Student-t-test überprüft (Nullhypothese: Mittelwert von ICQ RanBPM-Calbindin D-28k ist kleiner 0.1). Insgesamt resultierte daraus, dass eine abhängige Verteilung von RanBPM und Calbindin aus statistischer Sicht gegeben war. In den Färbungen mit Antikörpern gegen Calbindin D-28k und RanBPM wurden einzelne Analysen auch an einzelnen Zellabschnitten durchgeführt: als „Regions of Interest“ wurden vor allem der

Zellkörper und die Dendriten ausgewählt (Daten nicht gezeigt). Tendenziell waren die ICQ-Werte höher, wenn das analysierte Areal groß war, was möglicherweise unter anderen mit der Zahl an analysierten Pixeln erklärt werden kann. Somit erscheint uns die ICA weniger geeignet, um die Frage der genauen intrazellulären Lokalisation der abhängigen Verteilung zu beantworten, sondern eher der ICQ als ein globales Maß dafür in Bezug auf größere Querschnitte durch Zellen.

# Kapitel 5

## Schlussfolgerungen

Aus der vorliegenden Arbeit ergeben sich methodische und inhaltliche Schlussfolgerungen, die im Folgenden kurz zusammengefaßt und begründet werden sollen. Sie bilden die Grundlage für zukünftige Arbeit auf diesem Gebiet.

- Im lichtmikroskopischen Bereich fehlen Methoden, welche Aussagen zur Interaktion von nativen Proteinen in situ ermöglichen. Physiologisch bedeutsam können nur Interaktionen sein, die auch an nativen Proteinen in situ beobachtet werden. ICA und verwandte Methoden sind ein Ansatz zur Lösung des Problems. Wegen der begrenzten Auflösung bieten sie keinen hinreichenden Beweis für Interaktion. Positive ICQs sind aber eine notwendige Bedingung für die Annahme solcher Interaktion.
- Es ist lohnenswert zu überlegen und zu probieren, ob und ggf. wie ähnliche korrelative Verfahren in der höher auflösenden Lichtmikroskopie (bspw. STED, structured illumination[46]) und in der Elektronenmikroskopie funktionieren. Bei der konfokalen Mikroskopie könnte sich der Einsatz von Dekonvolutionsmethoden lohnen.
- ICA und verwandte Methoden können nicht zwischen direkter und indirekter Interaktion unterscheiden. Das kann ein Vorteil sein, wenn Komplexe die Bedingungen anderer, bspw. biochemischer Interaktionsanalyse, nicht überstehen. Andererseits wird die Interpretation der funktionellen Bedeutung der so gefundenen Daten erschwert.
- Die Interpretation von Ergebnissen der ICA ist empfindlich abhängig von der Sensitivität und Spezifität der eingesetzten Detektionsmethoden, im Falle von Immunfluoreszenz also der eingesetzten Antikörper und mikroskopischen Detektion. Begründbare und objektivierbare Kriterien für die Unterscheidung von Hintergrund und Signal sind entscheidend. Dekonvolutions- und Filterverfahren können hier möglicherweise helfen.
- Das bisher zu wenig diskutierte grundsätzliche Problem der unterschiedlichen Größe der verschiedenen intrazellulären Räume und ihrer Zugänglichkeit muss in Modellexperimenten geklärt werden.
- Bezüglich weiterer Untersuchungen zu Interaktion mit RanBPM ist eine Klärung der endogen vorkommenden Isoformen dieses Proteins in Geweben wichtig.
- Überraschend ist die stärkere RanBPM Anfärbarkeit von Bergmannglia (und Astrozyten in Kultur) im Vergleich zu Neuronen. Diese könnte auf einer höheren intrazellulären Konzentration oder besseren Zugänglichkeit der Epitope beruhen. Die funktionelle Bedeutung von RanBPM in Glia ist zu klären.
- Interessant ist die in dieser Arbeit erstmals beschriebene, hier mit korrelativen Methoden nicht weiter untersuchte Kolo-kalisation von Calbindin D-28k und RanBPM in der Retina. Zusammen

mit veröffentlichten Daten ergibt sich die attraktive und prüfbare Hypothese, dass Calbindin D-28k und metabotrope Glutamatrezeptoren vermittelt durch RanBPM und möglicherweise unter Einbeziehung weiterer Proteine einen großen Komplex bilden.

- Über Purkinjellsomata finden sich für Calbindin D-28k-RanBPM positive ICQ Werte. Diese unterscheiden sich statistisch signifikant von den Negativkontrollen. Dieses Ergebnis ist ein Hinweis auf Interaktion der nativen Proteine in situ und es ist konsistent mit den Literaturdaten zur biochemischen Interaktion dieser Proteine. Sie sind deutliche Hinweise auf eine Rolle des Calbindins als physiologischer Calciumsensor und dienen als Basis für weitere Untersuchungen für die genaue funktionelle Bedeutung der Interaktion.

