

Das Adapterprotein AKAP79/150 –
Charakterisierung
eines genetischen Polymorphismus
und eines neuen Bindungspartners

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

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

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

von Diplom-Biologin Xenia Gorny
geb. am 20. November 1978 in Altdöbern

Gutachter:
PD Dr. Constanze Seidenbecher
Prof. Dr. Rüdiger Horstkorte

Eingereicht am 27.08.2012

Verteidigt am 26.11.2012

„Die Natur wiederholt ewig in weiterer Ausdehnung denselben Gedanken;

darum ist der Tropfen ein Bild des Meeres.“

(Friedrich Hebbel)

In tiefer Liebe und Dankbarkeit meinen Eltern gewidmet.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meiner Betreuerin PD Dr. Constanze Seidenbecher danken. Sie gab meiner Promotion eine klare Linie, unterstützte mich mit ihrer Diskussionsbereitschaft, mit richtungsweisenden Ideen und Ratschlägen und verstand es, mich zu motivieren.

Dr. Dr. Björn Schott danke ich für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe Imaging Genetics der Abteilung Verhaltensneurologie des Leibniz-Institut für Neurobiologie Magdeburg zu promovieren. Einen Großen Dank möchte ich in diesem Zuge auch dem Abteilungs- und Institutsleiter Prof. Dr. Eckart Gundelfinger, dem Arbeitsgruppenleiter Dr. Michael R. Kreutz und Prof. Dr. Hans-Jochen Heinze für ihre Förderung und Hilfe aussprechen.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Imaging Genetics für ihre liebevolle Unterstützung bedanken. Ich fand Hilfsbereitschaft und persönliche Stärkung vor allem bei Gusalija Behnisch, Dr. Sylvia Richter, Adriana Barman, Maria Michelmann, Lydie Leschak und Dr. Grazyna Debska-Vielhaber.

Des Weiteren möchte ich den Wissenschaftlern und wissenschaftlichen Mitstreitern der Abteilung Neurochemie und Molekularbiologie für ihre stetige Ansprechbarkeit und Hilfsbereitschaft bei schwierigen Fragen danken, darunter Dr. Renato Frischknecht, Dr. Karl-Heinz Smalla, Dr. Anne Stellmacher, Dr. Wilko Altmann, Dr. Anna Fejtová und Dr. Ulrich Thomas. Für die Präparation primärer Neurone und Hilfsbereitschaft bei labortechnischen Angelegenheiten möchte ich Monika Marunde, Steffanie Hochmuth, Corinna Borutzki, Bettina Kracht, Heidemarie Wickborn, Kathrin Hartung, Kathrin Pohlmann und Sabine Opitz danken.

Besonderer Dank geht außerdem an Dr. Marina Mikhaylova – sie ist eine großartige Laborleiterin! Für Anleitungen und Hilfestellungen am Laserscanning-Mikroskop danke ich Dr. Werner Zuschrater, für Hilfe bei computertechnischen Fragen danke ich Dr. Rainer Pielot und bei der Aufarbeitung mikroskopischer Aufnahmen stand mir Dr. Rodrigo Herrera-Molina ratgebend zur Seite. Dr. Daniela Dieterich möchte ich für ein offenes Ohr in einer für mich schwierigen Phase meiner Promotion danken.

Ohne die Hilfe unserer Kooperationspartner Christian Seeger und Prof. Dr. U. Helena Danielson aus Uppsala, Schweden, würde meiner Dissertation ein essentieller Teil fehlen – vielen Dank!

Privat möchte ich meinen Freunden, allen voran meinem Freund Mario, außerdem vor allem Tobias Leutritz, Ulrich Waldschläger und meiner Mitstreiterin Diana Hübler dafür danken, dass sie für mich da sind, wenn ich sie brauche. Mir standen noch weitere liebe Menschen phasenweise während der letzten sechs Jahre zur Seite, denen ich danken möchte. Auch wenn ich hier nicht alle beim Namen nennen kann, freue ich mich, wenn sie sich angesprochen fühlen.

Meinen Eltern und meiner Familie möchte ich für eine glückliche Kindheit voller Liebe danken, in der sie geduldig meine Fragen beantwortet und mich für die Natur und das Leben begeistert haben. Sie haben damit den Grundstein zur Entstehung dieser Arbeit gelegt.

Inhalt

	Danksagung.....	3
	Inhalt	4
	Zusammenfassung.....	9
	Abstract	10
1.	Einleitung	11
1.1.	Signalweiterleitung zwischen Neuronen – die Postsynaptische Dichte als signalintegrierende Einheit	11
1.2.	Langzeitpotenzierung und Langzeitdepression als Prozesse synaptischer Plastizität.	11
1.3.	Ca ²⁺ als sekundärer Botenstoff in der Synapse.....	13
1.3.1.	Das Ca ²⁺ –Sensor Protein Calmodulin.....	13
1.3.2.	Das Ca ²⁺ –Sensor–Protein Caldendrin	14
1.4.	Das Adapterprotein AKAP79/150.....	18
1.5.	Der Pro100Leu Polymorphismus im humanen AKAP5 Gen	20
1.6.	Zielsetzung der vorliegenden Promotion.....	21
2.	Material und Methoden	23
2.1.	Material.....	23
2.1.1.	Chemikalien und Substanzen	23
2.1.2.	Kits, Enzyme	23
2.1.3.	Molekularbiologische und biochemische Puffer.....	23
2.1.4.	Zelllinien und Bakterienstämme	24
2.1.5.	Bakterienmedien und Antibiotika	24
2.1.6.	Medien, Antibiotika und Reagenzien für die Zellkultur.....	24
2.1.6.	Antikörper	25
2.6.1.1.	Primäre Antikörper.....	25
2.1.6.2.	Sekundäre Antikörper.....	25
2.1.7.	Vektoren	25
2.1.8.	Expressionskonstrukte.....	26
2.1.9.	Primer	26
2.2.	Methoden	27
2.2.1.	Molekularbiologie.....	27

2.2.1.1.	Transformation und Präparation hitzeschock-kompetenter <i>E. coli</i> XL10-Gold und BL21 Zellen	27
2.2.1.2.	DNA Präparation aus humanem Probandenblut.....	27
2.2.1.3.	Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien	27
2.2.1.3.1.	Mini-Präparation.....	27
2.2.1.3.2.	Midi- und Maxi-Präparation	28
2.2.1.4.	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	28
2.2.1.5.	Sequenzierung der DNA-Konstrukte	28
2.2.1.6.	Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten	28
2.2.1.7.	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	28
2.2.1.8.	Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren	29
2.2.1.9	Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Generierung von DNA-Fragmenten	29
2.2.1.10.	Polymerasekettenreaktion (PCR) und Restriktion zur Genotypisierung des AKAP5 Pro100Leu Polymorphismus.....	29
2.2.2.	Zellkultur	30
2.2.2.1.	Zellkultur von HEK293-, und Cos7-Zellen	30
2.2.2.2.	Transfektion von Cos7-Zellen	30
2.2.2.3.	Transfektion von HEK293-Zellen mittels CaPO ₄ -Methode	30
2.2.2.4.	Primäre corticale und hippocampale Neuronenkulturen von Ratten	31
2.2.2.5.	Transfektion primärer Rattenneurone.....	31
2.2.2.6.	Fixierung, Immunfärbung und Mikroskopie von Zellkulturen.....	31
2.2.2.7.	Simulation verschiedener Ca ²⁺ -Bedingungen in primären Neuronenkulturen	32
2.2.3.	Biochemische Methoden	32
2.2.3.1.	Proteinbestimmung mit Amidoschwarz.....	32
2.2.3.2.	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	32
2.2.3.3.	Coomassie-Färbung von Proteinen nach SDS-PAGE	33
2.2.3.4.	Western-Blotting und Immundetektion.....	34
2.2.3.5.	Herstellung von HEK-Zell-Extrakten für Pulldown-Experimente.....	34
2.2.3.6.	HEK-Zell-Membranfraktionierung.....	35
2.2.3.7.	Flotation Assay	35
2.2.3.8.	Proteinbiochemische Aufarbeitung von Hirngewebe – Extraktion mit Triton X-100 .	36
2.2.3.9.	Membranfraktionierung von Hirngewebe	36
2.2.3.10.	Co-Immunpräzipitation aus Hirngewebeextrakten	37
2.2.3.11.	Expression und Aufreinigung von Glutathion-S-Transferase (GST) –Fusionsproteinen	37

2.2.3.12.	Expression und Aufreinigung von 6xHis–SUMO–Fusionsproteinen.....	38
2.2.3.13.	GST Pull–down Assay.....	39
2.2.3.13.1.	Allgemeine Beschreibung der Pulldown–Assays.....	39
2.2.3.13.2.	Pulldown–Experimente mit ausschließlich bakteriell aufgereinigten Proteinen	39
2.2.3.13.3.	Elutionsexperimente mit Ca ²⁺ –freiem Puffer.....	39
2.2.3.13.4.	Simultane Bindung von CaM und Caldendrin an GST–AKAP79–B.....	40
2.2.3.13.5.	Kompetitionsexperimente	40
2.2.4.	Surface Plasmon Resonance (SPR)	40
2.2.4.1.	Immobilisierung.....	40
2.2.4.2.	SPR–Messungen	40
2.2.5.	Software.....	41
2.2.5.1.	Ermittlung der Co–Lokalisation	41
2.2.5.2.	Bildbearbeitung für die Präsentation	41
2.2.5.3.	Messung der Optischen Dichte bzw. des Adjusted Volume der Banden eines Blots... 41	
2.2.5.4.	Berechnung der Proteingesamtmenge und des Proteinanteils in ungebundener und gebundener Fraktion zur Auswertung der Pulldown–Assays	42
2.2.5.5.	Biacore Analyse Software	42
2.2.5.6.	Statistische Auswertung	42
3.	Ergebnisse	43
3.1.	Der AKAP79 Pro100Leu Polymorphismus.....	43
3.1.1.	Genetische Typisierung des AKAP79 Pro100Leu Polymorphismus.....	44
3.1.1.1.	Erstellung eines Typisierungsprotokolls am Beispiel des AKAP79 Pro100Leu Polymorphismus.....	45
3.1.1.2.	Typisierung und Vergleich dreier Probandenkohorten	46
3.1.1.2.1.	Der AKAP79 Pro100Leu SNP in der NG (NeuroGen) –Kohorte	46
3.1.1.2.2.	Der AKAP79 Pro100Leu SNP in der mbm (Magdeburg–Berlin–Magdeburg) –Kohorte	47
3.1.1.2.3.	Der AKAP79 Pro100Leu SNP in der BPS (Borderline Persönlichkeitsstörung) –Kohorte	47
3.1.1.2.4.	Ermittlung des Hardy–Weinberg Gleichgewichts des AKAP79 Pro100Leu SNPs in den drei Kohorten	50
3.1.3.	Korrelation der genetischen Daten mit Ergebnissen aus der Neuropsychologie	51
3.2.	Vergleich der Expression und Lokalisation beider AKAP79 Allele	52
3.2.1.	AKAP79 Klonierung und Expression in Cos7–Zellen.....	52
3.2.2.	Untersuchung der Assoziation der AKAP79–Varianten mit Membranen.....	54

3.2.3.	AKAP79–Expression in primären Neuronen und Co–Lokalisation mit dem postsynaptischen Markerprotein Homer.....	60
3.3.	AKAP79/150 und seine Bindungspartner.....	61
3.3.1.	AKAP79/150 und CaM.....	61
3.3.1.2.	Experimentell ermittelte CaM–Bindungsdomänen in AKAP79	63
3.3.1.3.	Quantitative Untersuchung der Interaktion der AKAP79–B–Domäne mit Calmodulin mittels Pulldown–Assays.....	64
3.3.1.4.	Calciumabhängigkeit der Interaktion zwischen Calmodulin und AKAP79–B–Varianten	68
3.3.1.5.	Qualitative und quantitative Analyse der Interaktion zwischen AKAP79–B und CaM mittels <i>Surface Plasmon Resonance</i> Biosensoren	69
3.3.2.	AKAP79/150 und Caldendrin.....	73
3.3.2.1.	Caldendrin bindet an AKAP79	73
3.3.2.2.	Calciumabhängigkeit der Interaktion zwischen Caldendrin und AKAP79.....	76
3.3.2.3.	AKAP79–B und Caldendrin binden direkt aneinander.....	77
3.3.2.4.	Qualitative und quantitative Analyse der Interaktion zwischen AKAP79–B und Caldendrin mittels <i>Surface Plasmon Resonance</i>	79
3.3.2.5.	Hinweise auf eine <i>in–vivo</i> Interaktion zwischen Caldendrin und AKAP79/150	84
3.3.3.	Vergleich der essentiellen Bindungssequenzen von Calmodulin und Caldendrin in AKAP79.....	88
3.3.4.	Kompetition von Calmodulin und Caldendrin um die Bindung an AKAP79–B	90
4.	Diskussion.....	93
4.1.	CaM bindet an AKAP79–B	93
4.2.	Caldendrin, ein neuer Interaktionspartner von AKAP79/150	94
4.3.	Zwei Bindungspartner an der gleichen Stelle – mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften.....	94
4.4.	Die Ménage–à–trois zwischen Caldendrin, CaM und AKAP79/150.....	97
4.5.	Die Liason der drei Proteine im zellulärem Kontext	98
4.6.	AKAP79/150 in der PSD – Funktionelle Aspekte	100
4.7.	Unterschiede und Gemeinsamkeiten beider AKAP79–Allele.....	101
4.8.	Schlussfolgerung und Ausblick	103
5.	Referenzen	106
	Abkürzungsverzeichnis.....	113
	Abbildungsverzeichnis	115
	Tabellenverzeichnis	118
	Gleichungsverzeichnis.....	121

Erklärung zur eigenständigen Abfassung der Arbeit	122
Lebenslauf	123
Publikationen	124

Zusammenfassung

Das Adapterprotein AKAP79/150 ist eine wichtige Komponente im Proteinnetzwerk der postsynaptischen Dichte. Eine seiner wichtigsten Funktionen ist die Verankerung von Proteinkinasen und -phosphatasen in der Nähe ihrer postsynaptischen Substrate.

Im humanen AKAP79 existiert ein genetischer Polymorphismus, welcher in einem Aminosäureaustausch von einem Prolin zu einem Leucin an Position 100 im AKAP79 resultiert (AKAP79 Pro100Leu). Eine von der Arbeitsgruppe „Imaging Genetics“ des Leibniz-Institut für Neurobiologie Magdeburg durchgeführte Studie hat verhaltensbiologische Unterschiede bei Trägern des Leucin-Allels im Vergleich zu Prolin-Allel-Trägern gezeigt. In der vorliegenden Arbeit wurde nach zellbiologischen und proteinbiochemischen Unterschieden zwischen den AKAP79-Allelen gesucht, um den Mechanismus der gefundenen verhaltensbiologischen Unterschiede zu ergründen.

Ein zellbiologischer Unterschied wurde in der Co-Lokalisation der beiden AKAP79-Allele mit dem postsynaptischen Protein Homer gefunden. Die Ursache für die verstärkte Co-Lokalisation des Leucin-Allels mit Homer ist allerdings noch unklar.

In Bindungsstudien mit AKAP79 wurde außerdem ein neuer Bindungspartner identifiziert, das Ca^{2+} -Sensor-Protein Caldendrin. Die Interaktion wurde mit Hilfe von Pulldown-Experimenten, *Surface Plasmon Resonance*-Messungen, Co-Immunpräzipitationen und immunocytochemischen Co-Färbungen primärer Neurone extensiv untersucht und mit der bereits bekannten Interaktion zwischen AKAP79 und Calmodulin, einem weiteren Ca^{2+} -Sensor-Protein, verglichen.

Es stellte sich heraus, dass sich die Bindungssequenzen beider Ca^{2+} -Sensor-Proteine überlappen und beide miteinander um die Bindung an AKAP79 konkurrieren, obwohl Caldendrin im Vergleich zu Calmodulin eine N-terminal verlängerte Bindungssequenz benötigt. *Surface Plasmon Resonance*-Messungen zeigten verschiedene Bindungskinetiken und Bindungsmechanismen für beide Interaktionen. Die Interaktion zwischen Caldendrin und AKAP79 ist ungewöhnlich stabil, wohingegen die On/Off-Raten der Bindung von Calmodulin an AKAP79 sehr hoch sind.

Im Gegensatz zur Bindung von Calmodulin an AKAP79, welche komplett Ca^{2+} -abhängig ist, reagiert die Bindung zwischen Caldendrin und AKAP79/150 zwar Ca^{2+} -sensitiv, kann aber auch in Abwesenheit von Ca^{2+} etabliert werden.

Aufgrund der Unterschiede kann davon ausgegangen werden, dass die gefundene neue Interaktion mit Caldendrin zellbiologisch andere Funktionen erfüllt als die Interaktion von AKAP79 mit Calmodulin.

Diese Arbeit liefert weitere Erkenntnisse über das Adapterprotein AKAP79/150, den Einfluss eines Aminosäureaustauschs auf seine Integration in der postsynaptischen Dichte und seine Funktion als Interaktionspartner zweier konkurrierender Ca^{2+} -Sensor-Proteine.

Abstract

The adaptor protein AKAP79/150 is a key component in the protein network of the postsynaptic density. One of its main functions is the anchoring of protein kinases and phosphatases close to their postsynaptic substrates.

The human AKAP79 harbors a genetic polymorphism that results in an amino acid exchange from a proline to a leucine at position 100 in the AKAP79 protein (AKAP79 Pro100Leu). A study conducted by the group “imaging genetics” at the Leibniz–Institute for Neurobiology Magdeburg showed behavioral differences between the leucine allele carriers compared to the proline allele carriers. The present study was undertaken to search for cell biological and protein biochemical differences between both AKAP79 alleles in order to elucidate the mechanism that might cause the behavioral differences found by the neuropsychological study.

One cell–biological discrepancy was found in the co–localization of the two AKAP79 alleles with the postsynaptic protein Homer. However, the reason of the increased co–localization of the leucine allele with Homer remains unclear.

Furthermore, a novel interaction has been discovered between AKAP79/150 and the Ca^{2+} sensor protein Caldendrin. This interaction was extensively studied by means of pull–down experiments, surface plasmon resonance measurements, co–immunoprecipitations and immunocytochemical co–stainings of primary neurons, and compared with the established interaction between AKAP79 and Calmodulin.

It turned out that the binding sequences of both Ca^{2+} sensor proteins overlap and that they compete for binding to AKAP79, although Caldendrin needs an N–terminally extended binding sequence compared to Calmodulin. Surface plasmon resonance measurements showed different binding kinetics and binding mechanisms for both interactions. The interaction between AKAP79 and Caldendrin is unusually stable, whereas the on/off rates of binding of Calmodulin to AKAP79 are very fast.

In contrast to the binding of Calmodulin to AKAP79, which is completely Ca^{2+} –dependent, the binding between Caldendrin and AKAP79/150 can be established in the absence of Ca^{2+} , although it is sensitive to low Ca^{2+} concentrations.

Because of the differences it can be assumed that the binding between AKAP79/150 and Caldendrin serves cell biological functions other than the interaction between AKAP79 and Calmodulin.

Thus, this work provides further insight into the functions of the adaptor protein AKAP79/150, into the influence of an amino acid exchange on its integration in the postsynaptic density, and into its function as an interaction partner of two competing Ca^{2+} –sensor proteins.

1. Einleitung

1.1. Signalweiterleitung zwischen Neuronen – die Postsynaptische Dichte als signalintegrierende Einheit

Exzitatorische Synapsen sind hoch spezialisierte Verbindungen zwischen erregenden Neuronen im zentralen Nervensystem. Ausgelöst durch ein axonal ankommendes Aktionspotential werden chemische Neurotransmitter, beispielsweise Glutamat, aus Vesikeln an der präsynaptischen Membran des sendenden Neurons ausgeschüttet und diffundieren durch den synaptischen Spalt zur postsynaptischen Membran des Empfängerneurons. Hier binden sie an spezifische glutamaterge Rezeptoren und initiieren die Öffnung von Ionenkanälen (Kornau 2009). Die Signalweiterleitung innerhalb des Empfängerneurons wird unterstützt durch ein Netzwerk interagierender Proteine. Bei Betrachtung im Elektronenmikroskop erscheint die postsynaptische Membran mit dem darunter liegenden Netzwerk als elektronendichte Struktur und wurde infolge dessen als Postsynaptische Dichte (PSD) bezeichnet (Palade 1954). In Proteomstudien wurden mehrere hundert verschiedene Proteine in der PSD identifiziert, darunter Glutamatrezeptoren, Ionenkanäle, Zelladhensionsmoleküle, Gerüst- und Adapterproteine, Proteine des Cytoskeletts und signalübermittelnde Proteine (Kim & Sheng 2009).

Das an der Präsynapse exozytierte Glutamat trifft auf der postsynaptischen Seite auf zwei Klassen glutamaterger postsynaptischer Rezeptoren, ionotrope Glutamatrezeptoren, wozu der AMPA (α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol Propionsäure/-acid) und der NMDA (N-Methyl-d-Aspartat) -Rezeptor gehören, und Typ I metabotrope Glutamatrezeptoren (Ehlers 1999). Erstere sind glutamatgesteuerte Ionenkanäle, zuständig für die schnelle, synaptische Signalweiterleitung und den Ioneneinstrom über die postsynaptische Membran. Typ I metabotrope Glutamatrezeptoren sind vorwiegend am Rand der PSD lokalisiert. Sie sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren, welche über die Synthese von Inositol-1,4,5,-triphosphat (IP_3) die Ausschüttung von Calcium-Ionen (Ca^{2+}) aus intrazellulären Speichern bewirken und darüber die synaptische Erregbarkeit und Transmission beeinflussen (Kornau 2009). Die Stärke der synaptischen Transmission wiederum ist proportional zur Anzahl an AMPA-Rezeptoren. Sie sind es, welche direkt auf die extrazelluläre Bindung von Glutamat mit der Öffnung ihres Ionenkanals für Kationen (K^+ , Na^+ und Ca^{2+}) reagieren, wohingegen NMDA-Rezeptoren neben der Bindung von Glutamat gleichzeitig eine Depolarisation der Membran benötigen, damit ihr Ionenkanal vom blockierenden Magnesium befreit wird und Natrium- (Na^+) und Ca^{2+} -Ionen einströmen können (Nowak *et al.* 1984, Kornau 2009).

1.2. Langzeitpotenzierung und Langzeitdepression als Prozesse synaptischer Plastizität

Hochfrequente Depolarisation der postsynaptischen Membran hat einen verstärkten Einstrom von Ca^{2+} -Ionen durch die NMDA-Rezeptorionenkanäle zur Folge. Ca^{2+} fungiert als sekundärer

Botenstoff und führt über die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden zur Rekrutierung zusätzlicher AMPA-Rezeptoren und damit zu einer Verstärkung der synaptischen Transmission, welche als Langzeitpotenzierung (LTP) bezeichnet wird (Kornau 2009). Der dazu gegenläufige Prozess wird Langzeitdepression (LTD) genannt und durch niederfrequente Stimulation der postsynaptischen Membran ausgelöst (Bear & Malenka 1994, Lee *et al.* 2003). Beides sind Mechanismen synaptischer Plastizität, welche als Manifestation von Lern- und Gedächtnisprozessen auf zellulärer Ebene verstanden werden (Benfenati 2007, Howland & Wang 2008, Keith *et al.* 2012).

Grundlage der synaptischen Plastizität ist der Influx von Ca^{2+} -Ionen durch NMDA-Rezeptorionenkanäle, wobei die Eigenschaft des Rezeptors sich nur zu öffnen, wenn Glutamat-Signal und Änderung des Membranpotentials zusammenfallen, entscheidend ist (Malenka 1994, Howland & Wang 2008, Kornau 2009). NMDA-Rezeptoren sind eingebettet in das postsynaptische Netzwerk und somit direkt und indirekt verbunden mit diversen Signal- und Gerüstproteinen. Das vorrangige Resultat des Ca^{2+} -Influxes ist eine Veränderung des Phosphorylierungsstatus postsynaptischer Proteine, was wiederum Veränderungen in der Aktivität, im Bindungsverhalten und in der Lokalisation dieser Proteine zur Folge hat (Kornau 2009). Ein Effekt ist die Aktivierung der von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP)-abhängigen Proteinkinase (PKA, Proteinkinase A) und der MAP-Kinase Erk (MAPK) (Benfenati 2007). PKA phosphoryliert und aktiviert den Transkriptionsfaktor CREB1a, MAPK phosphoryliert und deaktiviert den Transkriptionsfaktor CREB2. Über die Aktivitätsregulierung der Mitglieder der CREB (*Ca²⁺/cAMP response element binding protein*)-Familie wird die Transkription CREB-gesteuerter Zielgene beeinflusst und damit die Expression einer Reihe von Proteinen, die zum Beispiel für die Proteinsynthese, für die synaptische Struktur und Funktion und für synaptisches Wachstum zuständig sind (Benfenati 2007). Auf diese Weise wird die LTP langfristig manifestiert.

Die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) ist ein weiteres Schlüsselenzym der LTP. Ausgelöst durch erhöhten Ca^{2+} -Influx und abhängig von der Bindung von Ca^{2+} /Calmodulin kann sie sich autophosphorylieren, wobei sie in einen konstitutiv aktivierten Zustand übergeht und wahrscheinlich als unmittelbares „molekulares Gedächtnis“ synaptischer Aktivität fungiert (Elgersma & Silva 1999, Benfenati 2007, Kornau 2009).

Letztendlich bestimmt die Anzahl, Kinetik, Öffnungswahrscheinlichkeit und Einzelkanalleitfähigkeit der AMPA-Rezeptoren die Stärke der schnellen synaptischen Transmission (Benke *et al.* 1998). AMPA-Rezeptoren sind Tetramere, die aus verschiedenen Kombinationen vier möglicher Untereinheiten zusammengesetzt sind, GluR1 – 4, welche dem Rezeptor jeweils spezifische Eigenschaften verleihen (Shepherd & Huganir 2007). Beispielsweise ist die AMPA-Rezeptor-Endozytose stark abhängig vom Vorhandensein der GluR2-Untereinheit, an welche Adapter der Clathrin-vermittelten Endozytose binden können (Howland & Wang 2008). Ein Fehlen der GluR2-Untereinheit ermöglicht die glutamat-induzierte Ca^{2+} -Permeabilität (Cull-Candy *et al.* 2006). Die Untereinheit GluR1 enthält zwei wichtige Phosphorylierungsstellen: GluR1-Serin831 (GluR1₈₃₁) kann von CaMKII und Ca^{2+} -abhängiger Proteinkinase (PKC, Proteinkinase C) und GluR1-Serin845 (GluR1₈₄₅) von PKA phosphoryliert werden (Lee *et al.* 2003). LTP ist assoziiert mit einem erhöhtem Phosphorylierungsstatus dieser Untereinheit, wohingegen LTD mit der Dephosphorylierung von GluR1 korreliert (Lee *et al.* 2003).