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung des EF-Hand Motivs, mit Helices E und F (in der Apo- und in der Holoform) und gebundenem Kalziumion ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (modifiziert nach Lewit-Bentley et al.[38]). . . . .	1
1.2	Struktur des langen RanBPMs. Erklärung zu den Domänen und Abkürzungen im Text (modifiziert nach Suresh et al.)[63] . . . . .	4
3.1	Rinde des Mauskleinhirns (A) Immunfärbung mit RanBPM Antikörpern (Millipore), deutlich gefärbt sind unter anderem Purkinjezellen (Pfeilspitze) und die Fortsätze (lange Pfeile) und Somata (kurze Pfeile) von Bergmanngliazellen, Konfokalmikroskop, offenes pinhole. (B,C) Doppelfärbung gegen S100 (B, rot) und RanBPM (Millipore), ML Molekularschicht, Pfeil: Somata von Bergmannglia, Sterne: Somata von Purkinjezellen (als Aussparungen in (B), da nicht S100-positiv). Doppeltgefärbte Fasern, vermutlich Fortsätze von Bergmanngliazellen sind erkennbar (Pfeilspitzen). Konfokale Mikroskopie, mittleres Bild aus einem Z-Stack. . . . .	21
3.2	Primärkulturen aus dem Mausgehirn, Doppelfärbung mit primären Antikörpern gegen (A) GFAP und (B) RanBPM (Millipore). Deutlich zu sehen sind die fibrillären Strukturen unter Aussparung der Zellkerne in (A) und die homogene Füllung des Cytoplasmas und der Nuklei in (B). Weitfeldepifluoreszenz, 100x Objektiv. . . . .	22
3.3	Mausretina, Doppelfärbung mit primären Antikörpern gegen (A) Calbindin D-28k (polyklonal) und (B) RanBPM (monoklonal). Deutlich zu sehen sind die drei horizontalen Banden (lange Pfeile) und die Färbung in der Horizontalschicht (kurzer Pfeil). Die Muster sind ähnlich, aber nicht vollständig deckungsgleich. Konfokale Mikroskopie, 63x Objektiv, mittlere Schicht aus einem Z-Stack. . . . .	24
3.4	Zwei Beispiele zur Doppelfärbung gegen RanBPM (rot) und Calbindin D-28k (grün) von free-floating Schnitten des Kleinhirns der Maus. A, B polyklonaler Antikörper gegen RanBPM (Millipore); C, D polyklonaler Antikörper gegen Calbindin D-28k. Die Signale beider Kanäle sind weitgehend überlappend, zeigen allerdings auch kleine Unterschiede, wie beispielsweise in Verhältnis von Kern- und Zytosolfärbung der mit dem Pfeil markierten Zelle. Konfokale Bilder, aus der Mitte eines Z-Stacks, 63x Objektiv. . . . .	25
3.5	Immunfärbungen von free-floating Schnitten des Kleinhirns der Maus. (A) Gegen neurosenspezifisches Tubulin III (TU-20), (B, C) Doppelfärbung auf Calbindin D-28k (B, grün) und GFAP (C, rot). (D) Färbung gegen pcp-2. (E, F) Doppelfärbung auf Parvalbumin (E, rot) und Calbindin D-28k (F, grün). (A) zeigt die erwartete inhomogene extranukleäre Verteilung eines Bestandteiles des Zytoskelettes, (B und F) die typische Calbindinfärbung im Kleinhirn; alle Anteile der Purkinjezellen sind gefärbt, (C) die bereits beschriebenen Fortsätze von Bergmanngliazellen in der Molekularschicht (ML); (D) die homogene zytosolische und nukleäre Verteilung des kleinen nicht-sezernierten Proteins pcp-2, und (E) das typische Muster von Parvalbumin (kurze Pfeile: Purkinjezellen, lange Pfeile: Interneurone in der Molekularschicht (ML), Körnerzellschicht (GL). Konfokalmikroskop, mittlere Bilder von Z-Stacks., 63x Objektiv. . . . .	26
3.6	Westernblot Analyse verschiedener Gewebe der Maus detektiert mit unterschiedlichen Antikörpern gegen RanBPM. (A-E) Kleinhirn: (A) Ziegenantikörper, 1:1000. (B) Ohne ersten Antikörper, zweiter Antikörper wie für primären Kaninchenantikörper. (C) Kaninchenantikörper (abcam), 1:2000. (D) Kaninchenantikörper (Santa Cruz), 1:500. (E) Monoklonaler Antikörper, 2,5 $\mu\text{g/ml}$ . (F-G) Testes: (F) Monoklonaler Antikörper, 2,5 $\mu\text{g/ml}$ . (G) Ziegenantikörper, 1:1000. (A-D, G) 20 $\mu\text{g}$ Gesamtprotein; (E, F) 23 $\mu\text{g}$ Gesamtprotein. . . . .	27

3.7	Westernblot Analyse von HN10e Zellen. (A, B) Zwei Proben HN10e Zellen transfiziert mit Flag-RanBPM, Detektion mit Kaninchenantikörpern gegen RanBPM (Millipore) (C, D) Zwei Proben HN10e Zellen transfiziert mit EGFPN3, gleiche Detektion wie in A, B. (A*, B*) Lange Exposition von (A, B). . . . .	29
3.8	Westernblot Analyse von HN10e Zellen. (A, B) Zwei Proben HN10e Zellen transfiziert mit Flag-RanBPM, Detektion mit Kaninchenantikörpern gegen RanBPM (abcam) (C, D) Zwei Proben HN10e Zellen transfiziert mit EGFPN3, gleiche Detektion wie in A, B. (A*, B*) Lange Exposition von (A, B). . . . .	29
3.9	Westernblot Analyse von HN10e. (A, B) Zwei Proben HN10e Zellen transfiziert mit Flag-RanBPM, Detektion mit Ziegenantikörpern gegen RanBPM (abcam). Der Pfeilkopf zeigt auf eine schwache Bande unterhalb 95 kDa. (C, D) Zwei Proben HN10e Zellen transfiziert mit EGFPN3, gleiche Detektion wie in A, B. (A*, B*) Lange Exposition von (A, B). . . .	30
3.10	Westernblot Analyse von HN10e Zellen. (A) HN10e Zellen transfiziert mit einem Flag-Calbindin-D-28k Expressionsplasmid. (B, C) Zwei Proben HN10e Zellen transfiziert mit Flag-RanBPM, Detektion mit Antikörpern gegen Flag (abcam) (D, E) Zwei Proben HN10e Zellen transfiziert mit EGFPN3, gleiche Detektion wie in A, B. (B* - E*) Lange Exposition von (B - E). Spezifische Banden sind in (A) bei etwa 28 kDa (Molekulargewicht von Calbindin D-28k) und in (B, C, B*, C*) die Banden zwischen 72 und 95 kDa. Die Bande zwischen 42 und 52 kDa ist unspezifisch, da sie auch in Proben auftritt, die Flag nicht exprimieren (EGFPN3 enthält keine Flag Sequenz). . . . .	30
3.11	Westernblot Analyse von MDCK Zellen. (A, B) Zwei Proben MDCK Zellen transfiziert mit Flag-RanBPM, Detektion mit Kaninchenantikörpern gegen RanBPM (Millipore) (C, D) Zwei Proben MDCK Zellen transfiziert mit EGFPN3, gleiche Detektion wie in A, B. (C, D) Proben wie in (A,B), Detektion mit Antikörpern gegen Flag (abcam). (G, H) Proben wie in (C, D), Detektion mit Flag-Antikörpern. . . . .	31
3.12	Doppelfärbung von Flag-RanBPM transfizierten HN10e Zellen. (A) Kaninchenantikörper gegen RanBPM (Millipore). (B) Ziegenantikörper gegen RanBPM. (C) Anti-Flag. (D) Kaninchenantikörper gegen RanbPM (abcam). . . . .	32
3.13	Färbung von MDCK-Zellen: (A, B) Zwei Beispiele von Flag-RanBPM transfizierten Zellen gefärbt mit Flag-Antikörpern (rot). (C) Nicht-transfizierte Zellen gefärbt mit Kaninchenantikörpern gegen RanBPM (Millipore). (D) Zellkerne aus (C) dargestellt mittels DAPI. . . . .	33
3.14	Image Correlation Analysis für die Positivkontrolle, Doppelfärbung mit poly- und monoklonalen Antikörpern gegen Calbindin D-28k. (A) ICA Plot für den Grün-Kanal. (B) Polyklonaler Calbindin D-28k Antikörper (grün). (C) Monoklonaler Calbindin D-28k Antikörper (rot). . . . .	35
3.15	Image Correlation Analysis für die Negativkontrolle (segregierte Verteilung), Doppelfärbung mit poly- Antikörpern gegen Calbindin D-28k und GFAP. (A) ICA Plot für den Grün-Kanal. (B) Polyklonaler Calbindin D-28k-Antikörper (grün). (C) GFAP-Antikörper (rot). . . . .	36
3.16	Image Correlation Analysis für die Zufallsverteilung, Doppelfärbung mit polyklonalen Antikörpern gegen Calbindin D-28k und monoklonalen Antikörpern gegen Parvalbumin. (A) ICA Plot für den Grün-Kanal. (B) Polyklonaler Calbindin D-28k-Antikörper (grün). (C) Monoklonaler Parvalbumin-Antikörper (rot). . . . .	37
3.17	Image Correlation Analyse für die Doppelfärbung mit polyklonalen Antikörpern gegen RanBPM und monoklonalen Antikörpern gegen Calbindin D-28k. (A) ICA Plot für den Grün-Kanal. (B) Polyklonaler RanBPM-Antikörper (abcam) (grün). (C) Monoklonaler Calbindin D-28k-Antikörper (rot). . . . .	38
3.18	Box-Plot aus den Experimentaldaten, <i>Abkürzungen:</i> Calb, Calbindin D-28k; Calb Mono, monoklonale Antikörper gegen Calbindin D-28k; Calb Poli, polyklonale Antikörper gegen Calbindin D-28k; GFAP, gliofibrilläres saures Protein; Parv, Parvalbumin. . . . .	40
3.19	Box-Plot aus den Experimentaldaten ohne <i>outliers</i> , <i>Abkürzungen:</i> Calb, Calbindin D-28k; Calb Mono, monoklonale Antikörper gegen Calbindin D-28k; Calb Poli, polyklonale Antikörper gegen Calbindin D-28k; GFAP, gliofibrilläres saures Protein; Parv, Parvalbumin. . . . .	41
3.20	Normal Plot, Parvalbumin - Calbindin D-28k. . . . .	43
3.21	Ergebnisse des Shapiro-Tests, Parvalbumin - Calbindin D-28k. . . . .	43
3.22	Normal Plot, monoklonales Calbindin D-28k - polyklonales Calbindin D-28k. . . . .	44
3.23	Ergebnisse des Shapiro-Tests, monoklonales Calbindin D-28k - polyklonales Calbindin D-28k. . . . .	44
3.24	Normal Plot, GFAP - Calbindin D-28k. . . . .	45