1.3. Ca^{2+} als sekundärer Botenstoff in der Synapse

Wie aus dem letzten Abschnitt ersichtlich, spielt Calcium eine wichtige Rolle bei der Regulation neuronaler Prozesse und synaptischer Plastizität. Deshalb wird die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration strikt reguliert. Sie wird im Ruhezustand sehr gering gehalten und liegt im nanomolaren Bereich (< 100 nM, laut Rosza et al. um die 40 nM) (Maravall *et al.* 2000, Eckel-Mahan & Storm 2008, Rosza *et al.* 2004). Extrazellulär hingegen liegt sie im Vergleich dazu um das 1000-fache höher (Eckel-Mahan & Storm 2008). Dieser steile elektrochemische Gradient zwischen intrazellulärem und extrazellulärem freiem Ca^{2+} wird erreicht, in dem Ca^{2+} aus dem Cytosol über SERCA (Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase) –Pumpen in das Endoplasmatische Reticulum (ER) aufgenommen, über Plasmamembranständige Ca^{2+} ATPasen (PMCA) in den Extrazellularraum abtransportiert oder von Ca^{2+} -bindenden Proteinen komplexiert wird (DeMarco & Strehler 2001, Berridge 1998).

Der postsynaptische Ca^{2+} -Influx erfolgt über spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle und die bereits erwähnten glutamatergen AMPA- und NMDA-Rezeptoren. Daneben wird Ca^{2+} intrazellulär im ER gespeichert und kann, ausgelöst durch Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Abgabe und/oder durch die Aktivierung Typ I metabotroper Glutamat Rezeptoren, welche eine Produktion von IP_3 in Gang setzen und damit den IP_3 -Rezeptor in der Membran des ER stimulieren, in das Cytosol freigesetzt werden (Berridge 1998, Kornau 2009). Daneben gibt es im ER Ryanodin-Rezeptoren, welche auf Grundlage eines cyclischen Adenosindiphosphat (ADP)-Ribose-Signals ebenfalls Ca^{2+} aus dem ER freisetzen können (Berridge 1998).

Lokalisation und Stärke des Ca^{2+} -Signals entscheiden darüber, ob die Synapse eine LTP oder eine LTD manifestiert (Eckel-Mahan & Storm 2008). Freies Ca^{2+} hat einen sehr geringen Diffusionsbereich, da es schnell gebunden und/oder abtransportiert wird (Eckel-Mahan & Storm 2008).

Es gibt spezialisierte Ca^{2+} -bindende Proteine, die eine Ca^{2+} -puffernde Wirkung haben, wie zum Beispiel Calretinin, Calbindin D-28K und Parvalbumin, oder im Ca^{2+} -gebundenen Zustand die Aktivität anderer Proteine beeinflussen (Eckel-Mahan & Storm 2008). Calmodulin und Caldendrin sind Beispiele für Ca^{2+} -Sensor-Proteine mit regulativer Funktion und werden in den folgenden beiden Kapiteln vorgestellt.

1.3.1. Das Ca^{2+} -Sensor Protein Calmodulin

Das Ca^{2+} -Sensor-Protein Calmodulin (CaM) wurde 1970 unabhängig von zwei Arbeitsgruppen gefunden (Cheung 1970, Kakiuchi & Yamazaki 1970). Es ist ein nur etwa 17 kDa großes, acides (mit einem Isoelektrischen Punkt pI von ~ 4) Protein, dessen Aminosäuresequenz ist in Vertebraten zu 100% konserviert ist (Friedberg 1990). Es enthält vier EF-Hand-Motive, welche die Bindung von jeweils einem Ca^{2+} -Ion vermitteln (Jurado *et al.* 1999, Eckel-Mahan & Storm 2008). Das EF-Hand-Motiv ist eine vor allem Ca^{2+} manchmal aber auch Magnesium (Mg^{2+}) komplexierende Helix-Loop-Helix Struktur, die weit verbreitet ist in Ca^{2+} -bindenden Proteinen (Kretsinger & Nockolds 1973, Lewit-Bentley & Rety 2000).

Calmodulin hat eine Ca^{2+} -Affinität von 5–10 μM (Mikhaylova *et al.* 2011), aber die Bindung eines Interaktionspartners, wie z.B. Myosin Light Chain Kinase, kann diese Affinität modulieren (Cox

1988). Die Bindung von Ca^{2+} hat eine starke Veränderung der Konformation von CaM zur Folge, wodurch es von der sogenannten geschlossenen zur offenen Form übergeht, so dass eine hydrophobe Bindungstasche für Effektorproteine zugänglich wird (Zhang *et al.* 1995, Ikura 1996). Hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem offenen CaM mit einer α -helikalen Struktur im Bindungspartner sind für die Interaktion verantwortlich (Ikura 1996).

Insgesamt wurden bisher schon mehr als 100 Ca^{2+} /CaM-regulierte Proteine identifiziert, darunter Enzyme wie CaMKII, die Phosphatase 2B/Calcineurin (PP2B/CaN) und die Adenylyl-Cyclasen (AC) 1 und 8, welche, gesteuert über die Bindung von Ca^{2+} /CaM, Prozesse der LTP koordinieren (Berridge 1998, Xia & Storm 2005).

Darüber hinaus bindet CaM an Gerüst- und Adapterproteine wie das A-Kinase Anker-Protein 79/150 (AKAP79/150). Diese Gerüst-/Adapterproteine wirken wie Plattformen, an denen etliche Proteine unterschiedlichster Funktionen verankert sind. Sie dienen dazu, CaM in unmittelbarer Nähe seiner Interaktionspartner zu lokalisieren.

Im Falle von AKAP79/150 ist bekannt, dass CaM Ca^{2+} -abhängig im N-terminalen Abschnitt des Adapterproteins bindet (Faux & Scott 1997). An AKAP79/150 gebundene PKC wird durch die Bindung im inaktiven Zustand gehalten. Für diese PKC-Inaktivierung genügt ein die Aminosäuren 31–52 umfassendes AKAP79-Peptid (AKAP79_{31–52}). Die Zugabe von CaM zu einer Lösung mit PKC und entweder dem kompletten AKAP79-Protein oder dem AKAP79_{31–52}-Peptid, erhöht die PKC-Aktivität in der Lösung (Faux & Scott 1997). Außerdem verhindert die Zugabe von Ca^{2+} /CaM die Co-Immünpräzipitation von PKC mit rekombinantem AKAP79 (Faux & Scott 1997). *Surface Plasmon Resonance* (SPR) –Messungen mit immobilisiertem CaM und löslichem AKAP79 ergaben eine Dissoziationskonstante von $K_D = 28 \pm 4$ nM im Beisein von Ca^{2+} . Die Messergebnisse zeigen ein zweiphasiges Bindungsverhalten, was auf mehr als eine Bindungsstelle hinweisen könnte (Faux & Scott 1997).

Auch der IP_3 -Rezeptor wird, neben IP_3 , durch die Bindung von Ca^{2+} /CaM reguliert (Berridge 1998, Kasri *et al.* 2004, Haynes *et al.* 2004). Neben CaM gibt es an dieser Stelle allerdings ein zweites Ca^{2+} -Sensor Protein, welches an der Regulation des IP_3 -Rezeptors beteiligt ist. Caldendrin ist der nächste Verwandte des CaM und bindet ebenfalls den Rezeptor (Haynes *et al.* 2004, Kasri *et al.* 2004).

1.3.2. Das Ca^{2+} -Sensor-Protein Caldendrin

Caldendrin gehört zur Gruppe der neuronalen Ca^{2+} -Sensor (NCS) Proteine, welche vor allem im Gehirn exprimiert sind und dort spezifische neuronale Prozesse steuern (Seidenbecher *et al.* 1998, Dieterich *et al.* 2008). Es ist im somato-dendritischen Bereich prinzipaler Neurone in Hirnstrukturen mit laminarer Struktur, wie zum Beispiel dem Cortex, dem Hippocampus und dem Cerebellum, zu finden (Seidenbecher *et al.* 1998, Laube *et al.* 2002, Seidenbecher *et al.* 2004).

In seiner C-terminalen Hälfte weist das Protein Caldendrin große Aminosäuresequenz-Ähnlichkeit und eine hohe Übereinstimmung mit CaM auf (Abb. 1). Hier ähnelt Caldendrin dem CaM zu 62% und die Übereinstimmung beträgt 39% (Laube *et al.* 2002). Damit ist Caldendrin der nächste bekannte neuronale Verwandte des CaM (Laube *et al.* 2002).

Der N-terminale Teil von Caldendrin hingegen ist einzigartig und hat keine Ähnlichkeit mit anderen bekannten Proteinen (Seidenbecher et al. 1998).

Wie CaM beherbergt Caldendrin vier EF-Hand-Motive im C-terminalen CaM-ähnlichen Teil, die sich, ebenfalls ähnlich wie im CaM, zu jeweils zwei Paaren organisieren (Abb. 1). Allerdings hat sich die zweite EF-Hand als kryptisch erwiesen – sie kann kein Ca^{2+} binden (Laube et al. 2002, Seidenbecher et al. 1998, Wingard et al. 2005). Die EF-Hände 3 und 4 binden kooperativ und mit hoher Affinität Ca^{2+} ($K_D = 2\text{--}2,5 \mu\text{M}$) (Wingard et al. 2005, Mikhaylova et al. 2006). EF-Hand 1 kann entweder ein Ca^{2+} - oder ein Mg^{2+} -Ion binden, allerdings mit wesentlich geringerer Affinität im Vergleich zu EF-Hand 3 und 4 ($K_{D_Ca^{2+}} = 50\text{--}100 \mu\text{M}$, $K_{D_Mg^{2+}} = 300 \mu\text{M}$) (Wingard et al. 2005, Park et al. 2011).

Die beiden EF-Hand-Paare sind getrennt durch einen α -helikalen Abschnitt, welcher in Caldendrin vier Aminosäuren mehr enthält als in CaM (Abb. 1). Diese vier Aminosäuren entsprechen einer kompletten α -helikalen Umdrehung und machen diese Bindungstasche zwischen den EF-Hand-Paaren in Caldendrin größer und demzufolge wahrscheinlich flexibler als in CaM (Seidenbecher et al. 1998, Laube et al. 2002, Haeseleer et al. 2000). Insgesamt scheint der C-terminale Teil dem CaM in seiner Struktur sehr ähnlich sein (Findeisen & Minor 2010, Park et al. 2011), jedoch könnten die zusätzlichen Aminosäuren auch eine U-Form im verbindenden Abschnitt fördern und eine intramolekulare Interaktion zwischen den EF Hand Paaren ermöglichen, wie es beim Recoverin der Fall ist, einem weiteren Mitglied der NCS Familie (Wingard et al. 2005).

Caldendrin und CaM unterscheiden sich auch in ihrer Oberflächenladung, welche von dem Charakter der zur Oberfläche weisenden Aminosäurereste bestimmt wird (Seidenbecher et al. 2002).

Caldendrin weist insgesamt eine zweigeteilte Struktur auf. Der N-terminale Teil ist stark basisch, mit einem pI von 11,9, wohingegen die C-terminale Hälfte mit einem pI von 4,5 sauer ist. Intramolekulare Interaktionen zwischen beiden Proteinhälften sind somit wahrscheinlich und könnten Auswirkungen auf die Eigenschaften des Proteins haben (Seidenbecher et al. 1998).

Aufgrund von alternativem Splicing hat Caldendrin zwei weitere Isoformen, Caldendrin-S1 (S-CaBP1) und Caldendrin-S2 (L-CaBP1), beide hiernach zusammenfassend als CaBP1 (Ca^{2+} binding protein 1) bezeichnet. Sie unterscheiden sich in der Länge und Sequenz ihres N-Terminus, sind aber in ihrem C-terminalen, CaM-ähnlichen Teil identisch (Laube et al. 2002, Seidenbecher et al. 2002, Haeseleer et al. 2000). Diese Isoformen sind vorwiegend in der Retina und im adulten Cerebellum anzutreffen und in anderen Hirnregionen sehr selten. Das unterscheidet sie von Caldendrin, welches in Hirnregionen mit laminarem Aufbau zu finden ist, das heißt neben dem Cerebellum unter anderem auch im Hippocampus und im Cortex (Laube et al. 2002, Seidenbecher et al. 2002, Haeseleer et al. 2000).

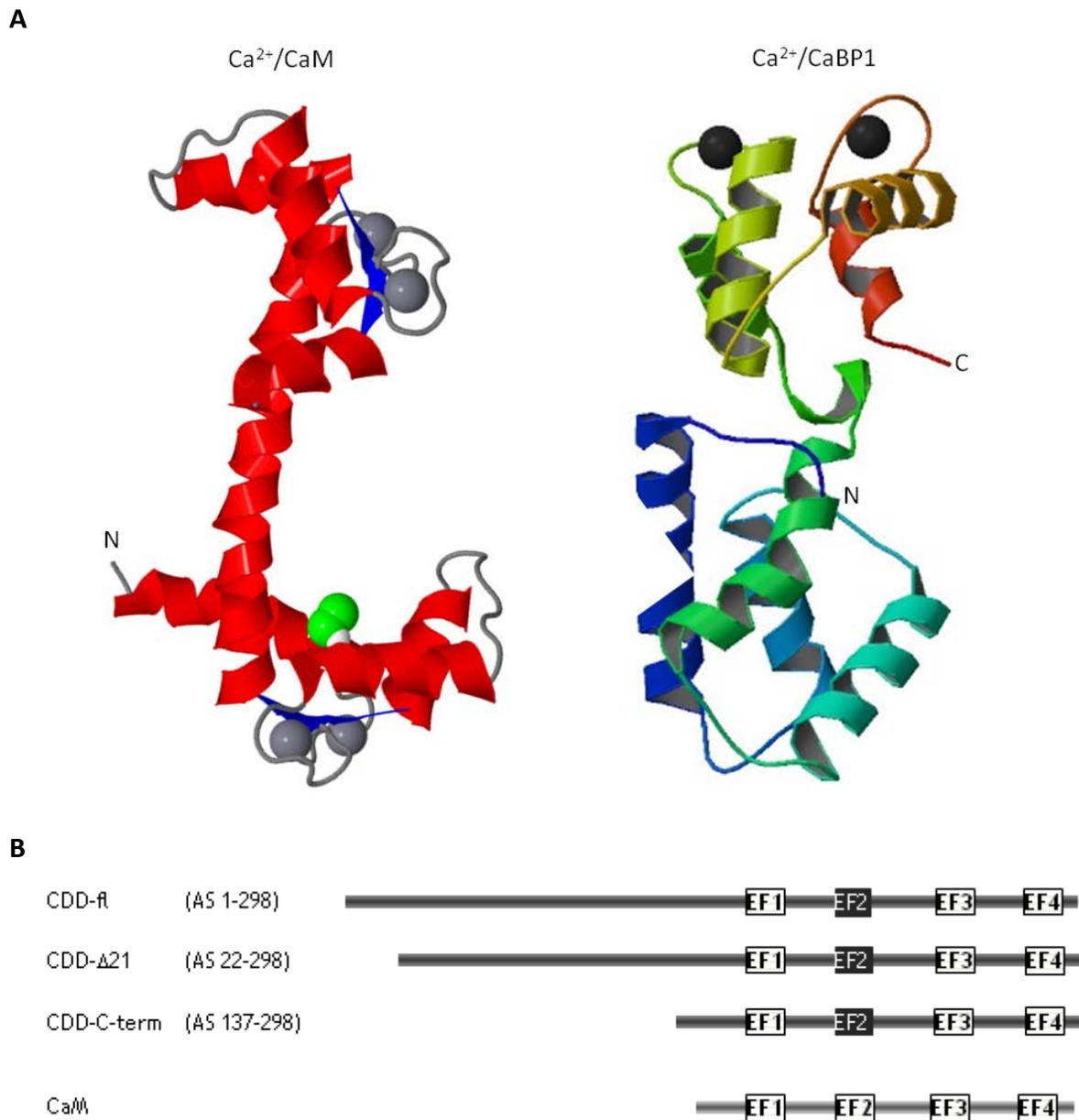


Abb. 1: Strukturelle und Schematische Repräsentation von CaBP1/Caldendrin und CaM.

A) Kristallstruktur von Ca²⁺-gebundenem CaM und dem Ca²⁺-gebundenen C-terminalen, CaM-ähnlichen, die vier EF-Hände enthaltenden Teil der Caldendrin-Isoform Ca²⁺ binding protein 1 (CaBP1). Die abgebildete CaM-Struktur wurde von Chattopadhyaya mit einer Auflösung von 1,7 Å ermittelt (Chattopadhyaya *et al.* 1992), die CaBP1-Struktur von Findeisen und Minor (Findeisen & Minor 2010). Die Ca²⁺-Ionen sind als graue (CaM) bzw. schwarze (CaBP1) Kugeln dargestellt. α -Helices sind rot in CaM und unterschiedlich farbig in CaBP1, angefangen von der N-terminalen EF-Hand 1 in blau-hellblau über die kryptische EF-Hand 2 in türkis-lindgrün, zur EF-Hand 3 in hellgrün-gelb bis zur EF-Hand 4 in orange-rot. Die von Findeisen gefundene kristalline CaBP1-Struktur weicht von der vorher von Li und Kollegen beschriebenen, auf NMR (*nuclear magnetic resonance*) -Spektroskopie beruhenden Struktur ab, möglicherweise u.a. aufgrund der Kristallisation der apo-Form der EF-Hand 1 (Li *et al.* 2009). CaBP1 erscheint hier insgesamt kompakter, wobei die Linkerregion zwischen beiden EF-Hand-Paaren eine wesentlich höher geordnete Struktur aufweist, als durch NMR-Spektroskopie ermittelt. Dennoch bilden die EF-Hand-Paare, wie in CaM, relativ unabhängige keulenartige Domänen (Findeisen & Minor 2010). Das C-terminale CaBP1 EF-Hand-Paar ist dem des CaM in seiner Struktur sehr ähnlich (Findeisen & Minor 2010).

B) Caldendrin ist als *full-length* (CDD-fl), als um 21 Aminosäuren N-terminal gekürztes (CDD-Δ21) und als C-terminales (CDD-C-term) Protein schematisch dargestellt. Alle drei Proteine finden in den Experimenten dieser Arbeit Verwendung. CaM ist als *full-length* Protein schematisch dargestellt.

EF – EF-Hand 1–4. In Caldendrin ist die zweite EF-Hand (EF2) kryptisch und bindet kein Ca^{2+} . Im Schema ist sie deshalb schwarz unterlegt.

Das Protein Caldendrin migriert im SDS- (*sodium dodecyl sulfate*) Polyacrylamid-Gel in zwei Banden bei 33 und 36 kD. Nach einer Auftrennung löslicher und unlöslicher zellulärer Proteinfractionen stellte sich heraus, dass die 33 kD Bande sowohl in der löslichen als auch in der partikulären Fraktion zu finden ist, wohingegen die 36 kD Bande größtenteils auf die partikuläre, unlösliche Fraktion beschränkt zu sein scheint, was auf eine Assoziation vor allem der 36 kD Form mit dem Cytoskelett hinweist (Seidenbecher et al. 1998). Die verschiedenen Migrationsbanden und das veränderte Löslichkeitsverhalten von Caldendrin beruhen auf diversen Phosphorylierungen, die die 33 kD Form aufweisen kann. In 2D-Gelen findet man zumindest drei verschiedene Spots der 33 kD Form, die jeweils eine Verschiebung des isoelektrischen Punktes (pI) darstellen (Seidenbecher et al. 1998). Eine Phosphorylierung führt zu einer pI-Verschiebung um 0,1–0,3 Einheiten, da sie dem Protein eine negative Ladung hinzufügt (Garrison & Wagner 1982).

Wie schon erwähnt, wurden bisher über 100 Ca^{2+} /CaM regulierte Proteine gefunden. Da Caldendrin erst deutlich später entdeckt wurde und im Gegensatz zu CaM nicht ubiquitär sondern hirnspezifisch exprimiert ist, sind von Caldendrin wesentlich weniger Interaktionspartner bekannt. Zu den etablierten Caldendrin Bindungspartnern gehören LC3 (*light chain 3*), eine Komponente der Mikrotubuli-assoziierten Proteine 1A und 1B (Seidenbecher et al. 2004), der P/Q-Typ spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanal $\text{Ca}_v2.1$ (Lee et al. 2002), der L-Typ spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanal $\text{Ca}_v1.2$ (Zhou et al. 2004), der IP_3 -Rezeptor (Kasri et al. 2004) und das Signalprotein Jacob (Dieterich et al. 2008). Aus bisher unpublizierten Informationen der Arbeitsgruppe Neuroplast unter der Leitung von M. R. Kreutz, Leibniz-Institut für Neurobiologie Magdeburg, geht außerdem hervor, dass TRPC (*transient receptor potential cation*)-Kanäle, das Protein Esau und membranassoziierte Guanylat-Kinasen (MAGuKs) an Caldendrin binden.

Aufgrund ihrer Ähnlichkeit weisen Caldendrin und CaM einige Überlappungen ihrer Interaktionspartner auf, wie den schon erwähnten IP_3 -Rezeptor. Weitere Beispiele sind der P/Q-Typ Ca^{2+} -Kanal $\text{Ca}_v2.1$ und der L-Typ spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanal $\text{Ca}_v1.2$ (Lee et al. 2002, Zhou et al. 2004). Aber selbst im Falle kompletter Überlappung der Bindungsstelle kann die Bindung der beiden Ca^{2+} -Sensoren verschiedene Konsequenzen haben. Als Beispiel sei der L-Typ spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanal $\text{Ca}_v1.2$ angeführt. Die Bindung von CaBP1 an den Ca^{2+} -Kanal führt zu Ca^{2+} -abhängiger Faszilitierung, verlängertem Ca^{2+} -Einstrom und Verhinderung der Ca^{2+} -abhängigen Inaktivierung des Kanals. Die Bindung von Ca^{2+} /CaM hingegen bewirkt eine Verstärkung der Ca^{2+} -abhängigen Inaktivierung des Kanals (Zhou et al. 2004). Die Unterschiede in der Wirkung von CaM und Caldendrin/CaBP1 auf $\text{Ca}_v1.2$ beruhen auf dem N-terminalen EF-Hand-Paar und der Linkerregion zwischen beiden EF-Hand-Paaren in Caldendrin/CaBP1, wohingegen die C-terminalen EF-Hand-Paare beider Ca^{2+} -Sensoren die Ca^{2+} -abhängige Bindung an eine IQ-Domäne im $\text{Ca}_v1.2$ -Kanal mit ähnlicher Bindungsaffinität vermitteln und somit ähnliche Funktionen haben (Findeisen & Minor 2010). Es wurde gezeigt, dass N-terminales und C-terminales Caldendrin/CaBP1 EF-Hand-Paar unabhängig voneinander an die IQ-Domäne binden können und die Bindungsstellen überlappen. Da die Bindungsaffinität des CaM-ähnlichen C-terminalen EF-Hand-Paars für die IQ-Domäne 100-fach höher liegt als die des N-terminalen EF-Hand-Paars, verhindert das C-terminale EF-Hand-Paar die Bindung seiner

N-terminalen Nachbarsequenz und kann diese von der IQ-Domäne verdrängen (Findeisen & Minor 2010).

Auf der Ähnlichkeit beider Ca^{2+} -Sensoren beruht die Hypothese, dass AKAP79/150, ein weiteres und bisher nur als CaM-Interaktionspartner bekanntes postsynaptisches Adapterprotein, auch mit Caldendrin interagieren könnte. Dieses Adapterprotein wird im folgenden Kapitel vorgestellt.

1.4. Das Adapterprotein AKAP79/150

Proteinkinasen und -phosphatasen haben multiple Substrate, deren Aktivität oder Bindungseigenschaften sie durch Phosphorylierung oder Dephosphorylierung beeinflussen. Eine erhöhte Substratspezifität kann durch eine restriktive Lokalisation der Enzyme innerhalb der Zelle vermittelt werden. Adapter- und Gerüstproteine erweisen sich als Plattformen, welche die Enzyme in spezifischen subzellulären Kompartimenten in der Nähe bestimmter Substrate verankern (Dell'Acqua *et al.* 1998). Eines dieser Adapterproteine ist das A-Kinase Anker-Protein AKAP79/150.

Das Rinder-Orthologe AKAP75 wurde im Jahr 1984 von Sakar *et al.* als PKA- und CaM-bindendes Protein im Rinderhirn entdeckt (Sarkar *et al.* 1984). 1989 wurde das orthologe Protein AKAP150 in Nagern beschrieben (Bregman *et al.* 1989), und im Jahr 1992 folgte die Entdeckung und Charakterisierung vom humanen Orthologen AKAP79 (Carr *et al.* 1992).

Die Orthologe werden vom Intron-losen AKAP5-Gen kodiert. Sie variieren entsprechend ihres Namens in ihrem Molekulargewicht, wobei AKAP150 eine repetitive Sequenz unbekannter Funktion enthält, die für das wesentlich höhere Molekulargewicht im Vergleich zum humanen und bovinen AKAP79/75 verantwortlich ist (Bregman *et al.* 1989, Keith *et al.* 2012).

AKAP79/150 ist vor allem im Gehirn exprimiert, wurde aber u.a. auch in der Lunge, im Herzen, in der Schilddrüse und endogen in HEK293-Zellen gefunden (Bregman *et al.* 1989, Carr *et al.* 1992, Hirsch *et al.* 1992, Scott & Santana 2010). Im Gehirn konzentriert sich die Expression in der Großhirnrinde, im Hippocampus sowie in weiteren Vorderhirnregionen (Glantz *et al.* 1993, Carr *et al.* 1992).

Der N-terminale Teil von AKAP79/150 umfasst drei überwiegend α -helikale polybasische Domänen (A, B und C, Abb. 2), welche über die Assoziation mit dem Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) (Dell'Acqua *et al.* 1998), dem Actin-Cytoskelett (Li *et al.* 1996, Gomez *et al.* 2002) und Cadherin-Adhesionsmolekülen (Gorski *et al.* 2005) die subzelluläre Lokalisation vermitteln. Außerdem können zwei Cysteinreste, C36 und C129, im N-terminalen AKAP79-Teil palmitoyliert werden, was zu einer Assoziation mit Lipid Rafts führt (Delint-Ramirez *et al.* 2011). AKAP79-Palmitoylierung und anschließende Lokalisation wird durch die neuronale Aktivität gesteuert und ist mit synaptischem Wachstum und LTP-induziertem AMPA-Rezeptor-Transport assoziiert (Keith *et al.* 2012).