3.25	Ergebnisse des Shapiro-Tests, GFAP - Calbindin D-28k. . . . .	45
3.26	Normal Plot, RanBPM - Calbindin D-28k. . . . .	46
3.27	Ergebnisse des Shapiro-Tests, RanBPM - Calbindin D-28k. . . . .	46
3.28	Graphische Interpretation des Student-T-Tests. . . . .	49
3.29	Ergebnisse des Student-t-Tests für den Vergleich RanBPM-Calbindin D28k vs. GFAP-Calbindin D-28k. . . . .	49
3.30	Graphische Interpretation des Student-T-Tests . . . . .	51
3.31	Ergebnisse des Student-t-Tests für den Vergleich RanBPM-Calbindin D28k vs. Calbindin D-28k monoklonal-polyklonal. . . . .	51
3.32	Graphische Interpretation des Student-T-Tests . . . . .	53
3.33	Ergebnisse des Student-t-Tests für den Vergleich RanBPM-Calbindin D28k vs. Parvalbumin-Calbindin D-28k . . . . .	53
3.34	Graphische Interpretation des Student-T-Tests . . . . .	55
3.35	Ergebnisse des einseitigen Student-t-Tests für den Vergleich RanBPM-Calbindin D28k vs. Mittelwert von 0.1 . . . . .	55

# Literaturverzeichnis

- [1] L Aiello, R Guilfoyle, K Huebner, and R Weinmann. Adenovirus 5 dna sequences present and rna sequences transcribed in transformed human embryo kidney cells (hek-ad-5 or 293). *Virology*, 94(2):460–469, 1979.
- [2] Liisa Airaksinen, Jussi Virkkala, Antti Aarnisalo, Michael Meyer, Jukka Ylikoski, and Matti S Airaksinen. Lack of calbindin-d28k does not affect hearing level or survival of hair cells in acoustic trauma. *ORL*, 62(1):9–12, 2000.
- [3] Elnaz Atabakhsh, Dawn M Bryce, Karen J Lefebvre, and Caroline Schild-Poulter. Ranbpm has proapoptotic activities that regulate cell death pathways in response to dna damage. *Molecular Cancer Research*, 7(12):1962–1972, 2009.
- [4] Dong Bai, Hong Chen, and Bing-Ren Huang. Ranbpm is a novel binding protein for p75<sup>ntr</sup>. *Biochemical and biophysical research communications*, 309(3):552–557, 2003.
- [5] Bryce T Bajar, Emily S Wang, Shu Zhang, Michael Z Lin, and Jun Chu. A guide to fluorescent protein fret pairs. *Sensors*, 16(9):1488, 2016.
- [6] Jaroslaw J Barski, Jana Hartmann, Christine R Rose, Freek Hoebeek, Karin Mörl, Michael Noll-Hussong, Chris I De Zeeuw, Arthur Konnerth, and Michael Meyer. Calbindin in cerebellar purkinje cells is a critical determinant of the precision of motor coordination. *Journal of Neuroscience*, 23(8):3469–3477, 2003.
- [7] S Bolte and FP Cordelieres. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of microscopy*, 224(3):213–232, 2006.
- [8] Tommy Cedervall, Ingemar André, Cheryl Selah, James P Robblee, Peter C Krecioch, Robert Fairman, Sara Linse, and Karin S Åkerfeldt. Calbindin d28k ef-hand ligand binding and oligomerization: Four high-affinity sites three modes of action. *Biochemistry*, 44(41):13522–13532, 2005.
- [9] MR Celio. Calbindin d-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience*, 35(2):375–475, 1990.
- [10] YoonJeung Chang, Murugan Paramasivam, Matthew J Girgenti, Randall S Walikonis, Elisabetta Bianchi, and Joseph J LoTurco. Ranbpm regulates the progression of neuronal precursors through m-phase at the surface of the neocortical ventricular zone. *Developmental neurobiology*, 70(1):1–15, 2010.
- [11] Ling Cheng, Sandra Lemmon, and Vance Lemmon. Ranbpm is an l1-interacting protein that regulates l1-mediated mitogen-activated protein kinase activation. *Journal of neurochemistry*, 94(4):1102–1110, 2005.
- [12] Gitte L Christensen, Maria LB Jacobsen, Anna Wendt, Ines G Mollet, Josefine Friberg, Klaus S Frederiksen, Michael Meyer, Christine Bruun, Lena Eliasson, and Nils Billestrup. Bone morphogenetic protein 4 inhibits insulin secretion from rodent beta cells through regulation of calbindin1 expression and reduced voltage-dependent calcium currents. *Diabetologia*, 58(6):1282–1290, 2015.
- [13] Cristina Croci, Johann Helmut Brandstätter, and Ralf Enz. Zip3, a new splice variant of the pkc- $\zeta$ -interacting protein family, binds to gabac receptors, pkc- $\zeta$ , and kv $\beta$ 2. *Journal of Biological Chemistry*, 278(8):6128–6135, 2003.

- [14] David A Dansereau and Paul Lasko. Ranbpm regulates cell shape, arrangement, and capacity of the female germline stem cell niche in *drosophila melanogaster*. *The Journal of cell biology*, 182(5):963–977, 2008.
- [15] Montgomery DC. Design and analysis of experiments. 2001.
- [16] AL De Blas. Monoclonal antibodies to specific astroglial and neuronal antigens reveal the cytoarchitecture of the bergmann glia fibers in the cerebellum. *Journal of Neuroscience*, 4(1):265–273, 1984.
- [17] Chris I De Zeeuw and Tycho M Hoogland. Reappraisal of bergmann glial cells as modulators of cerebellar circuit function. 2015.
- [18] Simona Denti, Alessandra Sirri, Alessandra Cheli, Lars Rogge, Giulio Innamorati, Stella Putignano, Monica Fabbri, Ruggero Pardi, and Elisabetta Bianchi. Ranbpm is a phosphoprotein that associates with the plasma membrane and interacts with the integrin lfa-1. *Journal of Biological Chemistry*, 279(13):13027–13034, 2004.
- [19] Sara C Domingues, Uwe Konietzko, Ana Gabriela Henriques, Sandra Rebelo, Margarida Fardilha, Hideo Nishitani, Roger M Nitsch, Edgar F da Cruz e Silva, and Odete AB da Cruz e Silva. Ranbp9 modulates aicd localization and transcriptional activity via direct interaction with tip60. *Journal of Alzheimer’s Disease*, 42(4):1415–1433, 2014.
- [20] Yoshiyuki Fukuda, Florian Beck, Jürgen M Plitzko, and Wolfgang Baumeister. In situ structural studies of tripeptidyl peptidase ii (tppii) reveal spatial association with proteasomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(17):4412–4417, 2017.
- [21] Charles R Gaush, Walter L Hard, and Thomas F Smith. Characterization of an established line of canine kidney cells (mdck).\*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 122(3):931–935, 1966.
- [22] Jessica L Gifford, Michael P Walsh, and Hans J Vogel. Structures and metal-ion-binding properties of the ca<sup>2+</sup>-binding helix–loop–helix ef-hand motifs. *Biochemical Journal*, 405(2):199–221, 2007.
- [23] F Girard, J Venail, Beat Schwaller, and Marco R Celio. The ef-hand ca<sup>2+</sup>-binding protein superfamily: A genome-wide analysis of gene expression patterns in the adult mouse brain. *Neuroscience*, 294:116–155, 2015.
- [24] Yakov Gluzman. Sv40-transformed simian cells support the replication of early sv40 mutants. *Cell*, 23(1):175–182, 1981.
- [25] Jiazhen Guan, Yuan Luo, and Bradley M Denker. Purkinje cell protein-2 (pcp2) stimulates differentiation in pc12 cells by  $g\beta\gamma$ -mediated activation of ras and p38 mapk. *Biochemical Journal*, 392(2):389–397, 2005.
- [26] Sassan Hafizi, Anna Gustafsson, Jonas Stenhoff, and Björn Dahlbäck. The ran binding protein ranbpm interacts with axl and sky receptor tyrosine kinases. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 37(11):2344–2356, 2005.
- [27] Jacques Haiech, Saad BM Moulhaye, and Marie-Claude Kilhoffer. The ef-handome: combining comparative genomic study using famdbtool, a new bioinformatics tool, and the network of expertise of the european calcium society. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1742(1):179–183, 2004.
- [28] John L Jainchill, Stuart A Aaronson, and George J Todaro. Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *Journal of Virology*, 4(5):549–553, 1969.
- [29] Manuel F Juette, Daniel S Terry, Michael R Wasserman, Zhou Zhou, Roger B Altman, Qinsi Zheng, and Scott C Blanchard. The bright future of single-molecule fluorescence imaging. *Current opinion in chemical biology*, 20:103–111, 2014.
- [30] Rajesh Khanna, Q Li, L Sun, TJ Collins, and EF Stanley. N type ca<sup>2+</sup> channels and rim scaffold protein covary at the presynaptic transmitter release face but are components of independent protein complexes. *Neuroscience*, 140(4):1201–1208, 2006.