Neben der für seinen Namen verantwortlichen Bindung an PKA bindet AKAP79/150 die PKC (Klauck *et al.* 1996, Faux *et al.* 1999) und die Proteinphosphatasen 1 (PP1) und 2B/Calcineurin (PP2B/CaN) (Coghlan *et al.* 1995b, Coghlan *et al.* 1995a, Dell'Acqua *et al.* 2002, Le *et al.* 2011). Durch Bindung an die MAGuKs PSD-95 (SAP90) und SAP97 stehen AKAP79/150 und die daran gebundenen Enzyme in Verbindung mit AMPA- und NMDA-Rezeptoren in der PSD (Colledge *et*

al. 2000). Untereinheiten beider Rezeptoren sind Substrate der an AKAP79/150 gebundenen Kinasen und Phosphatasen und es konnte gezeigt werden, dass ihre Verankerung durch AKAP79/150 für die phosphorylierungsabhängige Regulation von AMPA-Rezeptoren während synaptischer Plastizität verantwortlich ist (Rosenmund *et al.* 1994, Snyder *et al.* 2005, Tavalin 2008, Dell'Acqua *et al.* 2006).

Über MAGuKs ist AKAP79/150 des Weiteren assoziiert mit dem Beta-1-adrenergen Rezeptor (Gardner *et al.* 2007), wohingegen der Beta-2-adrenerge Rezeptor direkt an AKAP79/150 bindet (Fraser *et al.* 2000). Darüber hinaus binden der M-Typ K⁺-Kanal KCNQ2/3 und der L-Typ spannungsgesteuerte Ca²⁺-Kanal Ca_v1.2 direkt an AKAP79/150, letzterer über ein modifiziertes Leucin-Zipper Motiv am C-terminalen Ende von AKAP79/150 (Higashida *et al.* 2005, Oliveria *et al.* 2007).

Zum Abschluss ist die erst vor einigen Jahren entdeckte Interaktion zwischen AKAP79/150 und den Adenyl-Cyclase Isoformen 5 und 6 zu nennen (Bauman *et al.* 2006, Efendiev *et al.* 2010). Somit schlägt AKAP79/150 eine Brücke zwischen den cAMP-generierenden Adenylatcyclasen und einem der prominentesten cAMP-regulierten Proteine, der PKA.

Kürzlich wurde gezeigt, dass AKAP79 sich zu Homodimeren und sogar höher oligomeren Strukturen zusammenlagern kann (Gold *et al.* 2011, Gao *et al.* 2011). Auf diese Weise entsteht ein hochmolekulares Netzwerk aus AKAP79/150 und seinen Bindungspartnern, welches zur Integration postsynaptischer Signale beiträgt.

Abbildung 2 zeigt eine schematische Übersicht von AKAP79/150 und den wichtigsten damit assoziierten Proteinen.

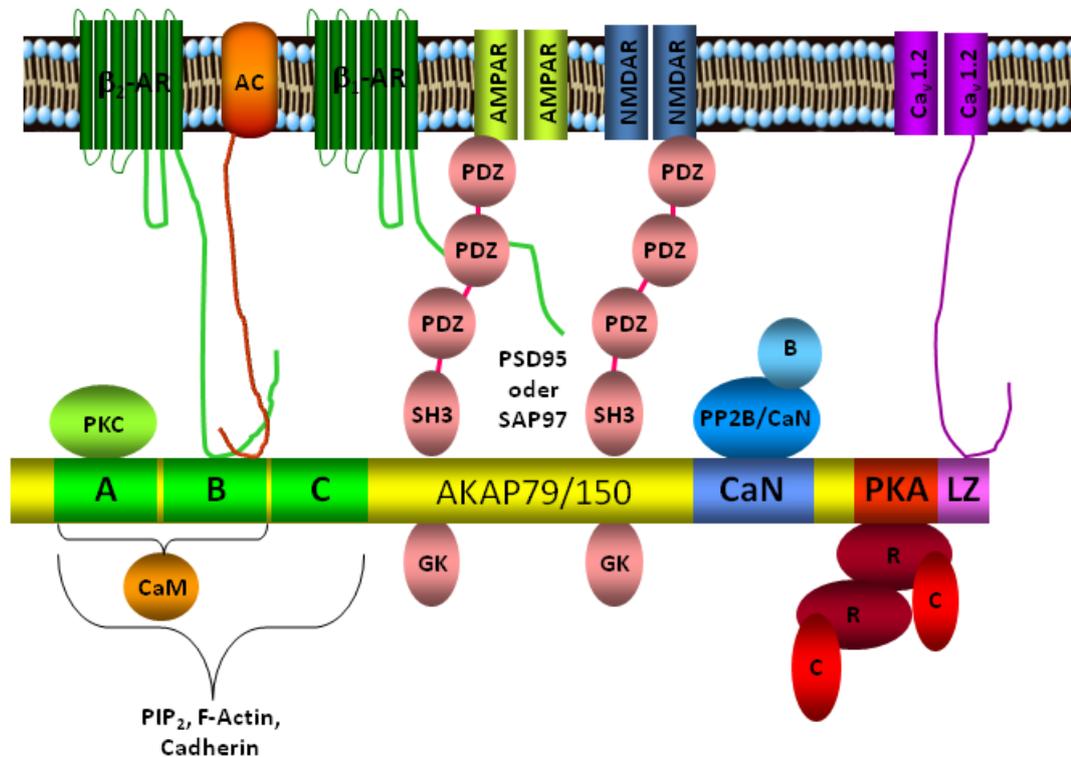


Abb. 2: Schematische Darstellung von AKAP79/150 und seinen wichtigsten Bindungspartnern.

AKAP79/150 ist als gelber Balken dargestellt. In diesem sind N-terminal drei polybasische überwiegend als α -Helices vorliegende Domänen A, B und C grün hervorgehoben. Proteinkinase C (PKC, hellgrün) bindet an die A-Domäne. Calmodulin (CaM, orange) bindet an den N-terminalen Teil, mit vorhergesagten Bindungsstellen in der A- und B-Domäne. Auch der Beta-2-adrenerge Rezeptor (β 2-AR, dunkelgrün), Adenylatcyclasen (AC, dunkelorange), Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2), F-Actin und Cadherin binden an den N-terminalen Teil von AKAP79/150. Im zentralen Teil von AKAP79/150 binden die membranassoziierten Guanylat-Kinasen (MAGuKs) PSD-95 (SAP90) und SAP97 (beide in rosa). Über diese ist AKAP79/150 mit dem Beta-1-adrenergen Rezeptor (β 1-AR, dunkelgrün) und den Glutamat-Rezeptoren AMPAR (α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol Propionsäure/-acid Rezeptor, gelbgrün) und NMDAR (N-Methyl-d-Aspartat Rezeptor, blau) assoziiert. Im C-terminalen Teil von AKAP79/150 binden die Proteinphosphatase 2B/Calcineurin (PP2B/CaN, blau) und die Proteinkinase A (PKA, rot). Am C-terminalen Ende weist AKAP79/150 ein Leucin-Zipper-Motiv (LZ, lila) auf, an welches der L-Typ spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanal $\text{Ca}_v1.2$ ($\text{Ca}_v1.2$, violett) bindet.

1.5. Der Pro100Leu Polymorphismus im humanen AKAP5 Gen

Das humane AKAP5 Gen ist auf Chromosom 14q23.3 lokalisiert. Es ist ein Intron-loses Gen und umfasst 1284 Basenpaare im Offenen Leseraster vom Translationsstart- bis zum Stopp-Codon, womit es für ein 427 Aminosäuren großes Protein kodiert (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/M90359>).

In diesem Gen waren zu Beginn der vorliegenden Doktorarbeit vier missense bzw. nicht-synonyme SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*, Punktmutationen) identifiziert, unter diesen der Pro100Leu Polymorphismus (rs2230491), der Ser205Phe Polymorphismus (rs 2230492) und der Glu314Lys Polymorphismus (rs 34433837). Laut der ncbi-Datenbank sind die beiden letzteren SNPs im Vergleich zum Pro100Leu Polymorphismus allerdings sehr selten und wurden bisher nicht in der europäischen Bevölkerung angetroffen.

Menschen unterscheiden sich im Durchschnitt in 0,1% ihres Genoms (HapMap 2003). Etwa 90% dieser genetischen Variabilität ist auf SNPs zurückzuführen (HapMap 2003). Sie bezeichnen den Austausch eines einzelnen Nukleotids und ihre Anzahl im menschlichen Genom wird auf 10 Millionen geschätzt, sodass man im Durchschnitt auf einen SNP innerhalb von 300 Basenpaaren kommt (HapMap 2003).

Ob ein SNP einen Einfluss auf die Produktion, Struktur, Stabilität und/oder Funktion eines Proteins hat, hängt von verschiedenen Faktoren ab, zum Beispiel, ob die Basenpaar-Substitution innerhalb genetisch kodierender oder in nicht-kodierenden Regionen liegt.

Die meisten bekannten Punktmutationen sind unauffällig, aber daneben gibt es einzelne SNPs, die drastische Auswirkungen haben. Zum Beispiel steigt das Risiko, an Alzheimer zu erkranken, von 20% auf 90% und das Alter des erstens Auftretens dieser Krankheit sinkt von 84 auf 68 Jahre, sobald das APOE Gen, welches für das Apolipoprotein E kodiert, zwei SNPs aufweist, die in einem Aminosäureaustausch an den Positionen 112 und 158 von Cystein zu Arginin resultieren (Corder *et al.* 1993).

Einige SNPs haben einzeln betrachtet minimale Effekte auf eine bestimmte Funktion des Gesamtorganismus Mensch, aber mehrere dieser SNPs zusammengenommen tragen zur Verwirklichung der Individualität eines jeden Menschen bei.

Eine missense Mutation bezeichnet einen nicht-synonymen SNP in einem Exon, in dessen Konsequenz eine Aminosäure durch eine andere ausgetauscht ist.

Im AKAP79 Pro100Leu Polymorphismus ist an Aminosäureposition 100 ein Prolin gegen ein Leucin ausgetauscht. Der SNP beruht auf einem Basenaustausch an Nucleotid-Position 299 des Offenen Leserasters, an welcher ein Cytosin durch ein Thymin ersetzt wird. Das seltenere Thymin-Allel tritt laut ncbi mit einer Häufigkeit von 14,6% in der europäischen Bevölkerung auf (HapMap CEU).

In der neutralen, hydrophoben Aminosäure Prolin bindet die normalerweise freie primäre Aminogruppe an die Seitenkette und bildet mit ihr eine zyklische Iminogruppe, eine Ringstruktur, sodass diese Aminosäure als Mitglied einer Aminosäurekette einen spezifischen, relativ starren Winkel bildet und weniger flexibel ist als andere Aminosäuren (Abb. 3). Durch den Ringschluss fehlt dem Prolin auch der freie Amidwasserstoff, welcher in anderen Aminosäuren Wasserstoffbrücken ausbilden kann. Die Folge ist meist eine Unterbrechung der jeweiligen Sekundärstruktur des Proteins, ob α -Helix oder β -Faltblatt, zugunsten einer Biegung.

Leucin ist ebenfalls neutral und hydrophob (Abb. 3). Mit seiner hydrophoben Seitenkette kann es in Wechselwirkung treten mit anderen hydrophoben Seitenketten und damit spezifische Strukturen, zum Beispiel α -Helices, innerhalb eines Proteins mit ausbilden und stabilisieren.

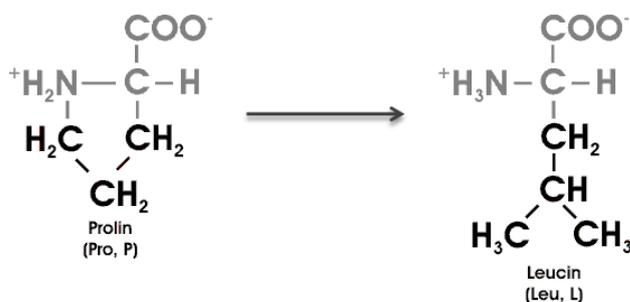


Abb. 3: Strukturformeln der im AKAP79 Pro100Leu SNP gegeneinander ausgetauschten Aminosäuren Prolin und Leucin.

Hellgrau: Amino(-carbon-)säuren besitzen ein zentrales Kohlenstoffatom (C), an dem grundsätzlich eine Amino- ($-\text{NH}_2$ bzw. $-\text{NH}_3^+$), eine Carboxylgruppe ($-\text{COOH}$ bzw. $-\text{COO}^-$) und ein Wasserstoffatom (H) sitzen.

Schwarz: Das vierte Elektronenpaar verbindet das zentrale C-Atom mit einer für jede Aminosäure individuellen Seitengruppe.

Der Polymorphismus liegt in der zweiten der drei polybasischen N-terminalen Domänen von AKAP79, in der B-Domäne (siehe Abb. 2). Diese Domäne ist an den Assoziationen von AKAP79 mit Actin, Cadherin, dem Beta-2 Adrenergen Rezeptor, Adenylatcyclasen und CaM beteiligt. Eine Änderung der Faltung und Struktur des Proteins an dieser Stelle, welche durch den Austausch von Prolin zu Leucin zu erwarten wäre, könnte Einfluss auf die Interaktion von AKAP79 mit einem oder mehreren dieser Bindungspartner haben. Die AKAP79-B-Domäne trägt weiterhin zur Lokalisation von AKAP79 bei, indem es über die Bindung an PIP_2 mit Membranen assoziieren kann. Somit könnte eine durch den Aminosäure-Austausch veränderte Struktur der Domäne die Lokalisation von AKAP79 beeinflussen.

1.6. Zielsetzung der vorliegenden Promotion

Die Arbeitsgruppe „Imaging Genetics“ ist ein interdisziplinäres Team aus Medizinern, Psychologen und Biologen. Unser Interesse liegt in der Erforschung von humanen Polymorphismen in diversen postsynaptischen Proteinen, wobei deren Einfluss auf kognitive Leistungen, Hirnaktivität und Verhalten unter Zuhilfenahme von Selbsteinschätzungsfragebögen, computerbasierten Lern- und Gedächtnistests und Messungen der Hirnaktivität mittels

funktioneller Magnetresonanztomographie (fMRT) untersucht wird. Polymorphismen, die mit signifikanten Unterschieden korrelieren, werden auf molekularer Ebene charakterisiert.

Aufgrund seiner zentralen, integrierenden Rolle in der PSD und in Prozessen synaptischer Plastizität wurde das Adapterprotein AKAP79/150 in die Liste der zu untersuchenden postsynaptischen Proteine ausgewählt. Tierexperimentelle Befunde mit Knockout-Mäusen legen einen Einfluss des Proteins auf Lernen und Gedächtnis nahe (Tunquist *et al.* 2008), so dass es ein vielversprechendes Kandidatengen für die funktionelle Untersuchung nicht-synonymer Polymorphismen darstellt.

Probanden-DNA wurde auf die drei eingangs erwähnten nicht-synonymen AKAP79 SNPs hin typisiert und die Ergebnisse mit den neuropsychologischen Daten abgeglichen. Dabei fand Dr. Sylvia Richter eine signifikante Korrelation des AKAP79 Pro100Leu SNPs mit aggressivem Verhalten und Ärgerkontrolle (Richter *et al.* 2011). Daraufhin bestand das Ziel der vorliegenden Arbeit in der molekularen Charakterisierung dieses Polymorphismus.

Dabei wurde zunächst die Hypothese getestet, die AKAP79-Allele könnten sich hinsichtlich ihrer subzellulären Lokalisation und der Assoziation mit Membranen unterscheiden.

Anschließend wurde die Bindung der AKAP79-Allele an das Ca^{2+} -Sensor Protein CaM zunächst bestätigt und dann mit Hilfe von Pulldown- und *Surface Plasmon Resonance* Experimenten genau charakterisiert.

Des Weiteren sollte die Hypothese, dass aufgrund seiner Ähnlichkeit mit CaM auch das Ca^{2+} -Sensor-Protein Caldendrin an AKAP79 binden könnte, verfolgt werden.

Schließlich wurde die Frage nach einer Konkurrenz von CaM und Caldendrin um die Bindung an die gleiche Domäne in AKAP79 aufgeworfen und untersucht.

Die vorliegende Arbeit soll zu einer funktionellen Hypothese über die Integration von AKAP79/150 und beiden Ca^{2+} -Sensor Proteinen in der Postsynapse beitragen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und Substanzen

Der Bezug der verwendeten Chemikalien und Substanzen erfolgte in *pro analysis* (p.A.) Qualität von den Firmen Roth, Boehringer/Roche, Sigma–Aldrich, Amersham, Invitrogen, Merck, Serva, Clontech, Biorad, Calbiochem, Gibco Life Technologies, Machery–Nagel und Qiagen.

Die verwendeten Chemikalien und Lösungen werden jeweils zu Beginn der beschriebenen Methoden aufgeführt. Die Lösungen wurden mit de-ionisiertem Wasser des Reinstwasseranlagensystems Milli–Q von Millipore angesetzt.

2.1.2. Kits, Enzyme

Name	Firma
ECL Western Blotting Detection Reagents	Amersham
Plasmid Midi / Maxi Kit	Qiagen
NucleoBond Xtra Midi / Maxi EF	Machery–Nagel
GenElute DNA extraction kit	Sigma Aldrich
Phusion Polymerase	Finnzymes
Taq Polymerase	Quiagen oder Fermentas, ThermoScientific
T4 DNA Ligase	Fermentas, ThermoScientific
Restriktionsendonukleasen	Fermentas, ThermoScientific
DNA ladder (50 bp, 100 bp oder 1 kb)	Fermentas, ThermoScientific
Prestained protein ladder Plus	Fermentas, ThermoScientific

Tab. 1: Überblick über die verwendeten Kits, den entsprechenden Herstellern zugeordnet.

2.1.3. Molekularbiologische und biochemische Puffer

Name	Zusammensetzung
PBS	2,7 mM KCl, 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , 137 mM NaCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,4
TBS	50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,6
TBS–T	0,1% (Vol.%) Tween–20 in TBS
TBS–A	0,02% (Gew.%) Natriumazid in TBS
TBS–TA	0,1% (Vol.%) Tween–20 und 0,02% (Gew.%) Natriumazid in TBS
HEPES	10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,4
TAE	40 mM Tris, 0,2 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 7,6
TBE	89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA

Tab. 2: Überblick über die verwendeten Puffer und Angabe der Zusammensetzung.

2.1.4. Zelllinien und Bakterienstämme

Bakterien	<i>E. coli</i> XL-10 Gold
	<i>E. coli</i> BL-21
Zelllinien	HEK293: <i>Human embryonal kidney cells clone 293</i>
	Cos7: <i>African green monkey kidney cells</i>

Tab. 3: Angabe der verwendeten Bakterienstämme und Zelllinien.

2.1.5. Bakterienmedien und Antibiotika

Name	Zusammensetzung
LB (Luria-Bertani)-Medium	5 g/l Hefe-Extrakt, 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l NaCl
LB-Platten	15 g Agar auf 1000 ml LB-Medium
SOC-Medium	20 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefe-Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM Mg ₂ SO ₄ , 10 mM MgCl ₂ , 20 mM Glucose

Tab. 4: Überblick über die verwendeten Bakterienmedien und Angabe ihrer Zusammensetzung.

Zur Selektion auf die entsprechenden Resistenzmarker für *E. coli*-Stämme wurden den Medien nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 50°C Antibiotika in folgenden Endkonzentrationen zugegeben: Ampicillin 100 µg/ml, Chloramphenicol 25 µg/ml und Kanamycin 30 µg/ml.

2.1.6. Medien, Antibiotika und Reagenzien für die Zellkultur

Name	Beschreibung
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
Zellkulturmedium	DMEM; 10% FKS; 2 mM Glutamin; 100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin (alles Gibco BRL)
Poly-D-Lysin	100 mg/ml in 0,15 M Borsäure, pH 8,4
NB	<i>Neurobasal</i> TM Medium
Neuronenkulturmedium	<i>Neurobasal</i> TM Medium; 1 x B-27; 100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin, 0,5 mM L-Glutamin (alles Gibco BRL)
OptiMEM	OptiMEM Reduced Serum Media (Gibco)
HBSS-/+	<i>Hanks balanced salt solution</i> ohne / mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺

Tab. 5: Überblick über die verwendeten Zellkulturmedien und Angabe ihrer Zusammensetzung.

2.1.6. Antikörper

2.6.1.1. Primäre Antikörper

Antikörper	Hersteller	Spezies	Verwendung, Verdünnung
anti-AKAP150-N19	Santa Cruz	Ziege	WB: 1:250; ICC: 1:200
anti-AKAP150-C20	Santa Cruz	Ziege	WB: 1:250; ICC: 1:200
anti-AKAP79	BD	Maus	WB: 1:250
anti-CDD-C-term	hauseigen	Kaninchen	Co-IP; WB: 1:2000; ICC: 1:400
anti-CDD-fl	hauseigen	Kaninchen	Co-IP
anti-CDD-C-term	hauseigen	Meerschwein	WB: 1:2000; ICC: 1:200 – 1:400
anti-PSD-95	NeuroMab	Maus	ICC: 1:800
anti-Homer	Acris	Ratte	ICC: 1:500
anti-CaM	Santa Cruz	Kaninchen	WB: 1:250
anti-GFP	Covance	Maus	WB: 1:14.000
anti-GFP	Abcam	Kaninchen	WB: 1:20.000
Kaninchen IgG	Santa Cruz	Kaninchen	Co-IP

Tab. 6: Überblick über die eingesetzten primären Antikörper und deren Verwendung.

WB – Westernblot; ICC – Immunocytochemie; Co-IP – Co-Immunpräzipitation

2.1.6.2. Sekundäre Antikörper

Antikörper	Hersteller	Label	Verwendung, Verdünnung
Esel-anti-Ziege	Santa Cruz	HRP	WB: 1:5000
Ziege-anti-Kaninchen	Dianova	HRP	WB: 1:5000
Ziege-anti-Maus	Dianova	HRP	WB: 1:5000
Kaninchen-anti-Meerschwein	Dianova	HRP	WB: 1:5000
Esel-anti-Ziege	Invitrogen	Alexa 488	ICC: 1:1000
Esel-anti-Maus	Dianova	Cy 5	ICC: 1:1000
Esel-anti-Kaninchen	Dianova	Cy 3	ICC: 1:1000
Esel-anti-Ratte	Dianova	Cy 3	ICC: 1:1000
Esel-anti-Meerschwein	Dianova	Cy 3, Cy 5	ICC: 1:1000

Tab. 7: Überblick über die eingesetzten sekundären Antikörper und deren Verwendung.

HPR – horseradish peroxidase; WB – Westernblot; ICC – Immunocytochemie

2.1.7. Vektoren

Vektor	Hersteller	Verwendung
pEGFP	Clontech	Expression von GFP-Fusionsproteinen in eukaryotischen Zellen
pGEX	Amersham	Expression von GST-Fusionsproteinen in Bakterien
pET-SUMO	Invitrogen	Expression von His-SUMO-Fusionsproteinen in Bakterien
pDSRed	Clontech	Expression von RFP-Fusionsproteinen in eukaryotischen Zellen
pmCherry	Clontech	Expression von Cherry-Fusionsproteinen in eukaryotischen Zellen

Tab. 8: Überblick über die eingesetzten Vektoren und deren Verwendung.

2.1.8. Expressionskonstrukte

Konstruktbezeichnung	Aminosäuren	Vektor	Restriktion
AKAP79_P/_L	1 – 427	pEGFP-N1	EcoRI/BamHI
AKAP79-N-term_P/_L	28 – 151	pEGFP-C2	EcoRI/Sall
AKAP79-C-term	146 – 427	pEGFP-C2	EcoRI/Sall
AKAP79-A	28 – 59	pEGFP-C2	EcoRI/Sall
AKAP79-B_P/_L	61 – 116	pEGFP-C2	EcoRI/Sall
AKAP79-B_P/_L	61 – 116	pGEX-5X-1	EcoRI/Sall
AKAP79-B_P/_L	61 – 116	pET-SUMO	Topo Vektor
AKAP79-C	112 – 151	pEGFP-C2	EcoRI/Sall
AKAP79-B1	61 – 76	pEGFP-C2	EcoRI/Sall
AKAP79-B2	75 – 97	pEGFP-C2	EcoRI/Sall
AKAP79-B3	97 – 116	pEGFP-C2	EcoRI/Sall
AKAP79-B1,2	61 – 97	pEGFP-C2	EcoRI/Sall
AKAP79-B2,3	75 – 116	pEGFP-C2	EcoRI/Sall
CDD-fl	1 – 298	pEGFP-N1	EcoRI/BamHI
CDD-C-term	137 – 298	pGHEB	EcoRI/BamHI
CDD-Δ21	22 – 298	pET-SUMO	Topo Vektor

Tab. 9: Überblick über die verwendeten Fusionskonstrukte: Bezeichnung, Angabe der Aminosäuren des klonierten Proteins, des Vektors und der Klonierungsschnittstellen.

Erläuterung: pGHEB – pGEX4T, modifiziert durch Dr. W. Altmann

2.1.9. Primer

Alle Primer wurden mit dem Programm OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies) entworfen und von der Firma Invitrogen synthetisiert.

Primer	Sequenz
AKAP100-f	5'- GCT TCT GAT CAG CCA GAG CCC AC -3'
AKAP100-r	5'- GCT TCT TCC TGG ACT TTG ATG CTG CAG -3'

Tab. 10: Angabe der Bezeichnung und Sequenz der Typisierungsprimer.

Primer	Sequenz
AKAP-out-f	5'- GGC TGC TAA GGA AGA GAG AAT ACA G -3'
AKAP-out-r	5'- GCC GTG ACT CTG GAG AGT AAG -3'
AKAP-in-f	5'- AGA ATT CAA ATG GAA ACC ACA ATT TCA G -3'
AKAP-in-r	5'- GGT CGA CGC CTG TAG AAG ATT GTT TAT TT -3'

Tab. 11: Angabe der Bezeichnung und Sequenz der Klonierungsprimer des vollständigen humanen AKAP5-Gens.

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologie

2.2.1.1. Transformation und Präparation hitzeschock-kompetenter *E. coli* XL10-Gold und BL21 Zellen

Die bei -80°C aufbewahrten hitzeschock-kompetenten, zu je 100 μl alliquotierten Bakterien wurden 10 min auf Eis aufgetaut, dann mit dem Ligationsansatz versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte für 40s ein Hitzeschock im Wasserbad, woraufhin die Bakterien sofort wieder für 2 min auf 4°C abgekühlt wurden. Unter Zusatz von 400 μl vorgewärmtem SOC-Medium wurden die Bakterien 1h bei 37°C schüttelnd inkubiert, zum Pelletieren 5 min bei 1000 x g zentrifugiert, die Bakterien in 100 μl SOC-Medium resuspendiert und anschließend auf einer Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum zur Aussortierung nicht resistenter und demzufolge nicht erfolgreich transformierter Bakterien ausplattiert. Nach über-Nacht-Inkubation bei 37°C wurden die gewachsenen, erfolgreich transformierten Bakterienkolonien für weitere Anwendungen gepickt.