- [31] GJ Klapstein, S Vietla, DN Lieberman, PA Gray, MS Airaksinen, H Thoenen, M Meyer, and I Mody. Calbindin-d 28k fails to protect hippocampal neurons against ischemia in spite of its cytoplasmic calcium buffering properties: evidence from calbindin-d 28k knockout mice. *Neuroscience*, 85(2):361–373, 1998.
- [32] Nobuaki Kobayashi, Jun Yang, Atsuhisa Ueda, Takeyuki Suzuki, Kouji Tomaru, Mitsuhiro Takeno, Kenji Okuda, and Yoshiaki Ishigatsubo. Ranbpm, muskelin, p48emlp, p44ctlh, and the armadillo-repeat proteins *armc8 $\alpha$*  and *armc8 $\beta$*  are components of the *ctlh* complex. *Gene*, 396(2):236–247, 2007.
- [33] Douglas J Kojetin, Ronald A Venters, David R Kordys, Richele J Thompson, Rajiv Kumar, and John Cavanagh. Structure, binding interface and hydrophobic transitions of  $\text{ca}^{2+}$ -loaded calbindin-d28k. *Nature structural & molecular biology*, 13(7):641–647, 2006.
- [34] Sonja Kramer, Toshinori Ozaki, Kou Miyazaki, Chiaki Kato, Takayuki Hanamoto, and Akira Nakagawara. Protein stability and function of p73 are modulated by a physical interaction with ranbpm in mammalian cultured cells. *Oncogene*, 24(5):938–944, 2005.
- [35] TT Lambers, RJM Bindels, and JGJ Hoenderop. Coordinated control of renal  $\text{ca}^{2+}$  handling. *Kidney international*, 69(4):650–654, 2006.
- [36] Lukas Landmann and Permsin Marbet. Colocalization analysis yields superior results after image restoration. *Microscopy research and technique*, 64(2):103–112, 2004.
- [37] HJ Lee, DN Hammond, TH Large, JD Roback, JA Sim, DA Brown, UH Otten, and BH Wainer. Neuronal properties and trophic activities of immortalized hippocampal cells from embryonic and young adult mice. *Journal of Neuroscience*, 10(6):1779–1787, 1990.
- [38] Anita Lewit-Bentley and Stéphane Réty. Ef-hand calcium-binding proteins. *Current opinion in structural biology*, 10(6):637–643, 2000.
- [39] Qi Li, Anthony Lau, Terence J Morris, Lin Guo, Christopher B Fordyce, and Elise F Stanley. A syntaxin 1, *g $\alpha$ o*, and n-type calcium channel complex at a presynaptic nerve terminal: analysis by quantitative immunocolocalization. *Journal of Neuroscience*, 24(16):4070–4081, 2004.
- [40] Jocelyn J Lippman, Tamar Lordkipanidze, Margaret E Buell, Sung Ok Yoon, and Anna Dunaevsky. Morphogenesis and regulation of bergmann glial processes during purkinje cell dendritic spine ensheathment and synaptogenesis. *Glia*, 56(13):1463–1477, 2008.
- [41] Ward Lutz, Elena M Frank, Theodore A Craig, Richele Thompson, Ronald A Venters, Doug Kojetin, John Cavanagh, and Rajiv Kumar. Calbindin d28k interacts with ran-binding protein m: identification of interacting domains by nmr spectroscopy. *Biochemical and biophysical research communications*, 303(4):1186–1192, 2003.
- [42] Rajesh P Menon, Toby J Gibson, and Annalisa Pastore. The c terminus of fragile x mental retardation protein interacts with the multi-domain ran-binding protein in the microtubule-organising centre. *Journal of molecular biology*, 343(1):43–53, 2004.
- [43] S Molinari, R Battini, S Ferrari, L Pozzi, AS Killcross, TW Robbins, A Jouvenceau, JM Billard, P Dutar, Y Lamour, et al. Deficits in memory and hippocampal long-term potentiation in mice with reduced calbindin d28k expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(15):8028–8033, 1996.
- [44] L Charles Murrin and Jeffery N Talbot. Ranbpm, a scaffolding protein in the immune and nervous systems. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 2(3):290–295, 2007.
- [45] Masafumi Nakamura, Hirohisa Masuda, Johji Horii, Kei-ichi Kuma, Nobuhiko Yokoyama, Tomoyuki Ohba, Hideo Nishitani, Takashi Miyata, Masao Tanaka, and Takeharu Nishimoto. When overexpressed, a novel centrosomal protein, ranbpm, causes ectopic microtubule nucleation similar to  $\gamma$ -tubulin. *The Journal of cell biology*, 143(4):1041–1052, 1998.
- [46] Karin Nienhaus and G Ulrich Nienhaus. Where do we stand with super-resolution optical microscopy? *Journal of molecular biology*, 428(2):308–322, 2016.