2.2.1.2. DNA Präparation aus humanem Probandenblut

Die Präparation genomischer DNA aus Leukozyten erfolgte mit Hilfe des GenElute DNA Extraction Kit (Sigma Aldrich) laut Anleitung des Herstellers.

2.2.1.3. Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

2.2.1.3.1. Mini-Präparation

Puffer	Zusammensetzung
P1	50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 μg RNase A
P2	200 mM NaOH; 1% SDS
P3	3 M Kaliumacetat, pH 5,5

Tab. 12: Angabe der Bezeichnung und Zusammensetzung der bei der Mini-Präparation verwendeten Puffer.

2,5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum werden mit je einem positiv transformierten Klon angeimpft und über Nacht im Luftschüttler bei 37°C und 137 rpm inkubiert. Die Präparation erfolgt nach einem modifizierten Protokoll wie in der Literatur beschrieben (Birnboim & Doly 1979).

2 ml der über-Nacht-Kultur werden bei 8000 x g pelletiert und in 250 μl P1 resuspendiert. Die Lyse erfolgt durch Zugabe von 250 μl P2, umschütteln und anschließender Inkubation von 5 min. Zugabe von 350 μl P3 neutralisiert die Suspension und fällt die Proteine aus, welche durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 20.000 x g pelletiert werden. Zur Fällung der DNA wird der Überstand mit 550 μl Isopropanol versetzt und 30 min bei 20.000 x g zentrifugiert. Das Pellet wird mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 μl H_2O aufgenommen.

2.2.1.3.2. **Midi- und Maxi-Präparation**

Die Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde nach dem Prinzip der alkalischen Lyse entsprechend den Herstellerangaben des verwendeten Kits (Qiagen, Machery-Nagel) durchgeführt.

2.2.1.4. **Restriktionsverdau von Plasmid-DNA**

Entsprechende Restriktionsendonukleasen der Firma Fermentas wurden laut Herstellerangaben eingesetzt. Zur Analyse wurden jeweils 2 µl DNA-Präparation in einem 12 µl Ansatz eingesetzt.

2.2.1.5. **Sequenzierung der DNA-Konstrukte**

Zur Kontrolle wurden alle klonierten Konstrukte sequenziert. Dazu wurde ein Ansatz bestehend aus je 1 µl DNA-Mini-/Midi-/Maxi-Präparation, 2 µl Sequenzierungsprimer, 4 µl H₂O an die Firma SeqLab zur Sequenzierung geschickt.

2.2.1.6. **Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten**

Lösung	Zusammensetzung
TBE-Puffer	40 mM Tris, 0,2 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 7,6
TAE-Puffer	89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA
Ethidiumbromid-Lösung	0,07% in H ₂ O
6 x Ladepuffer	30% Glycerol, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 50 mM EDTA, pH 8,0

Tab. 13: Angabe der Bezeichnung und Zusammensetzung der bei der Agarose-Gelelektrophorese verwendeten Puffer.

Für die Typisierung wurden Agarose-Gele auf TBE-Basis genutzt.

Sollte ein DNA-Fragment nach der Auftrennung aus dem Gel isoliert werden, so wurde TAE-Puffer für das Gel und die Elektrophorese verwendet.

Je nach Größe der erwarteten DNA-Fragmente wurden 1 – 2,5%-ige Gele gegossen. Pro 50 ml Gel wurde 1 µl Ethidiumbromid-Lösung hinzugegeben. Für die Auftrennung in der *wide mini subcell* Gelkammer von BioRad wurde eine Spannung von 70 – 120 V angelegt. Das in die DNA eingelagerte Ethidiumbromid wurde durch UV-Bestrahlung zur Fluoreszenz angeregt und über den *GeneFlash* von VWR dokumentiert.

2.2.1.7. **Isolierung von DNA aus Agarosegelen**

Die Isolierung eines DNA-Fragments aus einem TAE-Gel erfolgte unter Verwendung eines Glasmilch Kits von MolBio.

Die DNA-Bande wurde unter UV-Licht sichtbar gemacht, ausgeschnitten und abgewogen und entsprechend der Herstellerangaben isoliert. Je nach ursprünglicher Größe der Bande wurde die DNA in 20 – 100 µl Wasser aufgenommen.

2.2.1.8. Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren

Ligationsansatz:

Material	Menge [μ l]	Hersteller
Insert DNA Eluat	8	
Vektor DNA Eluat	0,6	
10 x Ligationspuffer	1	Fermentas
T4 DNA Ligase	0,4	Fermentas

Tab. 14: Übersicht über die Zusammensetzung eines Ligationsansatzes.

Der Ansatz wird 1 – 3 h bei Raumtemperatur (RT) oder über Nacht bei 18°C inkubiert.

Als Kontrolle des vollständigen Verdau der Vektor-DNA diente ein Ansatz mit 8 μ l Wasser anstelle des Insert-DNA-Eluats.

2.2.1.9 Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Generierung von DNA-Fragmenten

Für Klonierungen wurde die Phusion-Polymerase von Finnzymes laut Herstellerangaben genutzt.

2.2.1.10. Polymerasekettenreaktion (PCR) und Restriktion zur Genotypisierung des AKAP5 Pro100Leu Polymorphismus

Material	Menge [μ l]	Hersteller
H ₂ O	9,3	Quiagen
Q solution	5	Quiagen
MgCl ₂	1,5	Quiagen oder Fermentas
Dream-Taq Puffer	2,5	Fermentas
dNTP	0,5	Fermentas
Forward Primer AKAP100-f	2,5	Invitrogen
Backward Primer AKAP100-r	2,5	Invitrogen
Dream Taq Polymerase	0,2	Fermentas
DNA (aus Probandenblut extrahiert)	2	
Ansatz gesamt	25	

Tab. 15: Übersicht über die Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes und gegebenenfalls Angabe der Hersteller der verwendeten Lösungen.

Der PCR-Ansatz wurde im Mastercycler von Eppendorf mit Hilfe folgenden Programms amplifiziert:

Schritt	Temperatur	Zeit
1	95°C	60 s
2	95°C	30 s
3	60°C	20 s
4	72°C	30 s
Schritt 2 – 3 werden 42 mal wiederholt		
5	72°C	7 min
6	4°C	Ende

Tab. 16: Auflistung der Schritte des zur Typisierung verwendeten Mastercycler-Programms.

Anschließend erfolgte der Restriktionsverdau mit AluI:

Material	Menge [μ l]	Hersteller
PCR Produkt	25	
AluI (10 U/ μ l)	0,25	Fermentas
10 x Tango Puffer	4	Fermentas
H ₂ O	10,75	Quiagen
Ansatz gesamt	40	

Tab. 17: Übersicht der Zusammensetzung des zur Typisierung genutzten Restriktionsverdau.

Der Ansatz wurde für 3 h bei 37°C inkubiert und anschließend auf ein 2,5% TBE-Agarose-Gel aufgetragen.

2.2.2. Zellkultur

2.2.2.1. Zellkultur von HEK293-, und Cos7-Zellen

Alle Zellkulturen wurden bei 37°C, 5% CO₂-Gehalt und 95% relativer Luftfeuchtigkeit im Inkubator in Zellkulturmedium kultiviert.

2.2.2.2. Transfektion von Cos7-Zellen

Die Transfektion von Cos7-Zellen erfolgte mit Polyfect (Quiagen) laut den Angaben des Herstellers.

2.2.2.3. Transfektion von HEK293-Zellen mittels CaPO₄-Methode

Lösung	Zusammensetzung
A	500 mM CaCl ₂ in H ₂ O, steril filtriert
B	140 mM NaCl, 50mM HEPES, 1,5mM Na ₂ PO ₄ in H ₂ O, pH 7,05, steril filtriert

Tab. 18: Übersicht der Zusammensetzung der Transfektionslösungen für eine Transfektion mittels CaPO₄-Methode.

Fast konfluent gewachsene Zellen in 5 ml Kulturflaschen wurden einen Tag vor der Transfektion gesplittet (1:6 – 1:10).

210 µl Lösung A und 2 – 4 µg DNA (in Abhängigkeit von Verträglichkeit und Expressionsstärke des Konstrukts) wurden vermischt. 210 µl Lösung B wurden durch auf- und abpipettieren und Erzeugung von Luftblasen dazugegeben und die Lösung eine Minute später zu den Zellen pipettiert.

Nach 24–48h konnte die Expression in den Zellen durch Fluoreszenz–Mikroskopie kontrolliert werden.

2.2.2.4. Primäre corticale und hippocampale Neuronenkulturen von Ratten

Corticale oder hippocampale Neuronen wurden aus 18 Tage alten Embryonen von Wistar–Hannoveraner Ratten (RjHan:Wi, Elevage Janvier, Frankreich) isoliert, in einer Dichte von 20.000 Zellen pro ml (low density) auf mit Poly–D–Lysin beschichtete Deckgläser in Neuronenkulturmedium ausplattiert und bei 37°C, 5% CO₂ und 95% H₂O gesättigter Luft im Heraeus Inkubator inkubiert (Dieterich et al. 2008).

2.2.2.5. Transfektion primärer Rattenneurone

Die Transfektion primärer Neurone erfolgte mit Effectene (Quiagen) laut den Angaben des Herstellers.

2.2.2.6. Fixierung, Immunfärbung und Mikroskopie von Zellkulturen

Lösung	Zusammensetzung
Blockpuffer	2% BSA, 2% Glycin, 0,2% Gelatine, 50 mM NH ₄ Cl in PBS
Mowiol	10% Mowiol, 25% Glycerin, 100 mM Tris/HCl (pH 8,5), 2,5% DABCO

Tab. 19: Übersicht der Zusammensetzung der zur Immunfärbung und zum Einbetten verwendeten Puffer.

Nach 21 Tagen in Kultur wurde den Neuronen das Medium abgenommen. Die Fixierung erfolgte Zugabe von 4% PFA (+/– 4% Saccharose) in PBS für 10 min bei RT. Nach dreimaligem Waschen in PBS erfolgte die Permeabilisierung der Zellmembranen in PBS + 0,25% Triton X–100 für 15 min bei RT. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Zellen in Blockpuffer für 1 ½ h bei RT inkubiert. Der primäre Antikörper wurde in Blockpuffer verdünnt (das Verdünnungsverhältnis ist in Tabelle 6 angegeben), auf das Deckglas gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach viermaligem jeweils 10–minütigem Waschen in PBS erfolgte im Dunkeln für 1 ½ h die Inkubation mit den sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörpern, welche 1:1000 in 0,5xBlockpuffer verdünnt wurden. Nach erneutem ausgiebigem Waschen in PBS und einem letzten Waschschritt mit Wasser, wurden die Deckgläser in Mowiol auf Objektträgern eingebettet. Die Mikroskopie erfolgte mit Hilfe eines 63er Öl Objektivs an einem Leica DMRXE Konfokal–Mikroskop (Wetzlar, Deutschland), ausgestattet mit einem Krypton–Argon–Ionen Laser (488/568/647 nm), in z–Schichten in einem Abstand von 0,25 µm, oder alternativ an einem Zeiss Axioplan 2 Imaging Fluoreszenzmikroskop (Visualisierung transfizierter Proteine).

2.2.2.7. Simulation verschiedener Ca^{2+} -Bedingungen in primären Neuronenkulturen

Hohe Ca^{2+} -Konzentrationen wurden durch die Zugabe von 1 μM Ionomycin für 1–5 min ins Zellkulturmedium vor der Fixierung simuliert. Zur Simulation niedriger Ca^{2+} -Konzentrationen wurden vor der Fixierung 45 μM BAPTA für 30 min ins Zellkulturmedium gegeben.

2.2.3. Biochemische Methoden

2.2.3.1. Proteinbestimmung mit Amidoschwarz

Lösung	Zusammensetzung
Methanol–Eisessig	9 Teile Methanol + 1 Teil Essigsäure
Amidoschwarz–Lösung	14,4 g Amidoschwarz in 1l Methanol–Eisessig

Tab. 20: Übersicht der Zusammensetzung der zur Proteinbestimmung genutzten Puffer.

Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgt mittels Dreifachbestimmung colorimetrisch nach der Amidoschwarz–Methode abgewandelt nach Popov, 1975 (Popov *et al.* 1975):

Eine Proteinprobe wird mit Wasser auf 100 μl aufgefüllt, 200 μl Amidoschwarz–Lösung dazugegeben und 10 min bei RT inkubiert. Das gefällte Protein wird bei 3500 x g für 10 min abzentrifugiert, der Überstand abgegossen, das Pellet 2 mal mit 300 μl Methanol–Eisessig gewaschen, luftgetrocknet, danach in 300 μl 0,1 N NaOH aufgenommen, 30 min bei RT geschüttelt und die Färbungsintensität im Mikrotiterplattenleser bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Parallel wird eine Eichkurve mit BSA–Proben ausgemessen.

2.2.3.2. Sodiumdodecylsulfat–Polyacrylamid–Gelelektrophorese (SDS–PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen wurde eine denaturierende Polyacrylamid–Gel–Elektrophorese nach Laemmli durchgeführt (Laemmli 1970).

Lösung	Zusammensetzung
4 x Trenngelpuffer	1,5 M Tris–HCl, pH 8,8
4 x Sammelgelpuffer	0,5 M Tris–HCl, pH 6,8
30% Acrylamid (Rotiphorese 30)	30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid (Roth)
10 x Tris–Glycin–Laufpuffer	1,92 M Glycin, 250 mM Tris–Base, 1% SDS
4 x SDS–Probenpuffer	135 mM Tris, pH 6,8; 4% SDS; 20% Glycerin; 10% 2–Mercaptoethanol; 0,016% Bromphenolblau

Tab. 21: Übersicht der Zusammensetzung der Puffer zur Herstellung von Proteingelen nach Laemmli.

Rezeptur für zwölf 12%–ige Tris/HCl Gele (nach Laemmli):

Lösung	Trenngel (12%)	Sammelgel (3,5%)
4 x Trenngelpuffer	16,8 ml	–
4 x Sammelgelpuffer	–	6,24 ml
30% Acrylamid	27 ml	2,9 ml
80% Glycerol	15,8 ml	5,76 ml
Wasser	7,9 ml	12 ml
Phenolrot (Roth)	–	50 µl
APS (10%)	280 µl	240 µl
TEMED	58 µl	28 µl

Tab. 22: Übersicht der Zusammensetzung von zwölf 12%–igen Trenngelen und zwölf 3,5%–igen Sammelgelen nach Laemmli.

Als Beispiel der Gelzusammensetzung dient eine Rezeptur für zwölf 12%–ige Acrylamidgele. Die Gele wurden in einer *Hoefer Mighty Small System SE250* (Amersham Biosciences) Gelgießkammer gegossen. Im Falle einer gewünschten Änderung der Prozentigkeit des Trenngels wurden die Zusätze von 30% Acrylamid und Wasser entsprechend ihren Anteilen am Gesamtvolumen angepasst.

Zur elektrophoretischen Auftrennung wurde eine Stromstärke von 12 mA pro Gel für 2–3 h angelegt.

Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine wurden die Gele entweder Coomassie–gefärbt oder die Proteine auf eine Nitrocellulose–Membran (Protran, Whatman) geblottet.

2.2.3.3. Coomassie–Färbung von Proteinen nach SDS–PAGE

Lösung	Zusammensetzung
Coomassie–Färbelösung	0,1% Coomassie Blau R250 (Serva), 5% Methanol, 10% Eisessig in H ₂ O
Entfärbelösung	5% Methanol, 7% Essigsäure in H ₂ O
Trocknungslösung	50% Methanol, 5% Glycerin in H ₂ O

Tab. 23: Übersicht der Zusammensetzung der Puffer zur Coomassie–Färbung.

Das Proteingel wurde für 1h bei RT in die Coomassie–Färbelösung gelegt. Während dieser Zeit lagerte sich der Coomassie–Farbstoff an die basischen Seitenketten der Aminosäuren der im Gel enthaltenen Proteine an. Nicht gebundener Farbstoff wurde durch die anschließende Inkubation in Entfärbelösung im Beisein eines Zellstofftuchs ausgewaschen. Danach wurde das Gel 10 min in Trocknungslösung gelegt und anschließend zwischen zwei CellophanTM–Folien bis zur vollständigen Trocknung in einem Trocknungsrahmen aufbewahrt.

2.2.3.4. Western-Blotting und Immundetektion

Lösung	Zusammensetzung
Blotpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,2% SDS, 20% Methanol
PonceauS Lösung	0,5% (w/v) PonceauS, 1% Essigsäure
Blockpuffer	5% Milchpulver (Roth) in TBS-T

Tab. 24: Übersicht der Zusammensetzung der für das Western-Blotting und die Immundetektion benötigten Puffer.

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden elektrophoretisch mit Hilfe einer Nassblottkammer (*Hoefer TE 22 Mini Tank Transphor Unit System* (Amersham Biosciences)) für 1–1,5h bei konstanten 200 mA (~ 60–80 V) auf eine Nitrocellulose-Membran (Protran, 0,45µm Porengröße, Whatman) übertragen.

Die Membran wurde anschließend für 10 min in die PonceauS-Lösung gelegt. Überschüssiges PonceauS wurde mit Wasser abgespült. Danach sollten bei erfolgreicher Übertragung die Proteinbanden auf der Membran rot gefärbt und sichtbar sein. Für die spätere korrekte Zuordnung der Banden zu den aufgetragenen Proben wurde die gefärbte Membran kopiert.

Die freien Bindungen der Membran wurden durch einstündige Inkubation in Blockpuffer abgesättigt. Die Membran wurde drei Mal für je 10 min in TBS-T gewaschen und anschließend über Nacht in TBS-TA mit primärem Antikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBS-T erfolgte eine zweistündige Inkubation in TBS-T mit 5% Milchpulver und sekundärem Antikörper. Die Membran wurde erneut drei Mal mit TBS-T und ein Mal mit TBS gewaschen.

An die sekundären Antikörper ist Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Sie setzt mit Hilfe von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) das Substrat Luminol um, wobei Licht einer Wellenlänge von 428 nm emittiert wird. H_2O_2 und Luminol sind im Gemisch der Enhanced Chemiluminescence (ECL) – Reagenz (Amersham Biosciences) neben weiteren, die Lichtemission verstärkenden Substanzen (Enhancer) enthalten.

Die Lichtemission wurde durch Exposition eines ECL-Hyperfilms (Amersham Biosciences) detektiert und durch die Entwicklung des Films in der Entwicklermaschine Curix60 (Agfa) nachgewiesen.

2.2.3.5. Herstellung von HEK-Zell-Extrakten für Pulldown-Experimente

Das Medium wurde von den Zellen abgenommen, die Zellen einmal mit HBSS gewaschen, dann mit Hilfe eines Zellschabers in 1 ml TBS + Protease-Inhibitoren (PI) geerntet, der Überstand bei 1000 x g für 5 min bei 4°C abzentrifugiert und das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert.

Das Pellet wurde mit einem Handhomogenisator in 200 µl TBS + PI homogenisiert. Dem Homogenat wurde Triton X-100 bis zu einer Konzentration von 1% zugesetzt, die Lösung 30 min bei 4°C schüttelnd inkubiert und anschließend 20 min bei 20.000 x g zentrifugiert.

2.2.3.6. HEK-Zell-Membranfraktionierung

Lösung	Zusammensetzung
Ca ²⁺ -haltiger Puffer	20 mM HEPES, pH 7,4, 20 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂ , PI EDTA free
EGTA-Puffer (Ca ²⁺ -freier Puffer)	20 mM HEPES, pH 7,4, 20 mM NaCl, 2 mM EGTA, PI complete

Tab. 25: Übersicht der Zusammensetzung der Puffer für die HEK-Zell-Membranfraktionierung.

Zellen wurden in TBS + PI mit einem Zellschaber geerntet, in 1,5 ml Eppendorfgefäßen gesammelt und 5 min bei 1000 x g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 400 µl Puffer A oder B resuspendiert und homogenisiert, wobei die Zellen aufgrund der Hypotonie des Puffers aufbrachen. Anschließend wurden die Lysate 30 min bei 4°C und 100.000 x g ultrazentrifugiert, wobei eine Auftrennung in eine lösliche cytosolische Fraktion (S100) und ein unlösliches grobes Membranpellet (P100) erfolgte. Das Pellet wurde in Ca²⁺-haltigem oder Ca²⁺-freiem Puffer resuspendiert. Die Proteinkonzentrationen der S100 und P100 Fraktion wurden gemessen und beide Fraktionen durch SDS-PAGE auf die gewünschten Proteine getestet. P100 konnte daraufhin für ein Flotation Assay verwendet werden.

2.2.3.7. Flotation Assay

52,5% und 25% Saccharose-Stammlösungen wurden in 20 mM HEPES Puffer (pH 7,4) hergestellt.

Für vier Gradienten wurden die Saccharose-Stammlösungen wie folgt gemischt und ergeben Saccharose-Lösungen mit den angegebenen prozentualen Saccharoseanteilen:

Stammlösung 52,5% Saccharose [µl]	Stammlösung 25% Saccharose [µl]	Prozent Saccharose
1000	—	52,5
900	100	49,75
800	200	47
700	300	44,25
600	400	41,5
500	500	38,75
400	600	36
300	700	33,25
200	800	30,5
100	900	27,75
—	1000	25

Tab. 26: Übersicht zur Herstellung eines 25 – 52,5%-igen Saccharose-Gradienten aus einer 25%-igen und einer 52,5%-igen Saccharose-Stammlösung.

Jeweils 200 µl der Saccharose-Lösungen wurden vorsichtig in der Reihenfolge aufsteigender Dichte in ein Zentrifugenröhrchen geschichtet.

Das bei der Fraktionierung erhaltene Membranpellet wurde in 300 µl 55% Saccharose, 20 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl und 2 mM CaCl₂ (Ca²⁺-haltiger Puffer) oder 2 mM EGTA (Ca²⁺-freier Puffer) resuspendiert und unter den Saccharosegradienten geschichtet. Es folgte eine 16-stündige Ultrazentrifugation bei 100.000 x g, wonach schrittweise insgesamt 13–14 Fraktionen

aus der Probe abgenommen und durch SDS-PAGE auf den Gehalt des gewünschten Proteins getestet wurden.



Abb. 4: Darstellung des mit Bromphenolblau eingefärbten Saccharosegradienten vor und nach der Ultrazentrifugation.

2.2.3.8. Proteinbiochemische Aufarbeitung von Hirngewebe – Extraktion mit Triton X-100

Lösung	Zusammensetzung
Ca ²⁺ -haltiger Puffer	20 mM HEPES, pH 7,4, 20 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂ , 1% Triton X-100, PI EDTA free
EGTA-Puffer (Ca ²⁺ -freier Puffer)	20 mM HEPES, pH 7,4, 20 mM NaCl, 2 mM EGTA, 1% Triton X-100, PI complete

Tab. 27: Übersicht der Zusammensetzung der für die proteinbiochemische Aufarbeitung von Hirngewebe verwendeten Puffer.

Das frisch entnommene Rattenvorderhirn (ohne Cerebellum) wurde ausgewogen, im 10-fachen Volumen an eiskaltem Puffer bei 900 rpm gepottert und die Zellkerne und Zelltrümmer durch Zentrifugation für 5 min bei 1.000 x g pelletiert. Dem Überstand wurde Triton X-100 bis zu einer Endkonzentration von 1% zugesetzt, die Lösung 30 min bis 1 h bei 4°C schüttelnd inkubiert und für 30 min bei 100.000 x g ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde für Co-Immunpräzitationen genutzt.

2.2.3.9. Membranfraktionierung von Hirngewebe

Lösung	Zusammensetzung
Ca ²⁺ -haltiger Puffer_1	4 mM HEPES, pH 7,4, 320 mM Saccharose, 2 mM CaCl ₂ , 1 mM MgCl ₂ , PI EDTA free
Ca ²⁺ -haltiger Puffer_2	TBS, 2 mM CaCl ₂ , 1 mM MgCl ₂ , 1% Triton X-100, PI EDTA free
EGTA-Puffer_1 (Ca ²⁺ -freier Puffer_1)	4 mM HEPES, pH 7,4, 320 mM Saccharose, 2 mM EGTA, 1 mM MgCl ₂ , PI complete
EGTA-Puffer_2 (Ca ²⁺ -freier Puffer_2)	TBS, 20 mM EDTA, 10 mM EGTA, 1 mM MgCl ₂ , 1% Triton X-100, PI complete

Tab. 28: Übersicht der Zusammensetzung der für die Membranfraktionierung von Hirngewebe verwendeten Puffer.

Die Membranfraktionierung erfolgte nach Vorbild von Tippens und Lee, 2007, mit leichten Abwandlungen (Tippens & Lee 2007). Das frisch entnommene Rattenvorderhirn wurde ausgewogen, im 10-fachen Volumen an eiskaltem Puffer_1 bei 900 rpm gepottert und die Zellkerne und Zelltrümmer durch Zentrifugation für 5 min bei 1.000 x g pelletiert. Der Überstand wurde 30 min bei 100.000 x g ultrazentrifugiert und das dabei erhaltene Membranpellet in Puffer_2 ohne Triton X-100 durch potttern resuspendiert. Nach Zugabe von Triton X-100 erfolgte eine 30 minütige Inkubation, schüttelnd bei 4°C, woraufhin erneut 30 min bei 100.000 x g ultrazentrifugiert wurde, um unlösliches Material zu entfernen. Das Vorderhirn-Membranextrakt wurde für eine Co-Immunpräzipitation weiterverwendet.

2.2.3.10. Co-Immunpräzipitation aus Hirngewebeextrakten

Lösung	Zusammensetzung
Ca ²⁺ -haltiger Puffer	20 mM HEPES, pH 7,4, 20 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂ , PI EDTA free
EGTA-Puffer (Ca ²⁺ -freier Puffer)	20 mM HEPES, pH 7,4, 20 mM NaCl, 2 mM EGTA, PI complete

Tab. 29: Übersicht der Zusammensetzung der für die Immunpräzipitation aus Hirngewebeextrakten verwendeten Puffer.

Dem Triton-Vorderhirngewebeextrakt oder dem Vorderhirn-Membranextrakt wurden Kaninchen anti-Caldendrin-C-term oder *-full-length* (fl) Antikörper oder Kaninchen IgG Kontrollantikörper zugesetzt und die Lösung für 1 h bei 4°C schüttelnd inkubiert. Währenddessen wurden je 30 µl Protein-A Agarose-Beads (Santa Cruz) pro Probe gewaschen, für 30 min in TBS + 5% BSA (*Bovine serum albumin*) blockiert, wieder gewaschen und über Nacht bei 4°C mit den Antikörperlösungen inkubiert. Der ungebundene Überstand wurde gesammelt, die Beads drei Mal im entsprechenden Puffer gewaschen und die gebundene Fraktion mit SDS-Probenpuffer eluiert.

2.2.3.11. Expression und Aufreinigung von Glutathion-S-Transferase (GST) - Fusionsproteinen

Material	Zusammensetzung
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactosid)	100 mM in H ₂ O, Endkonzentration 0,1 mM
Glutathion CL4B Beads	1 ml pro 1 l Bakterienkultur, (Amersham Biosciences)
Elutionspuffer	50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM reduziertes Glutathion

Tab. 30: Übersicht der Zusammensetzung oder Verwendung der Lösungen für die Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen in/aus Bakterien.

20 ml LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie BL21 Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler wachsen gelassen. Am nächsten Tag wurde eine neue Kultur mit je 1 ml Vorkultur pro 100 ml LB-Medium angeimpft, ca. 2– 2½ h bei 37°C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5–0,6 wachsen gelassen. Dann erfolgte die Expressionsinduktion durch Zugabe von 100 mM IPTG bis zu einer finalen Konzentration von 0,1 mM im Ansatz, und die Bakterien

wuchsen für weitere 4–6 h bei 37°C und 200 rpm. Die Kultur wurde bei 3500 x g für 15 min zentrifugiert, das Pellet in 10 ml TBS gelöst und bei –20°C eingefroren.

Nach Auftauen der Bakteriensuspension wurden 20 ml TBS + PI (ohne EDTA) zugesetzt. Der Bakterienaufschluss erfolgte mit Hilfe einer French Press bei 20.000 psi. Nach Zugabe von 1% Triton X–100 (Endkonzentration) erfolgte eine einstündige Inkubation schüttelnd bei 4°C, woraufhin unlösliche Proteine bei 12.000 x g und 4°C für 30 min pelletiert wurden. Dem Überstand wurde pro 1 l Ausgangskultur 1 ml mit TBS equilibrierte Glutathion CL4B Beads hinzugefügt und die Suspension 3 h bei 4°C schütteln inkubiert. Die Beads und die daran gebundenen GST–Fusionsproteine wurden 5 min bei 800 x g und 4°C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Beads 3 mal mit je 50 ml TBS gewaschen.

Zur Elution wurden die Beads in eine Säule gegeben und 5 mal je 5 min mit 500 µl Elutionspuffer inkubiert, woraufhin jedes Mal der Durchlauf als Eluat–Fraktion gesammelt wurde.

Der Proteingehalt der Eluate wurde auf einem Coomassie–Gel abgeschätzt und die Eluate gegen TBS über Nacht bei 4°C dialysiert. Der Proteingehalt der dialysierten Eluate wurde mit Hilfe der Amidoschwarz–Methode gemessen (Popov et al. 1975).

2.2.3.12. Expression und Aufreinigung von 6xHis–SUMO–Fusionsproteinen

Material	Zusammensetzung
IPTG	10 mM in H ₂ O, Endkonzentration 0,8 mM
ProBond Beads	3 ml pro 1 l Bakterienkultur (Invitrogen)
Nativer Aufreinigungspuffer	250 mM Na ₂ HPO ₄ – 2H ₂ O, 2,5 M NaCl, pH 8,0
3 M Imidazol–Stammlösung	3 M Imidazol in 20 mM Natrium Phosphat + 500 mM NaCl, pH 6,0
HEPES–Puffer	10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,4

Tab. 31: Übersicht der Zusammensetzung oder Verwendung der Lösungen für die Expression und Aufreinigung von His–SUMO–Fusionsproteinen in/aus Bakterien.

Bei der Gewinnung von 6xHis–SUMO–Fusionsproteinen wurde die Bakterienkultur analog zur Gewinnung von GST–Proteinen angeimpft, wachsen gelassen und geerntet. Induziert wurde hier mit einer Endkonzentration von 0,8 mM IPTG.

Pro 1 l Ausgangskultur wurden 3 ml ProBond Beads mit Nativem Aufreinigungspuffer equilibriert und für die Aufreinigung analog des GST–Fusionsprotein–Protokolls verwendet.

Nach Inkubation der Beads mit dem Bakterienextrakt wurden die Beads zunächst mit Nativem Aufreinigungspuffer, anschließend mit Nativem Aufreinigungspuffer mit 10 mM Imidazol und daraufhin mit Nativem Aufreinigungspuffer und 20 mM Imidazol gewaschen, bevor sie für die Elution auf die Säule geladen wurden.

Die Elution erfolgte abgestuft, beginnend mit 100 mM Imidazol in Nativem Aufreinigungspuffer, 150 mM Imidazol, 200, 250, 300 bis 350 mM Imidazol in Nativem Aufreinigungspuffer. In jedem Elutionsschritt erfolgte eine Inkubation mit dem jeweiligen Elutionspuffer für 30 min bei 4°C, bevor der Durchlauf gesammelt wurde. Der finale Elutionsschritt mit 350 mM Imidazol erfolgte über Nacht bei 4°C.

Um den eluierten Proteinen Calcium zu entziehen, wurde den Eluaten vor der Dialyse für 10 min 50 mM EGTA zugesetzt. Dialysiert wurde in mehreren Schritten, angefangen mit einer einstündigen Dialyse gegen Nativen Aufreinigungspuffer, gefolgt von einer vierstündigen Dialyse gegen Nativen Aufreinigungspuffer, einer zweistündigen Dialyse gegen HEPES-Puffer, einer über Nacht Dialyse gegen HEPES-Puffer, und einer finalen vierstündigen Dialyse gegen HEPES-Puffer. Alle Dialyse-Schritte mit Ausnahme des ersten Schritts erfolgten bei 4°C.

2.2.3.13. GST Pull-down Assay

Lösung	Zusammensetzung
Ca ²⁺ -haltiger Puffer	TBS, 2 mM CaCl ₂ , 1 mM MgCl ₂ , PI EDTA free
EGTA-Puffer (Ca ²⁺ -freier Puffer)	TBS, 2 mM EGTA, 1 mM MgCl ₂ , PI complete

Tab. 32: Übersicht der Zusammensetzung der im GST-Pulldown Assay verwendeten Puffer.

2.2.3.13.1. Allgemeine Beschreibung der Pulldown-Assays

Sofern nicht anders angegeben, werden pro Probe 20 µl Sepharose Beads equilibriert und mit je 2–8 µg aufgereinigtem GST-Fusionsprotein oder GST für 3 Stunden in TBS mit 5% BSA bei 4°C schüttelnd inkubiert, um das Protein an die Matrix/Beads zu binden.

Für Pulldown-Experimente mit CaM-Sepharose wurden 10 µl CaM-Sepharose Beads (7,5 µg CaM) eingesetzt.

Nachdem die Beads mit TBS gewaschen bzw. equilibriert wurden, wurden sie mit HEK-Zell-Extrakt oder aufgereinigtem Protein versetzt. Der Ansatz wird entweder mit Ca²⁺-haltigem oder Ca²⁺-freiem TBS auf ein Gesamtvolumen von 350–500 µl aufgefüllt und über Nacht bei 4°C schüttelnd inkubiert. Die ungebundene Fraktion wurde abgenommen, mit SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Die Beads wurden drei Mal mit je 1 ml Ca²⁺-haltigem oder Ca²⁺-freiem TBS gewaschen und die gebundenen Proteine anschließend in 50 µl SDS-Probenpuffer bei 95°C eluiert.

Die Analyse der ungebundenen und gebundenen Proteinfractionen erfolgte über SDS-PAGE, Westernblotting und Immundetektion wie zuvor beschrieben (Seidenbecher et al. 2004).

2.2.3.13.2. Pulldown-Experimente mit ausschließlich bakteriell aufgereinigten Proteinen

Für Pulldown-Assays mit GST-AKAP79-B (GST-B) und Caldendrin-Δ21 wurden pro Probe 8 µg GST-B oder GST und 38 µg 6xHis-SUMO-Caldendrin-Δ21 eingesetzt. Das Caldendrin-Konstrukt wurde vorher mit 10 Units SUMO-Protease (Invitrogen) bei 30°C für 3–6 h in SUMO-Puffer ohne Salz inkubiert, um den 6xHis-SUMO-Tag zu entfernen. Caldendrin-Δ21 wurde anschließend 3 h bei 4°C schüttelnd mit den GST-B- oder GST-Beads inkubiert.

2.2.3.13.3. Elutionsexperimente mit Ca²⁺-freiem Puffer

Die Elution mit EGTA-haltigem Puffer erfolgte nach Inkubation der Bindungspartner in Ca²⁺-haltigem Puffer. Die ungebundene Fraktion wurde abgenommen, die Beads drei Mal in Ca²⁺-haltigem Puffer gewaschen, die letzte Waschfraktion wurde für die spätere Analyse aufgehoben,

den Beads wurde Ca^{2+} -freier Puffer zugesetzt und die Lösung für 3 h bei 4°C inkubiert. Der Überstand war das Eluat, die Beads wurden drei Mal in Ca^{2+} -freiem Puffer gewaschen und das Eluat und die gebundenen Proteine analysiert.

2.2.3.13.4. *Simultane Bindung von CaM und Caldendrin an GST-AKAP79-B*

Äquimolare Mengen an Caldendrin- $\Delta 21$ und CaM (38 und 16,5 μg) wurden mit 8 μg an Beads gebundenem GST-AKAP79-B oder GST für 3 h bei 4°C inkubiert.

2.2.3.13.5. *Kompetitionsexperimente*

2 oder 7,5 μg CaM an CaM-Sepharose oder 2 μg GST-Caldendrin-C-term an Sepharose-Beads wurden mit Extrakten von GFP-AKAP79-B transfizierter HEK293T-Zellen (durchschnittlicher GFP-AKAP79-B-Gehalt von 1,5 μg pro Probe) in Ca^{2+} -haltigem Puffer bei 4°C über Nacht inkubiert. Ungebundene Fraktionen wurden abgenommen, die Beads je drei Mal in Ca^{2+} -haltigem Puffer gewaschen, die letzte Waschfraktion wurde für die spätere Analyse aufgehoben, und den Beads wurde Ca^{2+} -Puffer mit dem entsprechenden Kompetitionspartner, entweder einer zu CaM äquimolaren Menge an Caldendrin- $\Delta 21$ oder 3 bis 6 μg aufgereinigtes CaM in Lösung (das entspricht einer 4- bzw. 8-fachen Menge an CaM im Vergleich zu Caldendrin), zugesetzt und erneut für 3 h bei 4°C schüttelnd inkubiert.

2.2.4. Surface Plasmon Resonance (SPR)

Material	Zusammensetzung
Lauf- und Probenpuffer	25 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 0.05% Tween-20, 0.2 μm steril-filtriert
Regenerierungspuffer	Lauf-/Probenpuffer mit 50 μM EGTA, ohne CaCl_2
EDC	0,4M 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) in H_2O
NHS	0,1 M N-hydroxysuccinimid in H_2O
Ethanolamin	1 M Ethanolamin-HCl, pH 8,5

Tab. 33: Übersicht der Zusammensetzung der Puffer für *Surface Plasmon Resonance*-Messungen.

2.2.4.1. *Immobilisierung*

Die Sensorchipoberfläche wird aktiviert durch Injektion einer Mischung aus 0,2 M EDC und 0,05 M NHS bei einer Flussrate von 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ für 7 min. Anschließend wird der Ligand wie im Ergebnisteil beschrieben injiziert und danach erfolgt die Deaktivierung der verbliebenen reaktiven Gruppen durch Injektion von Ethanolamin mit einer Flussrate von 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ für 7 min.

2.2.4.2. *SPR-Messungen*

Die SPR-Messungen erfolgten an drei verschiedenen Biacore-Geräten (GE-Healthcare, Uppsala, Schweden), Biacore T200, S51 und X100, in Kooperation mit schwedischen Partnern (Christian Seeger, Beactica AB, Uppsala, Schweden, und Institut für Chemie – BMC, Uppsala Universität,

Uppsala, Schweden, und U. Helena Danielson, Wissenschaftliche Leiterin von Beactica AB, Uppsala, Schweden und Professorin am Institut für Chemie – BMC, Uppsala Universität, Uppsala, Schweden). Sowohl die Immobilisierungen als auch die Messungen fanden bei einer Temperatur von 25°C statt.

Caldendrin und CaM wurden ausgehend von Konzentrationen von 250 nM schrittweise verdünnt und in den angegebenen Konzentrationen (250, 125, 62,5, 31,25, 15,625 bis 7,8 nM) mit einer Flussrate von 30 µl/min injiziert. Die Messungen wurden je drei Mal auf frisch immobilisierten Sensoroberflächen wiederholt.

Nach jeder Analyt-Injektion erfolgte eine Injektion des Regenerationspuffers bei gleicher Flussrate für 30 s.

Eine unbehandelte Sensoroberfläche und Injektionen mit Probenpuffer ohne Analyt dienten als Referenzen, deren Messwerte von den Messwerten der Oberfläche mit Ligand bei Injektionen mit Analyt abgezogen wurden (doppelte Referenzsubtraktion).

2.2.5. Software

2.2.5.1. Ermittlung der Co-Lokalisation

Zur Ermittlung der Co-Lokalisation wurden am Fluoreszenz- oder am konfokalen Laserscannmikroskop erstellte Aufnahmen primärer Neurone auf 500x500 Pixel skaliert, in NIH ImageJ der Hintergrund subtrahiert und die Bilder anschließend in OpenView (geschrieben von Dr. Noam Ziv, Haifa, Israel, siehe auch (Tsuriel *et al.* 2006, Minerbi *et al.* 2009)) analysiert. In dem als Referenz festgelegten Kanal wurden Boxen von 8x8 Pixeln automatisch nach festgesetzten Regeln um stark gefärbte Punkte gelegt. Anschließend wurde die Fluoreszenz in einem zweiten Kanal auf den Referenzkanal bezogen, indem das Programm ermittelte, welche im Referenzkanal positiv markierten Punkte in dem zweiten Kanal ebenfalls ein ausreichend starkes Fluoreszenzsignal zeigten. Die Anzahl der in beiden Kanälen überlappenden Fluoreszenzsignale wurde durch die Gesamtzahl der im Referenzkanal markierten Punkte dividiert.

2.2.5.2. Bildbearbeitung für die Präsentation

Die Bearbeitung der Mikroskopie- und Blotbilder für die Präsentation erfolgte mit NIH ImageJ oder Photoshop 5.0 (Adobe Systems, San Jose, CA).

2.2.5.3. Messung der Optischen Dichte bzw. des Adjusted Volume der Banden eines Blots

Entwickelte Blotfilme wurden am BioRad GS-800TM Calibrated Densitometer eingescannt. Zur Quantifizierung wurden die Intensitäten der einzelnen Banden mit Quantity One 4.6.9. (BioRad) gemessen. Dazu wird um die größte der Banden ein Messrechteck angepasst, welches in dieser Größe anschließend manuell um alle weiteren zu messenden Banden gelegt wird. Eines der Rechtecke wird abseits der Banden auf den Hintergrund gelegt. Das Programm misst unter anderem die Optische Dichte und das Volumen (Summe der Intensitäten der Pixel innerhalb des definierten Bereichs multipliziert mit der Fläche des definierten Bereichs) und berechnet daraus das *Adjusted Volume* [OD x mm²] (Adj. Vol.) in welchem die Hintergrundintensität abgezogen

wird. Dieser Wert stellt die Grundlage für alle weiteren Berechnungen und statistischen Auswertungen dar.

2.2.5.4. Berechnung der Proteingesamtmenge und des Proteinanteils in ungebundener und gebundener Fraktion zur Auswertung der Pulldown-Assays

Die ungebundene Fraktion einer Pulldown-Probe hat ein Volumen von 350 – 500 µl (je nach Experiment), die an die Beads gebundenen Proteine werden in 50 µl SDS-Probenpuffer eluiert. Jeweils 10 µl jeder Fraktion werden pro Tasche in ein Proteingel aufgetragen, so dass die Bande der ungebundenen Fraktion 1/35 – 1/50 der ungebundenen Proteine enthält, und die Bande der gebundenen Fraktion 1/5. Somit berechnet sich die relative Gesamtmenge an Protein (100%), indem man den Wert des Adj. Vol. der ungebundenen Fraktion mit einem Faktor zwischen 35 und 50 und das gemessene Adj. Vol. der gebundenen Fraktion mit dem Faktor 5 multipliziert. Anschließend kann auf den prozentualen Gesamt-Proteinanteil pro Fraktion zurückgerechnet werden (Proteinanteil ungebunden und gebundenen).

2.2.5.5. Biacore Analyse Software

Generell wurde die Biacore T200 Evaluation Software 1.0 (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) für die Analyse der SPR-Messdaten genutzt. Die Analyse und Anpassung des Zwei-Stufen-Modells im *Single Cycle Kinetics* (SCK) –Modus erfolgte am Biacore X100-Gerät mit gerätespezifischer Software.

2.2.5.6. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism Version 5.02, GraphPad Software, San Diego, USA.

3. Ergebnisse

3.1. Der AKAP79 Pro100Leu Polymorphismus

Der AKAP79 Pro100Leu SNP führt zu einem Aminosäureaustausch von Prolin zu Leucin an Position 100 im AKAP79-Protein. Einen ersten Hinweis, ob sich dieser Polymorphismus auf die Struktur des AKAP79-Proteins auswirken könnte, geben spezielle Computerprogramme, mit deren Hilfe eine Vorhersage der Proteinstruktur anhand der Aminosäuresequenz gemacht werden kann. Zu diesem Zweck wurden drei Programme ausgewählt, GOR IV, HNN und PEPFOLD, deren Herangehensweise an die Problematik sich so stark unterscheidet, dass man von unabhängigen Vorhersagen ausgehen kann.

Das GOR (Garnier-Osguthorpe-Robson) –Programm ist eine auf der Informationstheorie beruhende Anwendung zur Vorhersage der Sekundärstruktur von Proteinen anhand ihrer Aminosäuresequenz (Garnier et al. 1996). Sie basiert auf Wahrscheinlichkeitsparametern, welche in empirischen Studien an 267 Proteinen, deren Tertiärstrukturen durch Röntgenkristallstrukturanalyse aufgeklärt sind, ermittelt wurden. Es wird in Fenstern aus jeweils 17 Aminosäuren gerechnet, wobei die Wahrscheinlichkeiten zur Bildung einer α -Helix, einer β -Faltblatt-Struktur, eines Knicks oder einer Zufallsstruktur (*random coil*) jeweils für die mittlere, neunte Aminosäure angezeigt werden. Diese Wahrscheinlichkeiten werden für jede einzelne Aminosäure berechnet und das Ergebnis für AKAP79 Pro100 und Leu100 ist visuell in Abb. 5A dargestellt.

Die HNN (Hierarchical Neural Network) Methode kombiniert mehrere neurale Netzwerke, evaluiert den Output mehrerer Proteinstruktur-Vorhersagen, um eine finale Prädiktion zu machen (Guermeur et al. 1999). Die damit erzielte Vorhersage ist in Abb. 5B zu sehen.

PEPFOLD ist ein Programm, welches bisher nur die Struktur kleinerer, bis zu 36 Aminosäuren langer, Peptide vorhersagen kann. Zunächst sagt es die Konformation submolekularer Strukturen in der angefragten Sequenz für jede einzelne Aminosäure voraus, woraufhin diese zu dem Modell mit dem geringsten Energielevel zusammengefasst werden (Maupetit et al. 2009). Die dreidimensionalen Darstellungen des AKAP79-B-Pro und -Leu – Allels sind in Abb. 5C zu finden.

Alle drei Programme sagen unabhängig voneinander eine Verlängerung des α -helikalen Bereichs um den Polymorphismus in der Sekundärstruktur des AKAP79-Proteins im Falle eines Aminosäureaustausches von Prolin zu Leucin voraus (Abb. 5A, B und C).

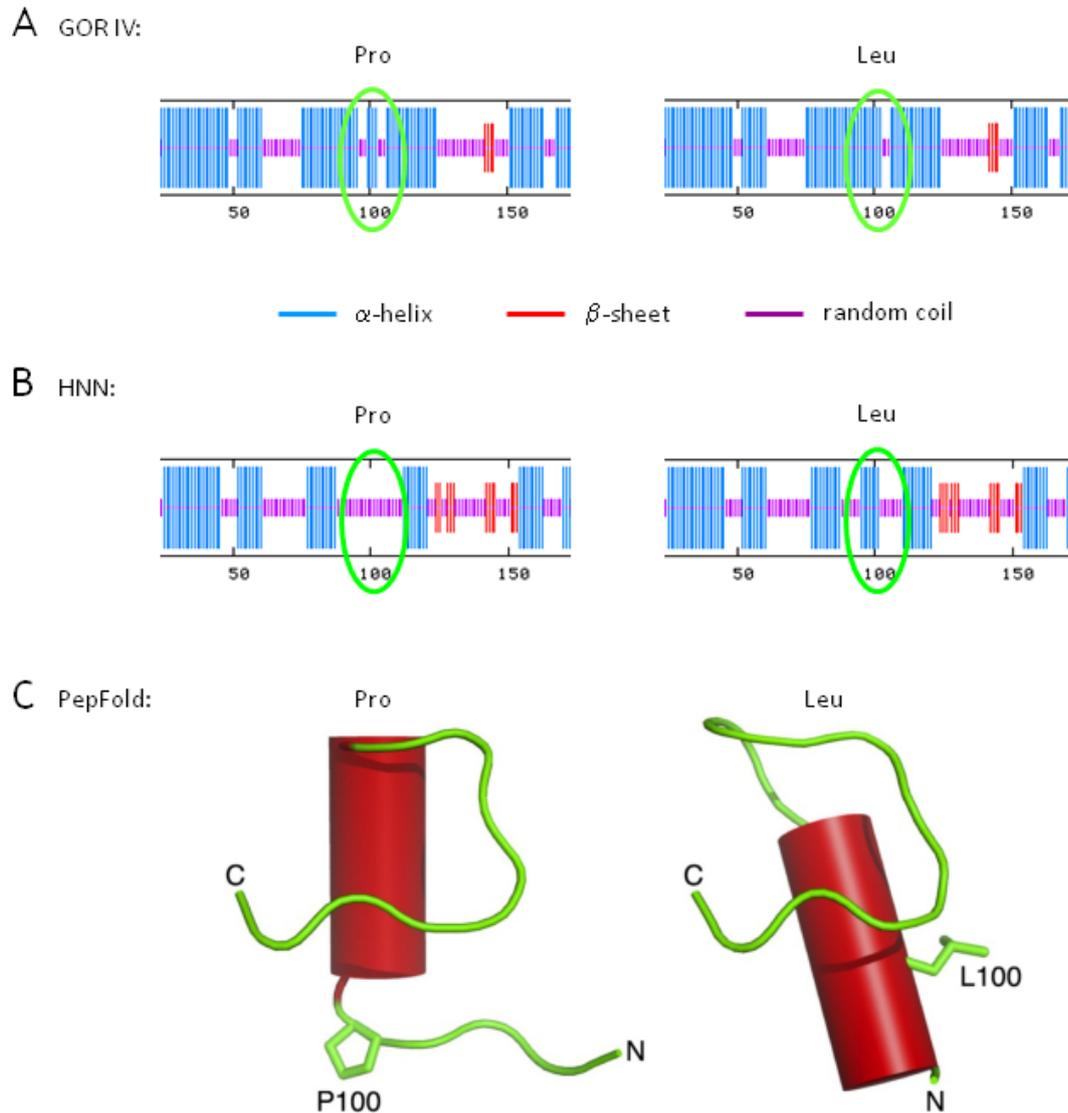


Abb. 5: Proteinstrukturvorhersagen für beide Allele des AKAP79 Pro100Leu SNPs mit Hilfe dreier Prädiktionsprogramme, A) GOR IV, B) HNN und C) PEPFOLD.

In A) und B) ist die Struktur um Aminosäureposition 100 grün umrandet.

C) In dieser Vorhersage wurde AKAP79 AS 96–116 in Kooperation mit Dr. Carsten Reissner mit Hilfe des Programms PEPFOLD modelliert. Der α -helikale Bereich ist als roter Zylinder dargestellt. Die Seitenketten von Prolin (P100) oder Leucin (L100) sind hervorgehoben. C = C-Terminus; N = N-Terminus.

Die Modelle stimmen dahingehend überein, dass sie für das Prolin-Allel eine Beendigung oder gar das Fehlen des dortigen α -helikalen Bereichs vorhersagen, wohingegen Leucin in diese α -Helix integriert ist.

3.1.1. Genetische Typisierung des AKAP79 Pro100Leu Polymorphismus

DNA wurde aus venösem Blut, das den Studienteilnehmern durch eine medizinische Fachkraft entnommen worden war, extrahiert und mit Hilfe der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Methode auf das Vorhandensein der beiden AKAP79-Allele hin getestet. Zunächst wurde ein Typisierungsprotokoll erstellt, wie im folgenden Abschnitt beschrieben.

3.1.1.1. Erstellung eines Typisierungsprotokolls am Beispiel des AKAP79 Pro100Leu Polymorphismus

In Abb. 6 ist die Nukleotid–Sequenz des Offenen Leserrasters des AKAP5 Gens dargestellt. Der Nukleotid–Austausch von einem Cytosin zu einem Thymin, die Grundlage des Pro100Leu SNPs, befindet sich an Position 299, an der das Thymin in roter Schrift hervorgehoben ist.