- [47] Hideo Nishitani, Eiji Hirose, Yasuhiro Uchimura, Masafumi Nakamura, Makoto Umeda, Kiyomasa Nishii, Nozomu Mori, and Takeharu Nishimoto. Full-sized ranbpm cDNA encodes a protein possessing a long stretch of proline and glutamine within the n-terminal region, comprising a large protein complex. *Gene*, 272(1):25–33, 2001.
- [48] Alison J North. Seeing is believing? a beginners’ guide to practical pitfalls in image acquisition. *The Journal of cell biology*, 172(1):9–18, 2006.
- [49] Kenji Okamoto and Yasushi Sako. Recent advances in fret for the study of protein interactions and dynamics. *Current Opinion in Structural Biology*, 46:16–23, 2017.
- [50] Hiroto Okayama and Paul Berg. High-efficiency cloning of full-length cDNA. *Molecular and cellular biology*, 2(2):161–170, 1982.
- [51] Juan Pablo Palavicini, Hongjie Wang, Dmitriy Minond, Elisabetta Bianchi, Shaohua Xu, and Madhupall K Lakshmana. Ranbp9 overexpression down-regulates phospho-cofilin, causes early synaptic deficits and impaired learning, and accelerates accumulation of amyloid plaques in the mouse brain. *Journal of Alzheimer’s Disease*, 39(4):727–740, 2014.
- [52] Francesca Puglisi, Valentina Vanni, Giulia Ponterio, Annalisa Tassone, Giuseppe Sciamanna, Paola Bonsi, Antonio Pisani, and Georgia Mandolesi. Torsin a localization in the mouse cerebellar synaptic circuitry. *PLoS one*, 8(6):e68063, 2013.
- [53] Sandrine Puverel, Colleen Barrick, Susanna Dolci, Vincenzo Coppola, and Lino Tessarollo. Ranbpm is essential for mouse spermatogenesis and oogenesis. *Development*, 138(12):2511–2521, 2011.
- [54] Mira A Rao, Helen Cheng, Alandra N Quayle, Hideo Nishitani, Colleen C Nelson, and Paul S Rennie. Ranbpm, a nuclear protein that interacts with and regulates transcriptional activity of androgen receptor and glucocorticoid receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 277(50):48020–48027, 2002.
- [55] Nadia Scantlebury, Xiao Li Zhao, Verónica G Rodríguez Moncalvo, Alison Camilletti, Stacy Zahanova, Aidan Dineen, Ji-Hou Xin, and Ana Regina Campos. The drosophila gene ranbpm functions in the mushroom body to regulate larval behavior. *PLoS One*, 5(5):e10652, 2010.
- [56] William F Scherer, Jerome T Syverton, and George O Gey. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses: Iv. viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain hela) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *The Journal of experimental medicine*, 97(5):695, 1953.
- [57] Serge N Schiffmann, Guy Cheron, Ann Lohof, Pablo d’Alcantara, Michael Meyer, Marc Parmentier, and Stéphane Schurmans. Impaired motor coordination and purkinje cell excitability in mice lacking calretinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(9):5257–5262, 1999.
- [58] Beat Schwaller. The continuing disappearance of “pure” Ca<sup>2+</sup> buffers. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(2):275–300, 2009.
- [59] Beat Schwaller, Michael Meyer, and Serge Schiffmann. ‘new’ functions for ‘old’ proteins: the role of the calcium-binding proteins calbindin d-28k, calretinin and parvalbumin, in cerebellar physiology. studies with knockout mice. *The Cerebellum*, 1(4):241–258, 2002.
- [60] Angela Seebahn, Melanie Rose, and Ralf Enz. Ranbpm is expressed in synaptic layers of the mammalian retina and binds to metabotropic glutamate receptors. *FEBS letters*, 582(16):2453–2457, 2008.
- [61] Norito Shibata, Naoki Tsunekawa, Shino Okamoto-Ito, Ryuko Akasu, Ako Tokumasu, and Toshiaki Noce. Mouse ranbpm is a partner gene to a germline specific rna helicase, mouse vasa homolog protein. *Molecular reproduction and development*, 67(1):1–7, 2004.
- [62] Karen Sooy, Thomas Schermerhorn, Mitsuhiko Noda, Manju Surana, William B Rhoten, Michael Meyer, Norman Fleischer, Geoffrey WG Sharp, and Sylvia Christakos. Calbindin-d28k controls [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and insulin release evidence obtained from calbindin-d28k knockout mice and  $\beta$  cell lines. *Journal of Biological Chemistry*, 274(48):34343–34349, 1999.
- [63] Bharathi Suresh, Suresh Ramakrishna, and Kwang-Hyun Baek. Diverse roles of the scaffolding protein ranbpm. *Drug discovery today*, 17(7):379–387, 2012.