Der erste Schritt zur Erstellung eines Typisierungsprotokolls bestand in der Suche nach einer Restriktionsendonuklease, einem DNA–schneidenden Enzym, dessen Erkennungssequenz mit der den Polymorphismus enthaltenden Sequenz übereinstimmt. Das Restriktionsenzym sollte dabei nur in einer der Genvarianten schneiden, so dass eine Unterscheidung beider Allele möglich ist. Das Enzym AluI (fermentas) schneidet die Sequenz **AGCT**. Nur das seltenere Thymin–Allel wird von dem Restriktionsenzym geschnitten (Abb. 6).

```

atggaaccacaatttcagaaattcatgtagaaaacaaggatgagaagagatcagcagaaggtagtcctggggctga
aaggcagaaggaaaaggcatccatgctttgcttcaagagaagaagaagcagccaaagcactgaagcccaaagctg
gctctgaagctgctgatgtggcaaggaagtgtccacaagaagcaggagcttctgatacagccagagcccaacacggggg
gctctgggctcactcaaacgtcttgtaacacgcaggaaaaggctcagagtccttcaaagcagcaaaaagctattggaggg
tgaatgcaacctgcaataaatgctgaggatgctgatcttttcaagaaaaaggcaaaatctagacttaagattccct
gcataaaattccaagaggccaaaaaggagtaatcattccaaaatataagaagactcagactgcagcatcaaaagt
caggaagaagctgaaatttggatatacaaacacagacccattgaaatgatcaggcaacaaaggctaagtcaacca
ggatctaagtgaaggcatctcacggaagatgggtgatgaggtctgtgaaatcaaatgtgagcaatagcataactctg
gagagaaagtgatttcagtagaacttggattagataatgggcatctctgctattcaaacgggaactctaactctgaa
gaaatgaaacgatcaaggaaaaacaagatgttcaacccagcaagcaagccacttgaaacttcagaacagacca
tcagcagccagctactttctgatgttctctcttacttgcaattccagatcaacaaatgtggaagaagccagtaaca
gtaccctagaaagtgcaccaaattggaagactatgaaagtacagagattgtagctgaagaaactaagccaaaagat
actgaattgagccaagaatcagattttaaagaaaatgggatcactgaagagaaaatccaaatcagaagaaagcaaaag
aatggagccaattgctattattattacagacactgaaatcagtgaaatttgatgttcaaaaatctaaaaatgtcccta
agcaattcttaatttcagctgaaaatgagcaagtagggggttttggctaatgataatgggttttgaggatagaacttca
gaacaatatgaaacactcttaattgaaacagcctctctctagtcagaatgctattcagttgtcaatagaacagct
ggttaatgaaatggcctctgatgataataaaataaacaatcttctacagtga

```

Abb. 6: Darstellung der Nukleotid–Sequenz des Offenen Leserasters des Thymin–Allels des humanen AKAP5 Gens.

Die blau und kursiv geschriebenen Sequenzen am 5′ und 3′ Ende sind die inneren Klonierungsprimer, welche 5′ und 3′ mit zusätzlichen Nukleotiden zur Einpassung in das Leseraster des Klonierungsvektors und zur Erzeugung von Restriktionsschnittstellen für EcoRI (5′) und BamHI (3′) ergänzt wurden (siehe Tab. 11).

Bei den grün und kursiv geschriebenen Sequenzen handelt es sich um die Sequenzen der Typisierungsprimer (siehe Tab.10).

Gelb markiert sind die Erkennung– und gleichzeitig Schnittsequenzen des AluI Restriktionsenzym.

An Basenposition 299 ist im AKAP79 Pro100Leu SNP das Cytosin gegen Thymin ausgetauscht und hier in roter Schrift hervorgehoben. AluI kann nur das hier gezeigte seltenere Thymin–Allel schneiden.

Die AluI–Erkennungssequenz tritt insgesamt sieben bzw. acht Mal (je nach Allel) im humanen AKAP5 Gen auf (Abb. 6). Die Typisierungsprimer (Abb. 6, in grüner, kursiver Schrift) enthalten die den SNP einrahmenden AluI–Schnittsequenzen, so dass das Produkt der Polymerase–kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) nach dem Verdau mit AluI in zwei DNA–Fragmenten verschiedener Länge resultiert. Das ungeschnittene C–Allel Fragment hat eine Länge von 270 Basenpaaren (bp), die beiden geschnittenen Fragmente des selteneren T–Allels umfassen 95 und 175 bp. Diese Fragmentgrößen lassen sich gut nach ihrer Auftrennung durch

Elektrophorese im Agarose–Gel unterscheiden. In Abb. 7 ist ein repräsentativer Ausschnitt eines AKAP79 Pro100Leu Typisierungsgels mit allen drei Allelkombinationen (CC, CT und TT) zu sehen.



Abb. 7: Repräsentativer Ausschnitt eines AKAP79 Pro100Leu Typisierungsgels mit allen Genotypen.

Die Gesamtlänge des bei der Typisierung amplifizierten DNA–Fragments beträgt 270 bp (Basenpaare). Das Cytosin–Allel bleibt ungeschnitten. Die geschnittenen T–Allel–Fragmente sind 95 und 175 bp lang.

Neben dem AKAP79 Pro100Leu Polymorphismus (rs2230491) wurden Typisierungsprotokolle für zwei weitere AKAP79 SNPs erstellt, für den Ser205Phe Polymorphismus (rs 2230492) und den Glu314Lys Polymorphismus (rs 34433837). Entsprechend den Angaben der ncbi–Datenbank über die Häufigkeit dieser SNPs in der europäischen Bevölkerung wurden jedoch weder 205Phe– noch 314Lys–Träger unter den Studienteilnehmern gefunden, so dass keine Korrelation mit neuropsychologischen Daten möglich war.

3.1.1.2. Typisierung und Vergleich dreier Probandenkohorten

Zwei Kohorten gesunder Probanden (NG– und mbm–Kohorte) wurden nacheinander überwiegend unter den Studenten der Magdeburger Otto–von–Guericke–Universität und der Hochschule Magdeburg–Stendal rekrutiert. Mit Hilfe der zweiten Kohorte sollen die für die erste Kohorte erhaltenen Ergebnisse überprüft werden.

Bei der dritten Kohorte (BPS) handelt es sich um Patienten mit Borderline–Persönlichkeitsstörung, die in Kooperation mit Frau Lydie Leschak und PD Dr. Stefan Röpke an der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Charité Berlin rekrutiert wurden.

Die Untersuchungen an menschlichen Probanden waren von den Ethikkommissionen der Otto–von–Guericke–Universität Magdeburg, der Medizinischen Fakultät Magdeburg und der Charité Universitätsmedizin Berlin begutachtet und genehmigt worden.

Nachfolgend sind detaillierte Beschreibungen sowie AKAP79 Pro100Leu – Typisierungsergebnisse der einzelnen Kohorten gezeigt.

3.1.1.2.1. Der AKAP79 Pro100Leu SNP in der NG (NeuroGen) –Kohorte

Der Name der ersten Kohorte steht für das Projekt „NeuroGen“ (NG). Die Probanden wurden in den Jahren 2006 – 2010 rekrutiert. Die Kohorte umfasst insgesamt 794 gesunde Probanden, welche von der Psychologin Dr. Sylvia Richter im Rahmen ihrer Doktorarbeit betreut wurden (Richter 2010). Das Durchschnittsalter der Probanden zum Zeitpunkt der Testung belief sich auf 23 ± 3 Jahre.

Die Genotypen des AKAP79 Pro100Leu SNPs verteilen sich wie in der zusammenfassenden Tabelle und Graphik gezeigt (Abb. 8). Bei einer Gesamtzahl von 794 Probanden tragen 241 (27%) eines oder zwei Exemplare des selteneren T-Allels, 11 davon sind homozygote T-Allel-Träger. Es ergibt sich eine C-Allel-Frequenz von 0,86 und eine T-Allel-Frequenz von 0,14 (Tab. 34). Dieser Wert entspricht der auf ncbi für die europäische Bevölkerung ermittelten Allelfrequenz von 0,15 (HapMap CEU) und der von Frank et al. publizierten Frequenz von 0,13 (Frank et al. 2008).

Innerhalb der Kohorte ist das seltenere T-Allel bei Frauen häufiger als bei Männern (Frauen: 30%; Männer: 23%). 2% der Frauen sind homozygote T-Allel-Trägerinnen, im Gegensatz zu nur 0,6% der Männer. Die T-Allel-Frequenz bei Frauen beträgt 0,16, bei Männern hingegen nur 0,12 (Tab. 34). Dieser Unterschied in der Geschlechterverteilung der Allele wurde in der weiteren Auswertung der Ergebnisse durch Fr. Dr. Richter berücksichtigt (Richter et al. 2011).

3.1.1.2.2. Der AKAP79 Pro100Leu SNP in der mbm (Magdeburg–Berlin–Magdeburg) – Kohorte

Die zweite Kohorte wurde ab dem Jahr 2011 in Zusammenarbeit zwischen dem Leibniz-Institut für Neurobiologie Magdeburg, und der Charité Berlin, aufgebaut und trägt daher den Namen mbm für das Projekt Magdeburg–Berlin–Magdeburg. Sie wird von Dipl.–Psych. Adriana Barman im Rahmen ihrer Doktorarbeit betreut.

Die mbm-Kohorte umfasst bisher insgesamt 463 Probanden, 265 Frauen und 198 Männer (Abb. 8). Das mittlere Alter dieser Probanden zum Zeitpunkt der Testung betrug $23,9 \pm 3$ Jahre, sodass die Gruppe im Hinblick auf das Alter vergleichbar ist mit der NG-Kohorte.

Von den 463 Probanden tragen 134 (28,9%) mindestens ein T-Allel und davon sind 14 Probanden (3%) homozygot für das seltenere Allel. Das ergibt Allelfrequenzen von 0,84 und 0,16 für das C- und T-Allel (Tab. 34). Somit kommt in dieser Kohorte das T-Allel insgesamt minimal häufiger vor als in der vorangegangenen NG-Kohorte.

Auch in dieser Kohorte ist der Anteil homozygoter T-Allel-Träger unter den Frauen wesentlich höher ist als unter den Männern (3,8% im Vergleich zu 2%). Die Frequenz des selteneren T-Allels in Frauen beträgt 0,17, in Männern beläuft sie sich auf 0,15.

3.1.1.2.3. Der AKAP79 Pro100Leu SNP in der BPS (Borderline Persönlichkeitsstörung) – Kohorte

Die Patienten der BPS-Kohorte mit diagnostizierter Borderline Persönlichkeitsstörung (BPS) stammen von der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Charité Berlin (PD Dr. Stefan Röpke und Frau Lydie Leschak).

Die Diagnose erfolgte anhand ausführlicher Erhebungen der Krankengeschichten, strukturierter klinischer Interviews, Fremdanamnesen und umfangreicher Fragebogenzusammenstellungen.

Insgesamt umfasst diese Kohorte 381 Probanden, davon 338 weibliche und nur 43 männliche (Abb. 8). Das Alter der Probanden dieser Gruppe variierte sehr stark und lag zum Zeitpunkt der Testung zwischen 18 und 60 Jahren.

Im Hinblick auf die Häufigkeit der Allele liegt diese Patientengruppe zwischen den beiden Kohorten der gesunden Probanden. Unter den 381 Patienten fanden sich 103 (27%) mit

mindestens einem T-Allel, darunter 8 (2,1%) homozygote T-Allel-Träger (Abb. 8). Alle acht dieser homozygoten T-Allel-Träger sind weiblich, wobei zu beachten ist, dass es bei einem Prozentsatz von 2,1% möglich ist, dass keiner der 43 getesteten männlichen Probanden diesen Genotyp aufweist. Dennoch zeigt sich in dieser Gruppe wiederholt eine Häufung des selteneren Allels bei den weiblichen Probanden.

Die Allelfrequenzen der gesamten Gruppe belaufen sich auf 0,85 (C-Allel) und 0,15 (T-Allel). Teilt man die Gruppe in weibliche und männliche Probanden, so spiegeln die für die Gesamtgruppe berechneten Allelfrequenzen die Frequenzen in der Gruppe der weiblichen Probanden wider. Die 43 männlichen Probanden kommen auf etwas abweichende Allelfrequenzen von 0,9 (C-Allel) und 0,1 (T-Allel).

In Abbildung 8 sind alle Werte bis auf die Allelfrequenzen sowohl in Tabellen als auch graphisch zusammengefasst. Die Allelfrequenzen können in Tabelle 34 nachgelesen werden.

Abb. 8: Tabellarische und graphische Zusammenfassung und Veranschaulichung der Ergebnisse der AKAP79 Pro100Leu bzw. AKAP79 C299T Genotypisierung in drei Probandenkohorten und Aufteilung dieser Kohorten in weibliche und männliche Probandengruppen.

In den Tabellen ist die Anzahl der getesteten Probanden mit dem jeweiligen Genotyp bzw. der prozentuale Anteil der jeweiligen Genotypen in den drei Kohorten aufgetragen.

Darunter ist die Verteilung der Allele je Kohorte in einem Kreisdiagramm veranschaulicht.

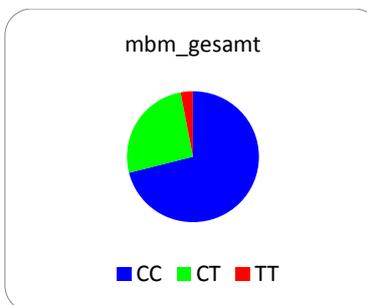
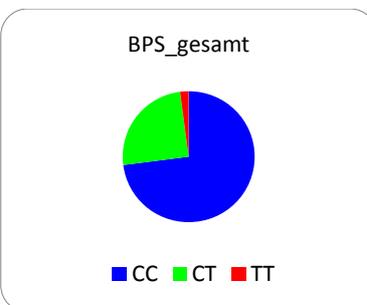
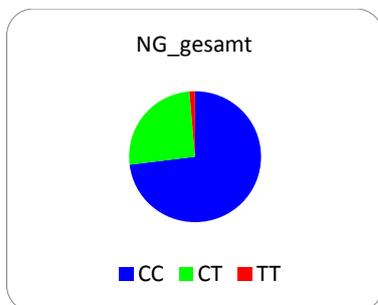
A) Gesamtbilanz der drei Kohorten.

B) Verteilung der Allele im weiblichen Anteil der Kohorten.

C) Verteilung der Allele im männlichen Anteil der Kohorten.

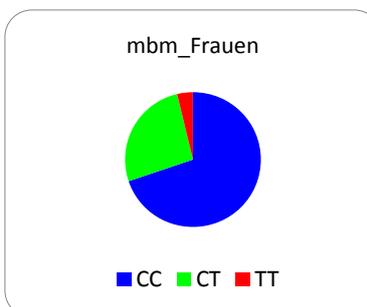
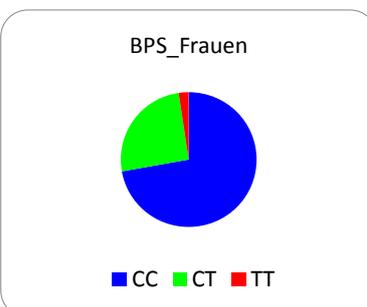
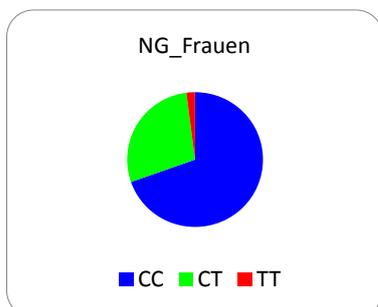
A) gesamt

gesamt Gruppe/Genotyp	Anzahl				Anteil in [%]			
	CC	CT	TT	gesamt	CC	CT	TT	CT + TT
NG	580	203	11	794	73,0	25,6	1,4	27,0
mbm	329	120	14	463	71,1	25,9	3,0	28,9
BPS	278	95	8	381	73,0	24,9	2,1	27,0



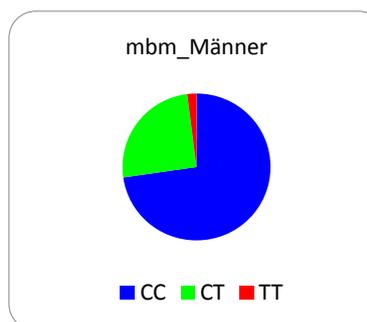
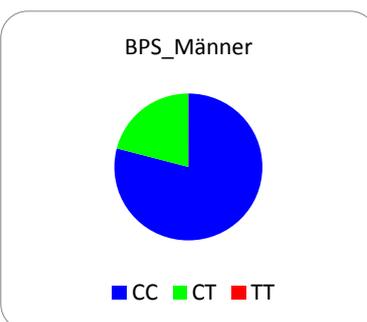
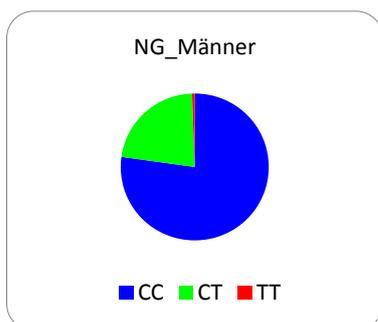
B) Frauen

Frauen Gruppe/Genotyp	Anzahl				Anteil in [%]			
	CC	CT	TT	gesamt	CC	CT	TT	CT + TT
NG	307	125	9	441	69,6	28,3	2,0	30,4
mbm	185	70	10	265	69,8	26,4	3,8	30,2
BPS	244	86	8	338	72,2	25,4	2,4	27,8



C) Männer

Männer Gruppe/Genotyp	Anzahl				Anteil in [%]			
	CC	CT	TT	gesamt	CC	CT	TT	CT + TT
NG	271	78	2	351	77,2	22,2	0,6	22,8
mbm	144	50	4	198	72,7	25,3	2,0	27,3
BPS	34	9	0	43	79,1	20,9	0,0	20,9



3.1.1.2.4. Ermittlung des Hardy–Weinberg Gleichgewichts des AKAP79 Pro100Leu SNPs in den drei Kohorten

Nach der Ermittlung der Allelfrequenzen eines SNPs sollte die beobachtete Allelverteilung auf die Einhaltung des Hardy–Weinberg–Gleichgewichts (HWG) überprüft werden.

Die Hardy–Weinberg Regel, 1908 unabhängig sowohl von W. Weinberg als auch von G. H. Hardy formuliert, geht von einer idealen Population aus, in welcher keine Evolutionsfaktoren wirken (Weinberg 1908, Hardy 1908). Sie besagt, dass die Allelfrequenzen von Generation zu Generation konstant bleiben, insofern sich in der betrachteten Population alle Mitglieder zufällig und mit gleicher Wahrscheinlichkeit miteinander fortpflanzen (Panmixie) und weder Mutationen, noch Selektion, Gendrift und Migration stattfinden.

Stellt p die Frequenz des AKAP79_Prolin–Allels und q die Frequenz des AKAP79_Leucin–Allels dar, so addieren sich die Häufigkeiten beider Allele zur Gesamthäufigkeit:

$$p + q = 1 \quad [1]$$

Demnach gilt für die Wahrscheinlichkeiten aller drei verschiedenen Genotypen, das heißt für die Homozygotie eines der beiden Allele (p^2 bzw. q^2) und das Zusammentreffen beider Allele ($2pq$), die Hardy–Weinberg–Gleichung:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1 \quad [2]$$

Setzt man die in der Typisierung ermittelten Frequenzwerte in die Hardy–Weinberg–Gleichung ein, so kann man die erwartete Anzahl Probanden mit einem bestimmten Genotyp berechnen und mit der beobachteten Anzahl vergleichen.

Kaum ein Allel einer real existierenden Population liegt mit absoluter Genauigkeit im HWG. Die Abweichung vom HWG kann durch den χ^2 –Test abgeschätzt werden (Pearson 1900, Greenwood & Nikulin 1996). Der χ^2 –Wert berechnet sich wie folgt:

$$\chi^2 = \sum [\text{beobachtete Anzahl} - \text{erwartete Anzahl}]^2 / \text{erwartete Anzahl} \quad [3]$$

Die Nullhypothese geht davon aus, dass die beobachteten Allelfrequenzen im HWG liegen. Bei drei möglichen Genotypen aus zwei Allelen ergibt sich ein Freiheitsgrad von 1. In diesem Fall muss der χ^2 –Wert unter 3,84 liegen, um die Nullhypothese zu bestätigen. Eine signifikante Abweichung würde bedeuten, dass ein oder mehrere der oben genannten Faktoren nicht auf die beobachtete Population angewendet werden können oder dass Fehler bei der Genotypisierung aufgetreten sind und müsste untersucht und diskutiert werden.

Wie in Tabelle 34 gezeigt, liegt die Verteilung der AKAP79–Allele in den drei Kohorten im HWG, selbst wenn man die Kohorten in weibliche und männliche Gruppen unterteilt (Tab. 34).

Gruppe / Allel	gesamt			Frauen			Männer		
	C	T	χ^2	C	T	χ^2	C	T	χ^2
NG	0,86	0,14	2,08	0,84	0,16	0,83	0,88	0,12	2,08
mbm	0,84	0,16	0,57	0,83	0,17	1,06	0,85	0,15	0,02
BPS	0,85	0,15	0	0,85	0,15	0,02	0,9	0,1	0,59

Tab. 34: AKAP79 Pro/Leu bzw. C/T –Allelfrequenzen und Abweichung vom HWG ausgedrückt durch den χ^2 –Wert.

3.1.3. Korrelation der genetischen Daten mit Ergebnissen aus der Neuropsychologie

Im Rahmen ihrer Promotion suchte Frau Dr. Sylvia Richter nach Auswirkungen genetischer Polymorphismen postsynaptischer Proteine auf bestimmte Verhaltensmerkmale (mit Schwerpunkt Ärger und Aggression) und Lern- sowie Gedächtnisprozesse. Die Ergebnisse der AKAP79 Pro100Leu – Studie sind in Richter et al., 2011 publiziert (Richter *et al.* 2011).

Nach genauer Überprüfung der Datensätze auf Vollständigkeit mussten einige Probanden ausgeschlossen werden, so dass insgesamt 527 Probanden der NG-Kohorte in der Studie verblieben. Davon waren 370 homozygot für das C-Allel und damit Prolin- (Pro-) Träger, 150 heterozygot (CT) und 7 homozygot für das seltenere T-Allel und demzufolge Leucin- (Leu-) Träger. Bei der Auswertung wurden aufgrund der geringen Anzahl homozygoter Leucin-Träger alle Probanden mit dem selteneren Thymin-Allel zu einer Gruppe zusammengefasst (CT + TT).

Um mögliche Effekte ausgewählter Polymorphismen auf aggressives Verhalten untersuchen zu können, wurden zwei etablierte Selbstbeschreibungsfragebögen ausgewählt und im Rahmen der Erhebung psychometrischer Daten in der NG-Kohorte eingesetzt: erstens der Buss and Perry Aggression Questionnaire (BPAQ, (Buss & Perry 1992)), zweitens das State-Trait Anger Expression Inventory (STAXI, entwickelt von Spielberger, 1991 (Spielberger 1991), und ins Deutsche übersetzt von Schwenkmezger und Hodapp (Schwenkmezger & Hodapp 1991)).

In der statistischen Auswertung der gewonnenen Fragebogendaten wurden Geschlecht und Genotyp als unabhängige Faktoren in einer multivariaten Varianzanalyse (MANOVA) berücksichtigt. Das Alter wurde als Kovariate in die Berechnungen einbezogen. Sowohl für das Geschlecht als auch für das Alter wurden signifikante Effekte gefunden, die aber nicht mit dem Effekt des AKAP79-Genotyps interagierten.

Nach weiteren Prüfungen (einseitige *post hoc* t-Tests und lineare Diskriminanzanalyse (LDA)) ergab die statistische Auswertung für Leucin-Allel-Träger signifikant niedrigere Werte auf der Skala der körperlichen Aggression des BPAQ und signifikant höhere Werte auf der Skala der Ärgerkontrolle des STAXI (vgl. (Richter et al. 2011)).

Auf Basis dieser Ergebnisse erfolgte eine weiterführende Studie unter Verwendung der funktionellen Magnetresonanztomographie (fMRT). Die Probanden absolvierten eine Aufgabe zur Erfassung exekutiver Leistungen (Eriksen-Flanker-Aufgabe (Eriksen 1974)), welche mit, für die Aufgabe irrelevanten, emotionalen oder neutralen Hintergrundstimuli kombiniert wurde (Präsentation ärgerlicher oder neutraler Gesichter). Sowohl die Anzahl an Fehlreaktionen als auch die Reaktionszeiten der Probanden waren, wie erwartet, in der kognitiv anspruchsvolleren (inkongruenten) Version der Aufgabe wesentlich höher als in der deutlich leichter zu bearbeitenden kongruenten Version der Flanker-Aufgabe. Die Präsentation emotionaler Gesichter hatte eine schwache aber signifikante Erhöhung der Fehlerrate, nicht aber der Reaktionszeiten, zur Folge. Es konnte keine bedeutsame Interaktion zwischen den Faktoren Kongruenz und Emotionalität nachgewiesen werden. Der AKAP79-Genotyp hatte weder auf die Fehlerrate noch auf die Reaktionszeit der Probanden einen signifikanten Einfluss. Interessanterweise zeigten aber die Leucin-Träger eine stärkere Aktivierung des linken anterioren cingulären Cortex (ACC) bei Präsentation emotionaler Hintergrundbilder in der inkongruenten Version der Flanker-Aufgabe. Der ACC ist unter anderem an Prozessen der Handlungskontrolle und Fehlerüberwachung beteiligt (Mansouri *et al.* 2009). Prolin-Träger

hingegen wiesen unter den gleichen Bedingungen eine stärkere Aktivierung des rechten medialen orbitofrontalen Cortex (OFC) auf, welcher unter anderem an der der Verarbeitung emotionaler Stimuli beteiligt ist (Kringelbach 2005, Hart *et al.* 2010).

Eine ausführliche Diskussion der Ergebnisse ist in Richter *et al.*, 2011, zu finden (Richter *et al.* 2011).

3.2. Vergleich der Expression und Lokalisation beider AKAP79 Allele

3.2.1. AKAP79 Klonierung und Expression in Cos7-Zellen

Da in der neuropsychologischen Untersuchung signifikante Unterschiede in der Ärgerverarbeitung in Abhängigkeit vom AKAP79 Pro100Leu Genotyp nachgewiesen werden konnten, sollte im Folgenden nach molekularen Konsequenzen des SNP gesucht werden.

Um die Assoziation der AKAP79–Allele mit Membranen zu beobachten, sollten zunächst Cos7–Zellen und in der Folge primäre Neuronen mit AKAP79–DNA transfiziert werden. Zu diesem Zweck wurde das AKAP79–Gen aus humaner DNA kloniert. Da es sich beim humanen AKAP5 Gen um ein Intron–loses Gen handelt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/M90359>), konnte es direkt aus genomischer DNA, welche aus venösem menschlichem Blut extrahiert wurde, mittels PCR amplifiziert werden. Im pEGFP–N1–Vektor ist AKAP79 C–terminal mit dem Grün fluoreszierenden Protein (GFP) fusioniert. Die folgende Abbildung zeigt typische Expressionsmuster beider AKAP79–Allele in Cos7–Zellen (Abb. 9).

Zur Kontrolle mit leerem pEGFP–Vektor transfizierte Zellen zeigen GFP–Expression vor allem im Soma und extensiv im Zellkern (Abb. 9). Im Gegensatz dazu erscheint die AKAP79–GFP Expression schwach im Soma und etwas konzentrierter in der Peripherie der Zellen, an der Plasmamembran, in Zellausläufern und an Strukturen, die membranöse Einfaltungen sowie die Kernmembran darstellen könnten. Eindeutig lässt sich das nicht feststellen, da keine Gegenfärbung mit einem Protein der Plasma– oder der Kernmembran erfolgte.

Die Pfeile in Abbildung 9 deuten auf Bereiche erhöhter AKAP–GFP Anreicherung. Zwischen dem Prolin– und dem Leucin–Allel ist kein wahrnehmbarer Unterschied in der Expression und subzellulären Lokalisation erkennbar.

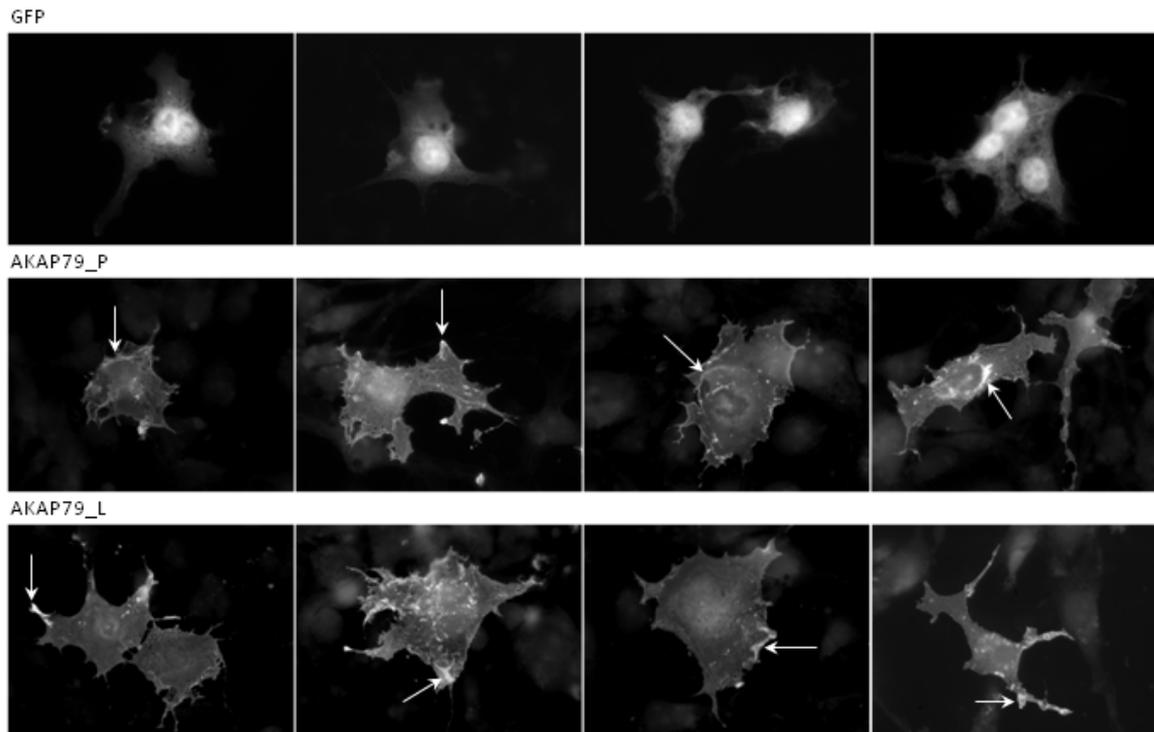


Abb. 9: GFP-, AKAP79_Prolin-GFP- (AKAP79_P) oder AKAP79_Leucin-GFP- (AKAP79_L) Expression in transfizierten Cos7-Zellen.

Die Pfeile deuten auf Bereiche verstärkter AKAP-GFP-Lokalisation.

Es ist bekannt, dass der N-terminale Teil von AKAP79 drei polybasische Domänen enthält, welche für die Lokalisation des AKAP79-Proteins an der Plasmamembran und in Lipid Rafts verantwortlich sind (Abb. 2). Diese Domänen sind überwiegend α -helikal gefaltet und enthalten positiv geladene Aminosäurereste, welche mit den negativen Phosphatgruppen im Phospholipid PIP_2 assoziieren können (Dell'Acqua et al. 1998). Außerdem können die Cysteinreste C36 und C129 palmitoyliert werden, was die Lokalisation von AKAP79 in Lipid Rafts fördert (Delint-Ramirez et al. 2011).

Da der Aminosäureaustausch von Prolin zu Leucin voraussichtlich eine Verlängerung des α -helikalen Bereiches in der B-Domäne zur Folge hat (siehe Abb. 5), könnte der Polymorphismus eine Auswirkung auf die Membranassoziation von AKAP79 haben.

Die Expression der AKAP79 *full-length* Konstrukte in Cos7-Zellen erwies sich als relativ schwach und lieferte nur geringe Expressionsraten. Da es weiterhin denkbar wäre, dass Interaktionen des mittleren und C-terminalen AKAP79-Teils, welche nicht an der direkten Membranlokalisation beteiligt sind, das Ergebnis beeinflussen könnten, wurde zur Untersuchung des Einflusses des Aminosäureaustauschs auf die Membranlokalisation das N-terminale Fragment von AKAP79, bestehend aus den drei polybasischen Domänen (Aminosäuren 28 – 151), in einen pEGFP-Vektor kloniert (pEGFP-c2-N-term_P (N-term_P) und pEGFP-c2-N-term_L (N-term_L)).

Cos7-Zellen wurden mit den beiden N-terminalen Konstrukten transfiziert und die Expression dokumentiert (Abb. 10). Insgesamt ist sie der Expression der AKAP79 *full-length* Konstrukte sehr ähnlich (vgl. Abb. 9 mit 10). Die Fluoreszenz ist schwach im Soma zu beobachten, mit etwas verstärkter Lokalisation in den peripheren Zellbereichen, Zellausläufern und membranösen Einfaltungen. Im Gegensatz zum *full-length* Fusionsprotein bildet das N-terminale Fragment

allerdings Aggregate, die als auffällig stark fluoreszierende Punkte sichtbar sind. Ein Unterschied zwischen dem P- und dem L-Allel ist nicht ersichtlich (Abb. 10).

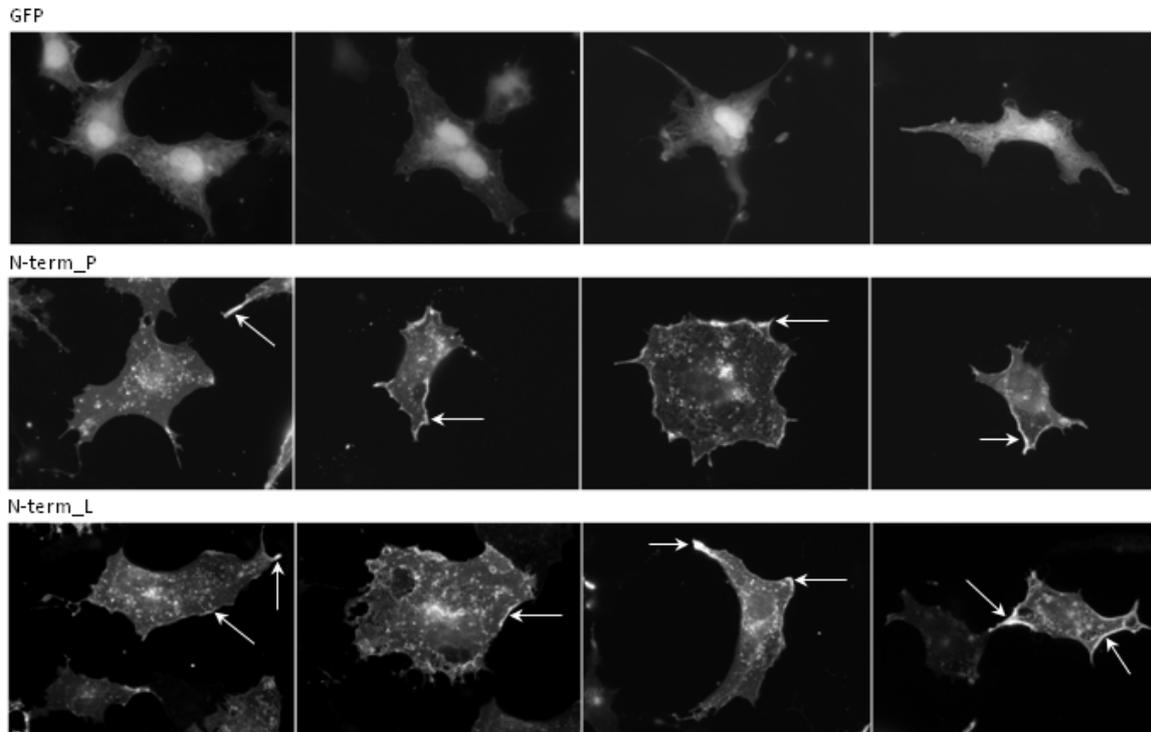


Abb. 10: Expression von GFP, GFP-N-term_Prolin (N-term_P) und GFP-N-term_Leucin (N-term_L) in Cos7-Zellen. Die Pfeile deuten auf Bereiche verstärkter Lokalisation.

3.2.2. Untersuchung der Assoziation der AKAP79-Varianten mit Membranen

Prozesse synaptischer Plastizität werden primär über den Einstrom und die Konzentration von Ca^{2+} gesteuert. Seinen Einfluss übt Ca^{2+} vor allem über seine Bindung an Ca^{2+} -Sensor-Proteine wie das CaM aus, welche Ca^{2+} -abhängig auf ihre Effektorproteine wirken. Unter anderem beeinflusst die Bindung von Ca^{2+} /CaM die Assoziation vom N-terminalen AKAP79-Teil mit dem Actin-Cytoskelett (Gomez et al. 2002). Deshalb erschien es wichtig, die Löslichkeit von AKAP79 in Ca^{2+} -haltigem und -freiem Puffer zu messen.

Um die Membranassoziation beider AKAP79-Allele nicht nur rein optisch zu betrachten, sondern auch proteinbiochemisch zu untersuchen und quantifizieren zu können, wurden die N-terminalen Konstrukte in HEK293-Zellen exprimiert und die Zellextrakte einer Membranfraktionierung unterzogen. Dazu wurden die transfizierten Zellen in 20 mM hypotonischem HEPES-Puffer homogenisiert und aufgebrochen. Durch Verzicht auf den Zusatz von Detergenzien konnten membrangebundene oder mit dem Cytoskelett assoziierte Proteine durch anschließende Ultrazentrifugation bei 100.000 x g pelletiert werden, so dass eine Trennung von cytosolischer (soluble, S100) und grober Membranfraktion (pellet, P100) stattfand.

Der Hauptanteil des Fusionsproteins fand sich unter beiden Ca^{2+} -Bedingungen im Membranpellet (P100) wieder (Abb. 11). Die optische Dichte der Banden beider Konstrukte in den einzelnen Fraktionen wurde gemessen und zum Volumen der Bande in Relation gesetzt (*Adjusted Volume*, siehe Kapitel 2.2.5.3.). S100- und P100-Werte eines Konstrukts unter einer

Bedingung wurden zu 100% zusammengefasst und der jeweilige Anteil in % jeder einzelnen Fraktion berechnet. In Abbildung 11 sind die Blots beider Fraktionierungen zu sehen. In der nachfolgenden Tabelle 35 sind die Anteilswerte gelistet (Tab. 35).

Das N-terminale P-Allel weist keinen messbaren Ca^{2+} -abhängigen Unterschied in seiner Löslichkeit bzw. Membranassoziation in beiden Fraktionierungen auf. Das L-Allel hingegen scheint übereinstimmend in beiden Fraktionierungen in Ca^{2+} -haltigem Puffer etwas besser löslich zu sein, als unter Ca^{2+} -freien Bedingungen (Abb. 11 und Tab. 35).

Dem Ergebnis der ersten Fraktionierung zufolge scheint das L-Allel im Vergleich zum P-Allel stärker löslich zu sein. Dieser Eindruck wird aber von den Ergebnissen der zweiten Fraktionierung revidiert, in welcher das P-Allel etwas besser löslich ist. Allerdings variieren die Ergebnisse der beiden Fraktionierungen sehr stark: in der ersten Fraktionierung waren die Fusionsproteine insgesamt weniger löslich als in der zweiten Fraktionierung. Dadurch können die Ergebnisse der Fraktionierungen nicht direkt miteinander verglichen werden und sollten in Wiederholungsexperimenten überprüft werden.

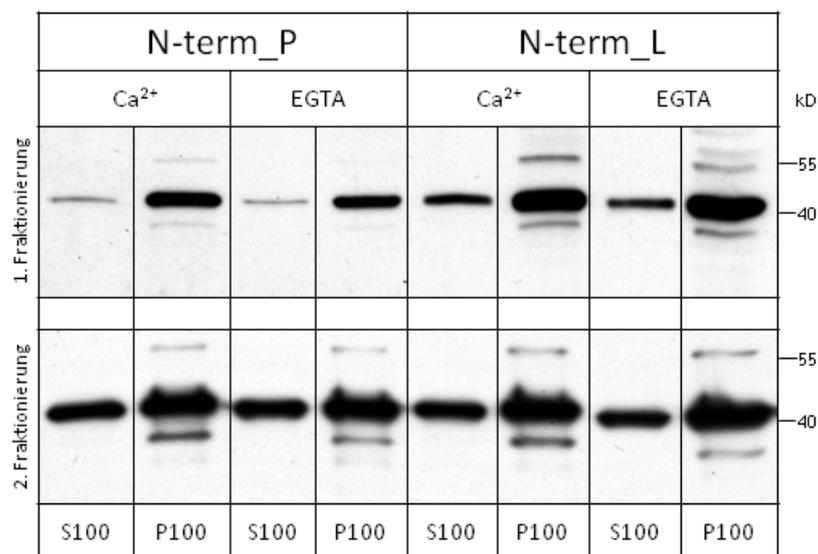


Abb. 11: Ergebnisse von zwei Membranfraktionierungen von GFP-AKAP79-N-term_Prolin (N-term_P) oder GFP-AKAP79-N-term_Leucin (N-term_L) exprimierenden HEK293-Zellextrakten.

Die Fraktionierungen wurden entweder unter Ca^{2+} - oder EGTA- (Ca^{2+} -freien) Bedingungen durchgeführt.

S100 – Überstand nach 100.000 x g Ultrazentrifugation; P100 – Pellet nach 100.000 x g Ultrazentrifugation. Blots sind gegen GFP gefärbt.

Allel		Fraktion	Anteil [%]	
			1. Fraktionierung	2. Fraktionierung
N-term_P	Ca ²⁺	S100	5,8	39,2
		P100	94,2	60,8
	EGTA	S100	4,3	40,2
		P100	95,7	59,8
N-term_L	Ca ²⁺	S100	17,6	37,0
		P100	82,4	63,0
	EGTA	S100	12,5	31,1
		P100	87,1	68,9

Tab. 35: Prozentuale Anteile der Fusionsproteine N-term_P oder N-term_L in der löslichen (S100) und unlöslichen (P100) Fraktion nach der Membranfraktionierung.

Lipide flotieren im Saccharose-Gradienten entsprechend ihrer Dichte. Um die Membranassoziation der AKAP79-Allele noch genauer zu untersuchen, wurde das Material der Membranfraktion P100 für ein Flotation Assay weiterverwendet. Es wurde in einem 55% Saccharose-HEPES-Puffer resuspendiert, unter einen 52,5 – 25% Saccharose-Gradienten geschichtet und nach 16-stündiger Ultrazentrifugation bei 100.000 x g in 13 oder 14 Fraktionen aufsteigender Dichte aufgeteilt und die Verteilung der Fusionsproteine in den Fraktionen analysiert.

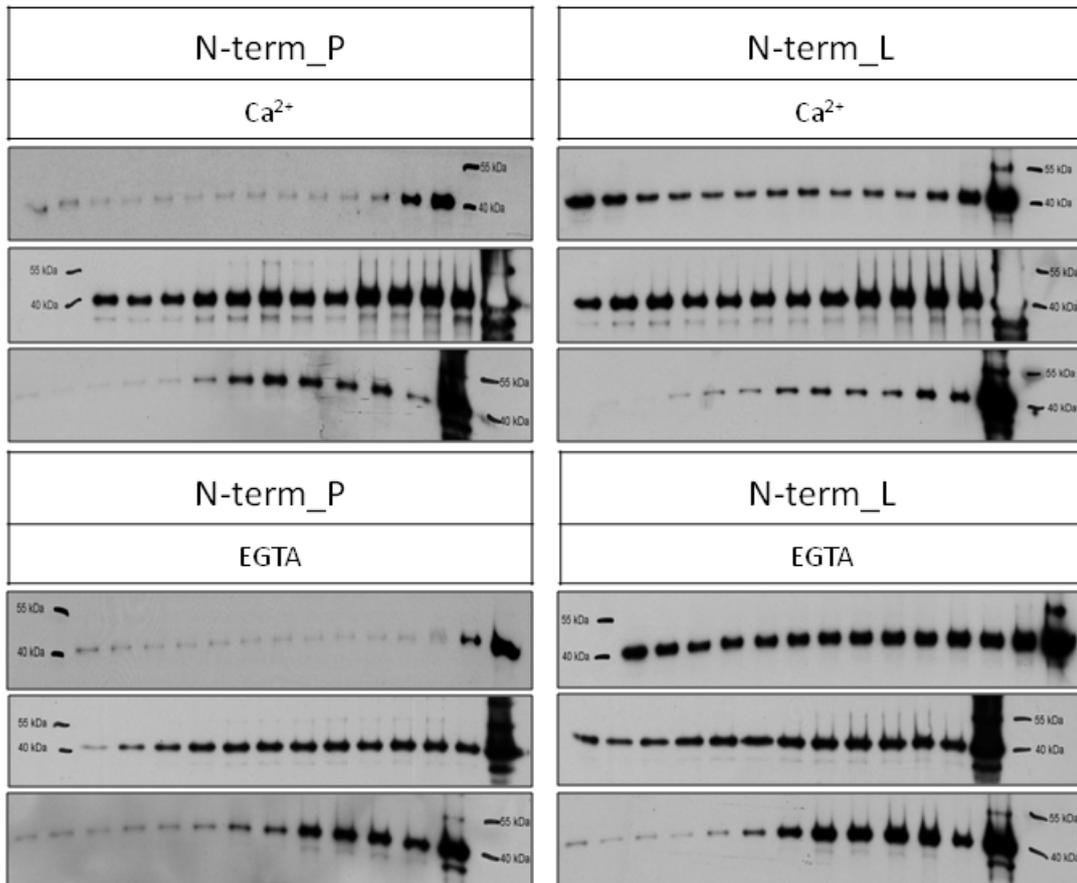
Das Experiment wurde drei Mal unter zwei verschiedenen Ca²⁺-Bedingungen (2 mM Ca²⁺ oder 2 mM EGTA) wiederholt (Abb. 12).

Die Ergebnisse sind sehr divergent und unterscheiden sich stark zwischen den einzelnen Experimenten (Abb. 12A). Das von Experiment zu Experiment abweichende Expressionsniveau der Fusionskonstrukte und damit der Menge des zur Verfügung stehenden Materials, aber auch die Aggregation der Fusionsproteine wie sie in Cos7-Zellen beobachtet wurde, könnten dabei eine Rolle spielen.

Die optische Dichte der Banden wurde als *Adjusted Volume* (siehe Kapitel 2.2.5.3.) gemessen. Die Messwerte aller Banden eines Allels unter einer bestimmten Ca²⁺-Bedingung in einem bestimmten Experiment wurden zu 100% zusammengerechnet und der Anteil des Allels je Fraktion prozentual zur Summe aller Fraktionen berechnet und graphisch dargestellt (Abb. 13). Durch diese Berechnung wird die Verteilung der beiden Allele in den einzelnen Fraktionen innerhalb eines Experiments vergleichbar.

So wird ersichtlich, dass trotz der sich von Experiment zu Experiment unterscheidenden Expressionsmengen der Fusionsproteine die Verteilung der beiden AKAP79-Allele unter verschiedenen Ca²⁺-Konzentrationen sehr ähnlich ist (Abb. 13).

A



B

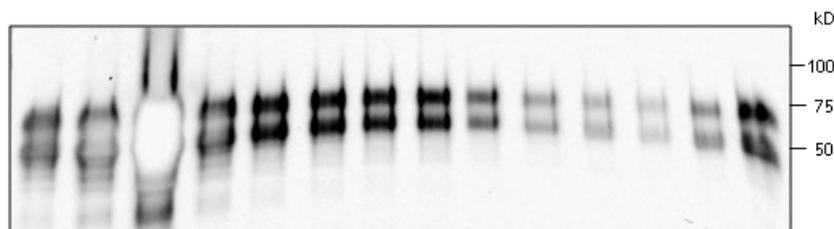


Abb. 12: Vergleich der Flotation der N-terminalen AKAP79-Fusionsproteine AKAP79-N-term_Prolin (N-term_P) oder -Leucin (N-term_L) oder des Membranproteins gp65.

- A) Nach der Membranfraktionierung wurde ein Flotation Assay mit im Membranpellet verbliebenem N-term_P oder N-term_L unter Zusatz von Ca^{2+} oder EGTA durchgeführt. Die Blots sind gegen GFP gefärbt.
- B) Zur Kontrolle erfolgte ein Flotation Assay mit dem Membranpellet eines Rattenhirn-Extrakts. Es wurde auf das Membranprotein gp65 (Glycoprotein 65) getestet. N.B. gp65 ist stark angereichert in der 3. Fraktion. Aufgrund dessen ist das Peroxidase-Substrat Luminol in der Bande entsprechend aufgebraucht.

Im zweiten Flotation Assay ist zu beachten, dass die letzte, unlösliche 13. Fraktion der Ca^{2+} -Bedingung stark angefärbt, in der ersten Belichtung der Blots überbelichtet und in der zweiten Belichtung das Substrat Luminol verbraucht war. Das hat in der zweiten und zur Quantifizierung genutzten Belichtung zu einem Ausbleichen der Banden geführt, was sich im Messwert der 13. Fraktion widerspiegelt. Ebenso fehlerbehaftet weil überbelichtet sind die Banden und damit einhergehend die Messwerte der 13. Fraktion im selben Experiment unter EGTA-Bedingungen, sowie im dritten Flotation Assay Experiment unter Ca^{2+} -Bedingungen. Insgesamt wurden die Belichtungszeiten so gewählt, dass die bestmögliche Färbung und Sichtbarkeit aller Fraktionen

gewährleistet war, wobei zwischen Sichtbarkeit der schwachen Banden und Überbelichtung der starken Banden abgewogen werden musste. Für Wiederholungsexperimente sollte eine alternative Blotquantifizierung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gewählt werden, deren Fluoreszenzstärke über einen größeren Bereich proportional und linear zur aufgetragenen Proteinmenge ist (Zellner *et al.* 2008).

Unabhängig von der Ca^{2+} -Konzentration und dem Polymorphismus zeigen alle Experimente übereinstimmend eine Anreicherung des Fusionsproteins in der letzten Fraktion höchster Dichte, in der unlöslichen Fraktion, die nur gering oder gar nicht mit Lipiden assoziiert ist. AKAP79-N-term flotiert nur wenig, im Gegensatz zum Membranprotein gp65 (Glycoprotein 65), welches vor allem in der dritten Fraktion angereichert ist und als Positivkontrolle dient (Abb. 12B und 13D).

Da die Verteilung der Fusionsproteine in den verschiedenen Fraktionen zwischen den Experimenten stark variiert, wurde von einer statistischen Auswertung abgesehen. Rein optisch und unter Hinzuziehen der anteiligen Werte ist innerhalb jedes einzelnen Experiments kein relevanter Unterschied zwischen der Flotation des P- und des L-Allels feststellbar.

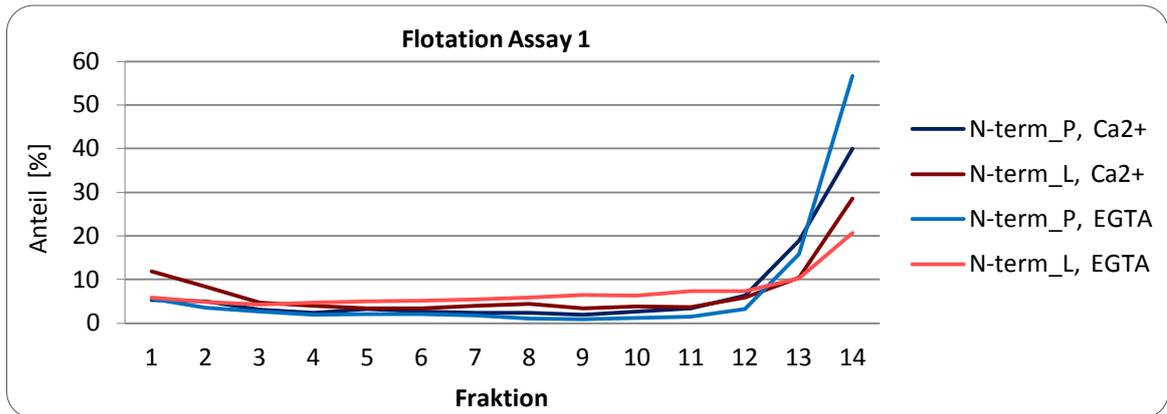
Abschließend wurden die Werte aller drei Experimente in einer Graphik zusammengefasst, um festzustellen, ob sich im Gesamtergebnis ein sichtbarer Unterschied der Verteilung beider Allele ergibt, was jedoch nicht der Fall ist (Abb. 13D). Zum Vergleich wurden die Anteile je Fraktion des Membranproteins gp65 aus Hirnmembranextrakt ebenfalls in diese Graphik aufgenommen (grüne Kurve, Abb. 13D).

Abb. 13: Graphische Darstellung der prozentualen Anteile des GFP-AKAP79-N-term_Prolin (N-term_P) und des GFP-AKAP79-N-term_Leucin (N-term_L) -Allels in den Fraktionen eines Flotation Assays.

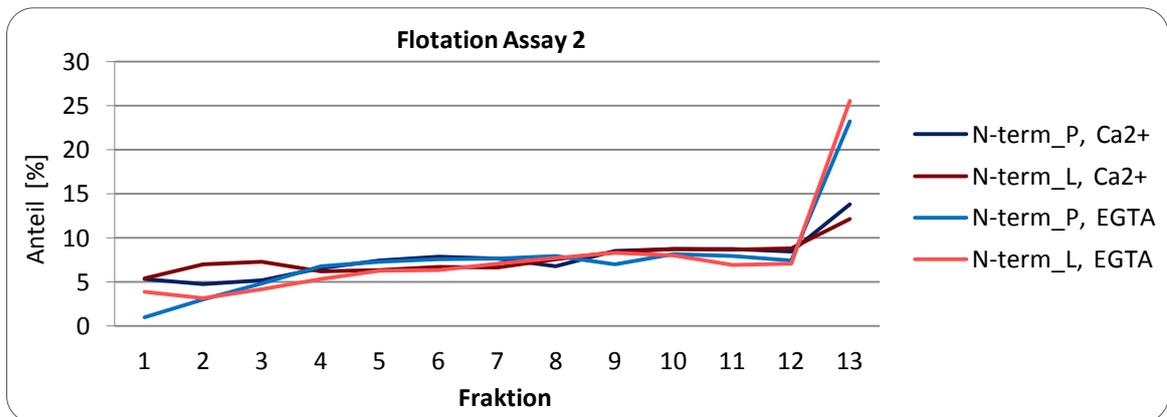
A – C: Graphische Darstellung von drei unabhängigen Experimenten.