- [64] Hideaki Togashi, Eric F Schmidt, and Stephen M Strittmatter. Ranbp contributes to semaphorin3a signaling through plexin-a receptors. *Journal of Neuroscience*, 26(18):4961–4969, 2006.
- [65] Dakun Wang, Zaibo Li, Edward M Messing, and Guan Wu. Activation of ras/erk pathway by a novel met-interacting protein ranbp. *Journal of Biological Chemistry*, 277(39):36216–36222, 2002.
- [66] Hongjie Wang, Meagan Lewsadder, Eric Dorn, Shaohua Xu, and Madepalli K Lakshmana. Ranbp9 overexpression reduces dendritic arbor and spine density. *Neuroscience*, 265:253–262, 2014.
- [67] RH Wasserman and AN Taylor. Vitamin d3-induced calcium-binding protein in chick intestinal mucosa. *Science*, 152(3723):791–793, 1966.
- [68] RH Wasserman, AN Taylor, and FA Kallfelz. Vitamin d and transfer of plasma calcium to intestinal lumen in chicks and rats. *American Journal of Physiology–Legacy Content*, 211(2):419–423, 1966.
- [69] H Wässle, L Peichl, Matti S Airaksinen, and Michael Meyer. Calcium-binding proteins in the retina of a calbindin-null mutant mouse. *Cell and tissue research*, 292(2):211–218, 1998.
- [70] Paul W Wiseman. Image correlation spectroscopy: principles and applications. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2015(4):pdb–top086124, 2015.
- [71] JA Woo, T Boggess, C Uhlar, X Wang, H Khan, G Cappos, A Joly-Amado, E De Narvaez, S Majid, LS Minamide, et al. Ranbp9 at the intersection between cofilin and  $\alpha\beta$  pathologies: rescue of neurodegenerative changes by ranbp9 reduction. *Cell death & disease*, 6(3):1676, 2015.
- [72] Haiwei Xu, Yang Yang, Xiaotong Tang, Meina Zhao, Fucheng Liang, Pei Xu, Baoke Hou, Yan Xing, Xiaohang Bao, and Xiaotang Fan. Bergmann glia function in granule cell migration during cerebellum development. *Molecular neurobiology*, 47(2):833–844, 2013.
- [73] Yuhe Yuan, Chengbo Fu, Hong Chen, Xin Wang, Weiwei Deng, and Bing-Ren Huang. The ran binding protein ranbp interacts with trka receptor. *Neuroscience letters*, 407(1):26–31, 2006.
- [74] Yonglong Zou, Seunghwan Lim, Kangmoon Lee, Xiaobing Deng, and Eileen Friedman. Serine/threonine kinase mirk/dyrk1b is an inhibitor of epithelial cell migration and is negatively regulated by the met adaptor ran-binding protein m. *Journal of Biological Chemistry*, 278(49):49573–49581, 2003.