D – Zusammenfassung der Daten aus drei unabhängigen Flotation Assays und Vergleich mit der Flotation des Membranproteins gp65 (Glycoprotein 65).

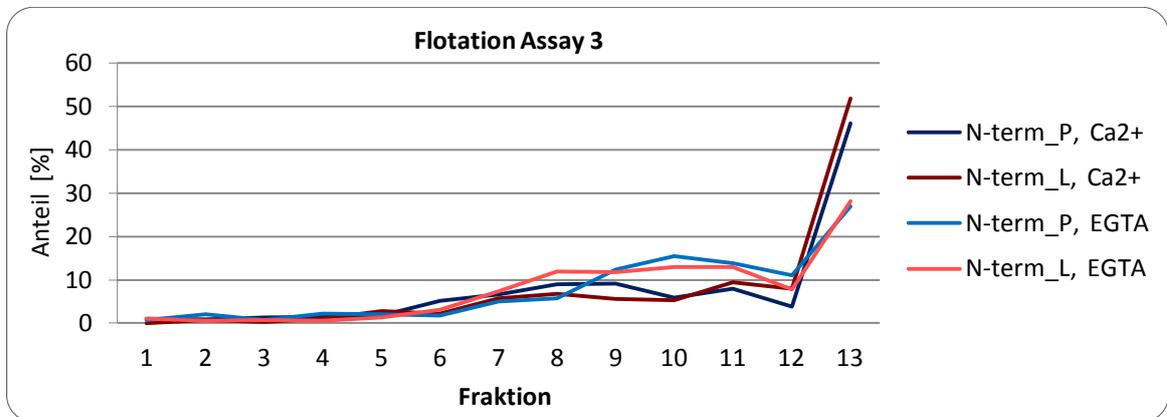
A



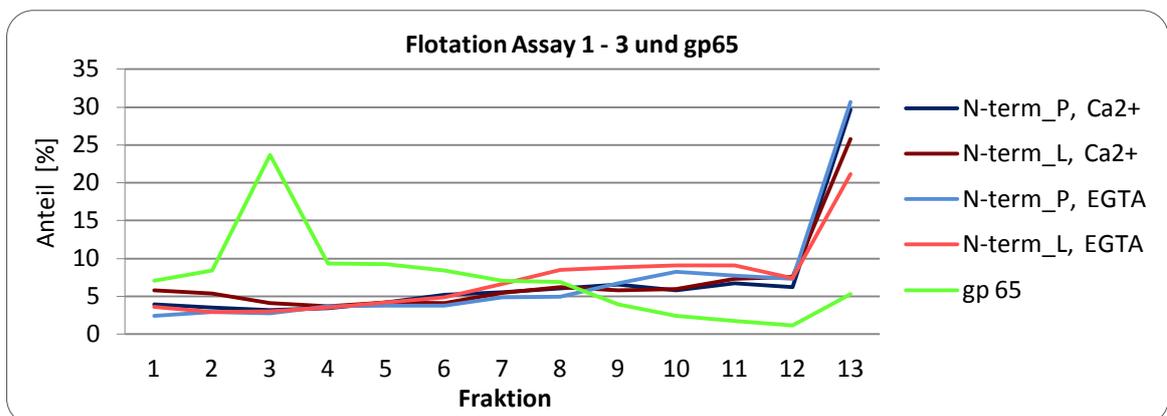
B



C



D



3.2.3. AKAP79–Expression in primären Neuronen und Co–Lokalisation mit dem postsynaptischen Markerprotein Homer

Um die postsynaptische Lokalisation der AKAP79–Allele zu testen, wurden mit AKAP79–GFP transfizierte Neurone mit einem Antikörper gegen das postsynaptische Protein Homer gefärbt (Abb. 14). Generell entspricht das AKAP79–GFP Lokalisationsmuster der von Robertson und Kollegen gezeigten Lokalisation (Robertson et al. 2009) und ähnelt der Lokalisation des endogenen AKAP150 (siehe zum Vergleich Abb. 39). AKAP79/150 ist in allen neuronalen Kompartimenten zu finden, wobei eine Akkumulation in Dendriten und Synapsen beobachtet werden kann (Abb. 14 und 39).

Zehn (AKAP79_P) bzw. acht (AKAP79_L) Fluoreszenz–Aufnahmen erfolgreich transfizierter Neurone wurden ausgewählt, um die Co–Lokalisation beider Proteine mit dem Programm OpenView (siehe Kapitel 2.2.5.1.) zu messen. Die Homer–Färbung wurde dieser Messung zugrunde gelegt (Referenzkanal) und die AKAP79–GFP–Fluoreszenz darauf bezogen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen dieser Messungen sind in Abbildung 15 graphisch dargestellt. Tatsächlich wurde ein signifikanter Unterschied der Co–Lokalisation beider AKAP79–Allele mit dem postsynaptischen Markerprotein gefunden. Das Ergebnis des ungepaarten, zweiseitigen T–Tests ist ebenfalls in Tabelle 36 tabellarisch dargestellt. Der ermittelte P–Wert beträgt 0,048 und liegt somit leicht unter der Signifikanzgrenze des 95% Konfidenz–Intervalls ($P < 0,05$). Das AKAP79_L–Allel scheint demnach signifikant stärker an Homer–positiven Postsynapsen zu lokalisieren als das AKAP79_P–Allel. Zur Untermauerung dieses Befundes sollten noch weitere Neuronen–Transfektion mit beiden AKAP–Allelen und Co–Färbung mit Homer und einem weiteren postsynaptischen Marker, z.B. PSD–95, durchgeführt und die Messungen wiederholt werden.

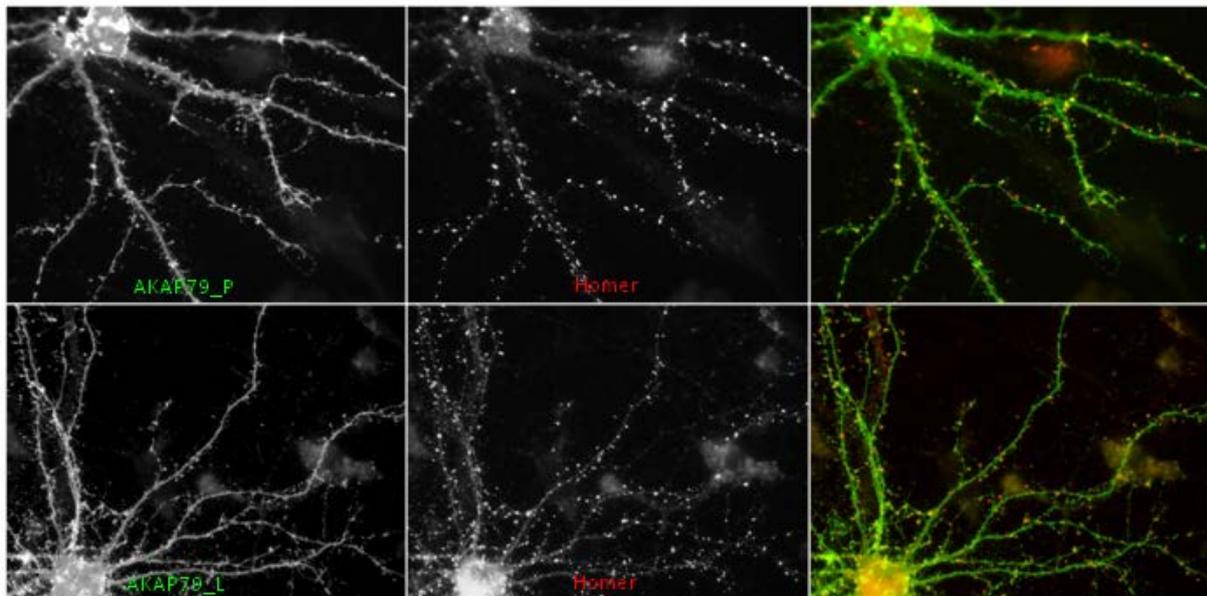


Abb. 14: Transfektion primärer Cortex–Neurone mit AKAP79_Prolin–GFP (AKAP79_P) oder AKAP79_Leucin–GFP (AKAP79_L) und Co–Färbung gegen endogenes Homer zur Abschätzung und Messung der Co–Lokalisation. Im Overlay–Bild ist AKAP79 in grün und Homer in rot dargestellt.

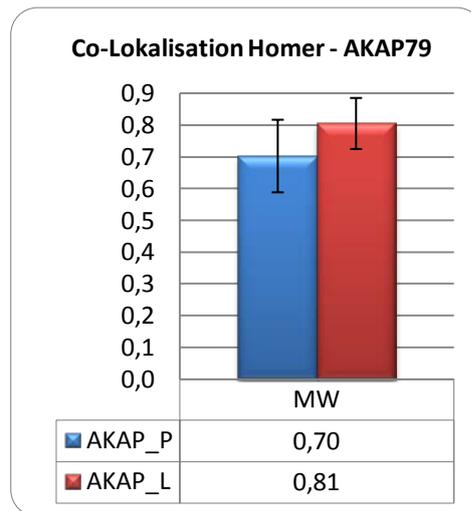


Abb. 15: Graphische Darstellung der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichung (STABW) der mit OpenView ermittelten Überlappung der Homer-Färbung mit der AKAP79-GFP-Fluoreszenz.

AKAP_P – AKAP79_Prolin; AKAP_L – AKAP79_Leucin

Co-Lokalisation von Homer und AKAP79_P oder _L	
Statistische Auswertung mittels ungepaartem, zweiseitigem T-Test	
P – Wert	0,0480*
T – Wert	2,141
f	16
MW ± STABW von AKAP_P	0,7033 ± 0,1143; n=10
MW ± STABW von AKAP_L	0,8058 ± 0,0804; n=8
Differenz zwischen den MW	–0,1025 ± 0,04786
95% Konfidenzintervall	–0,2039 bis –0,001014

Tab. 36: Statistische Auswertung der Co-Lokalisation von Homer und beiden AKAP79-Allelen mittels ungepaartem, zweiseitigem T-Test.

f – Freiheitsgrad; MW – Mittelwert; STABW – Standardabweichung; AKAP_P – AKAP79_Prolin; AKAP_L – AKAP79_Leucin

3.3. AKAP79/150 und seine Bindungspartner

Nachdem die Untersuchung der Membranassoziation der AKAP79-Allele keinen sichtbaren Unterschied zwischen den Allelen ergab, der Aminosäureaustausch jedoch einen Einfluss auf die postsynaptische Co-Lokalisation mit Homer zu haben scheint, wurde nach einem Einfluss des Polymorphismus auf die Bindung von AKAP79 an Interaktionspartner gesucht, die im Bereich der vom SNP betroffenen AKAP79-Aminosäuresequenz binden.

3.3.1. AKAP79/150 und CaM

Eines der im N-terminalen Bereich von AKAP79/150 bindenden Proteine ist CaM (Faux & Scott 1997, Gomez et al. 2002).

Die CaM–Target–Database (<http://calcium.uhnres.utoronto.ca/ctdb/ctdb/sequence.html>) ist eine Datenbank mit einem Algorithmus, welcher Aminosäuresequenzen analysiert und aufgrund bestimmter Sequenz–Eigenschaften wie der Ladung der Aminosäurereste, der wahrscheinlichen Sekundärstruktur, dem Gehalt an hydrophoben Aminosäuren und dem Vorhandensein spezieller Aminosäuren CaM–Bindungssequenzen vorhersagt. Die Eingabe der Aminosäuresequenz von AKAP79 führte zu dem Ergebnis, dass der N–terminale Teil zwei CaM–Bindungsstellen enthält (Abb. 16). Die erste mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit ermittelte Sequenz entspricht dem die Aminosäuren 31 – 52 umfassenden PKC–bindenden AKAP79–Peptid (AKAP79_{31–52}) wie sie von Faux et al. gefunden wurde (Faux & Scott 1997), ist allerdings um drei N–terminale Aminosäurereste verlängert (Abb. 16B, AS 28 – 52). Die zweite, mit geringerer Wahrscheinlichkeit vorhergesagte Sequenz beginnt 25 Aminosäurereste C–terminal von der ersten Sequenz (Abb. 16C, AS 77 – 96). Von besonderem Interesse für die vorliegende Arbeit war die zweite vorhergesagte CaM–Bindungssequenz, da der AKAP79–Pro100Leu–Polymorphismus nur vier Aminosäurereste von der vorhergesagten Bindungssequenz entfernt liegt (Abb. 16B, grün markiertes Prolin) und der Aminosäureaustausch zu Leucin eine Verlängerung des vorausgesagten α –helikalen Abschnitts, in dem auch CaM binden soll, zur Folge haben könnte. Deshalb wäre es denkbar, dass dieser Austausch einen Einfluss auf die CaM–Bindung haben könnte.

A AKAP79

...1	METTISEIHV	ENKDEKRSAE	GSPGAER <u>QKE</u>	<u>KASMLCFKRR</u>	<u>KKAALKPK</u>
....	000000000	000000000	0000000135	7799999999	9999999753
...51	<u>AGSEAADVAR</u>	KCPQEAGASD	QPEPTR <u>GAWA</u>	<u>SLKRLVTRRK</u>	<u>RSESSKQQKE</u>
....	1100000000	000000000	0000001111	1111111111	1111110000
..101	LEGEMQPAIN	AEDADLSKKK	AKSRLKIPCI	KFPRGPKRSN	HSKIIEDSDC
....	000000000	000000000	000000000	000000000	000000000
..151	SIKVQEEAEI	LDIQTQTPLN	DQATKAKSTQ	DLSEGISRKD	GDEVCESNVS
....	000000000	000000000	000000000	000000000	000000000
..201	NSITSGEKVI	SVELGLDNGH	SAIQTGTLIL	EEIETIKEKQ	DVQPQQASPL
....	000000000	000000000	000000000	000000000	000000000
..251	ETSETDHOQP	VLSDVPPLPA	IPDQQIVEEA	SNSTLESAPN	GKDYESTEIV
....	000000000	000000000	000000000	000000000	000000000
..301	AEETKPKDTE	LSQESDFKEN	GITEEKSSE	ESKRMEPIAI	IITDTEISEF
....	000000000	000000000	000000000	000000000	000000000
..351	DVTKSKNVPK	QFLISAENEQ	VGVFANDNGF	EDRTSEQYET	LLIETASSLV
....	000000000	000000000	000000000	000000000	000000000
..401	KNAIQLSIEQ	LVNEMASDDN	KINLLQ		
....	000000000	000000000	0000000		

B AKAP79 A–Domäne (AS 28 – 59)

...1	<u>QKEKASMETL</u>	<u>CFKRRKKA</u>	<u>ALKPKAG</u> SEA	ADVA
....	0113468999	9999999999	9886431000	0000

C AKAP79 B–Domäne (AS 61 – 116)

...1	KCPQEAGASD	QPEPTR <u>GAWA</u>	<u>SLKRLVTRRK</u>	<u>RSESSKQQKE</u>	LEGEMETQPA
....	INAEDADL				
....	000000000	0000009999	9999999999	9999990000	000000000
....	00000000				

D AKAP79 C-Domäne (AS 61 – 116)

....1	EDADLSKKKA	KSRLKIPCIK	FPRGPKRSNH	SKIIEDSDCS
.....	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000

Abb. 16: Vorhersage der Wahrscheinlichkeit von CaM-Bindungssequenzen in A) AKAP79, B) AKAP79-A-Domäne, C) AKAP79-B-Domäne und D) AKAP79-C-Domäne, und deren Evaluierung durch die CaM-Target-Database.

Die Evaluierung der Wahrscheinlichkeit erfolgt auf einer Skala von 0 – 9, wobei 9 die höchste Wahrscheinlichkeit anzeigt. Sequenzen mit einer Bindungswahrscheinlichkeit > 0 sind rot markiert. Grün hervorgehoben ist die im AKAP79-Pro100Leu-Polymorphismus ausgetauschte Aminosäure (AS).

Da die Wahrscheinlichkeitswerte normalisiert sind auf Grundlage der gesamten in die Analyse einbezogenen Sequenz, können sich bei Analyse eines Teils der Sequenz die Wahrscheinlichkeitswerte entsprechend ändern, wie hier im Fall der AKAP79-B-Domäne demonstriert (Abb. 16C).

3.3.1.2. Experimentell ermittelte CaM-Bindungsdomänen in AKAP79

Im Folgenden wurde der N-terminale Teil von AKAP79 in drei Sub-Domänen aufgeteilt. Die Aufteilung orientierte sich an den vorhergesagten CaM-Bindungssequenzen sowie einer von Dell'Acqua 1998 eingeführten Gliederung des N-terminalen membranassoziierten Bereichs von AKAP79 (Dell'Acqua et al. 1998). Die A-Domäne enthält die erste vorhergesagte CaM-Bindungssequenz (Abb. 16B und 17A), die B-Domäne die zweite wahrscheinliche CaM-bindende Sequenz sowie den Polymorphismus (Abb. 16C und 17A), und die C-Domäne vervollständigt die Aufteilung des AKAP79-N-Terminus und soll als Negativkontrolle im anschließenden Bindungsexperiment dienen (Abb. 16D und 17A).

Alle Konstrukte wurden als GFP-Fusionsproteine in HEK293T-Zellen exprimiert und die Lysate für Pulldown-Experimente mit CaM-Sepharose verwendet. Das Ergebnis ist in Abbildung 17B dargestellt.

Die Bindung der AKAP79-B-Domäne an CaM konnte in dem Pulldown bestätigt werden (Abb. 17B). Auch der alle drei Domänen enthaltende N-terminale Teil von AKAP79 bindet an CaM, wobei beide Allele getestet wurden, jedoch kein Unterschied zwischen dem P- und dem L-Allel festgestellt werden konnte (Abb. 17B, N_P und N_L). Wie erwartet fungieren AKAP79-C und GFP als Negativkontrollen und binden nicht an CaM. Unerwarteterweise verbleibt die AKAP79-A-Domäne in der ungebundenen Fraktion und bindet nicht an CaM-Sepharose, obwohl eine starke Bindung vorhergesagt wurde (Abb. 16B und 17B). Um einen Hinweis zu erhalten, ob die N-terminale Fusion der AKAP79-A-Domäne mit dem GFP einen Einfluss auf deren CaM-Bindungsfähigkeit haben könnte, wurde die Sequenz des Fusionsproteins mit Hilfe der CaM-Target-Database überprüft, jedoch sagt das Prädiktionsprogramm keine Beeinträchtigung der CaM-Bindungswahrscheinlichkeit voraus (Daten nicht gezeigt).

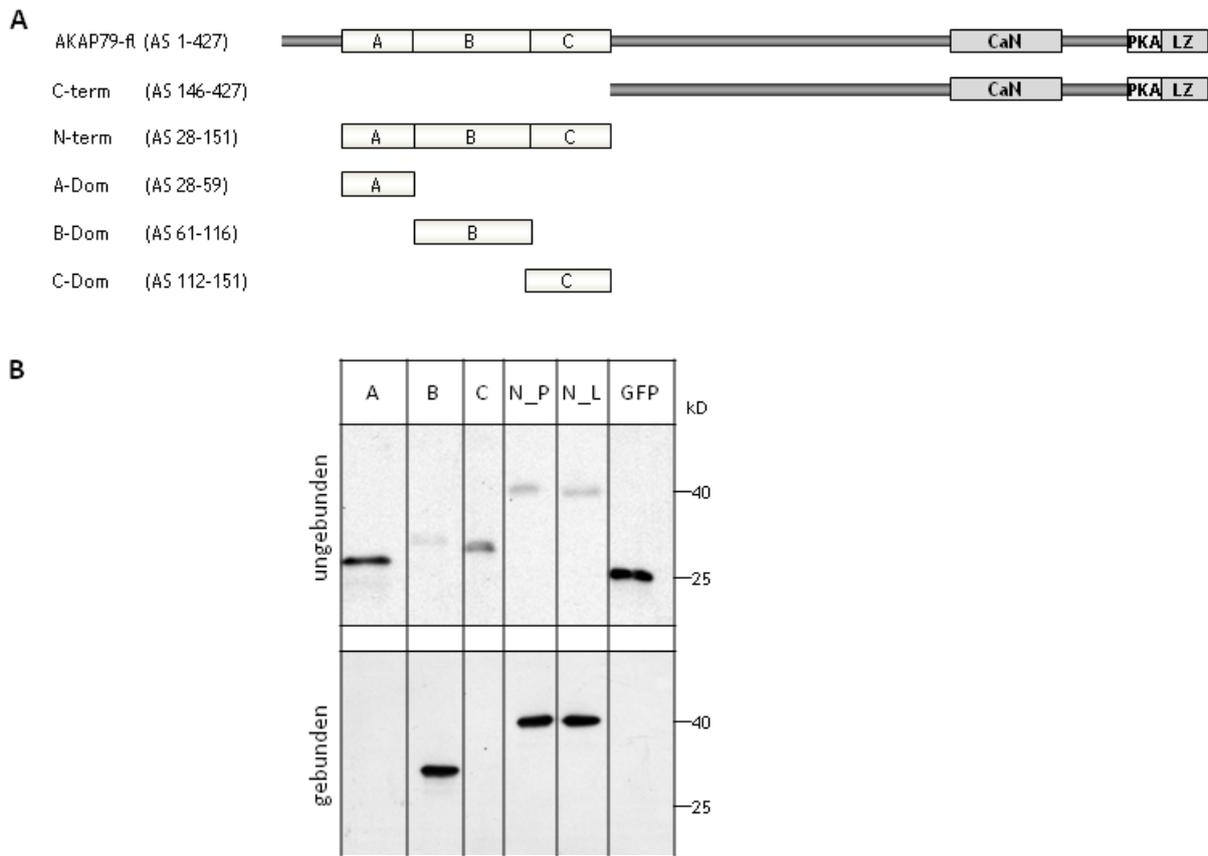


Abb. 17: Schema der Aufteilung von AKAP79 in N- und C-terminale Domänen und Pulldown-Experiment mit CaM-Sepharose und AKAP79-GFP-Fusionskonstrukten.

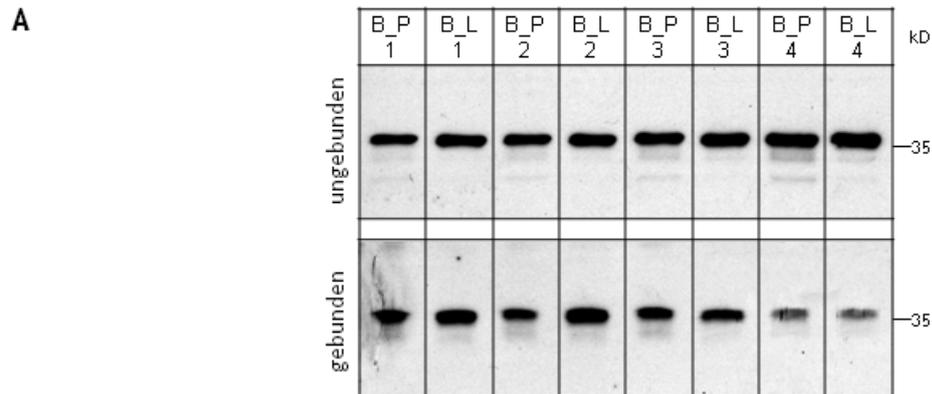
- A)** Schematische Darstellungen von AKAP79-*full-length* (AKAP79-fl), AKAP79-C-Terminus (C-term), AKAP79-N-Terminus (N-term), AKAP79-A-Domäne (A-Dom), AKAP79-B-Domäne (B-Dom) und AKAP79-C-Domäne (C-Dom). Hinter den Bezeichnungen des Proteins bzw. der Domänen sind die die Domäne umfassenden Aminosäuren (AS) angegeben. Die Bindungsstellen für CaN/PP2B, PKA und das Leuzin-Zipper-Motiv (LZ) sind proportional dargestellt.
- B)** Pulldown mit CaM-Sepharose und GFP oder AKAP79-GFP-Fusionskonstrukten: AKAP79-A-Domäne (A), AKAP79-B-Domäne (B), AKAP79-C-Domäne (C), AKAP79-N-term_Prolin (N_P) und AKAP79-N-term_Leucin (N_L). Auf dem oberen Blot sind die ungebundenen Fraktionen aufgetragen, auf dem unteren die gebundenen. Die Blots sind mit einem anti-GFP Antikörper gefärbt.

3.3.1.3. Quantitative Untersuchung der Interaktion der AKAP79-B-Domäne mit Calmodulin mittels Pulldown-Assays

Da die AKAP79-B-Domäne den betrachteten AKAP79-Polymorphismus enthält und deren Bindung an CaM gezeigt werden konnte, sollte im Folgenden der Einfluss des Polymorphismus auf die Bindung anhand von Bindungsexperimenten mit beiden Allelen der B-Domäne untersucht werden. Um einen Unterschied in der Bindungskapazität der beiden Allele feststellen zu können, erfolgte ein Pulldown-Experiment unter Ca^{2+} -Bedingungen mit CaM-Sepharose und Extrakten transfizierter HEK293-Zellen aus jeweils vier verschiedenen Zellkulturflaschen pro Allel. Der Blot dieses Experimentes ist in Abbildung 18A dargestellt. Aus den *Adjusted Volume*-Werten der Banden wurden gebundene und ungebundene Fraktionen einer Probe aufeinander bezogen und der Proteinanteil der gebundenen Fraktionen berechnet wie unter 2.2.5.3. beschrieben (Abb. 18B).

Obwohl die Expressionsraten der Fusionsproteine in den verschiedenen Zellkulturflaschen optisch vergleichbar waren, schwanken die Optischen Dichten der Banden im Blot sehr stark. Die Berechnung der Proteinanteile in den gebundenen Fraktionen beider Allele führt zu einer Normierung der Ergebnisse, so dass die Mittelwerte beider Allele ein vergleichbares Ergebnis liefern (Abb. 18B). Dennoch spiegeln die hohen Standardabweichungen (als Fehlerindikatoren in der Graphik in Abb. 18B aufgetragen) die im Blot zu beobachtenden Schwankungen wieder.

Die statistische Auswertung mittels T-Tests liefert keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Allen bezüglich der Bindung an CaM (Tab. 37).



B

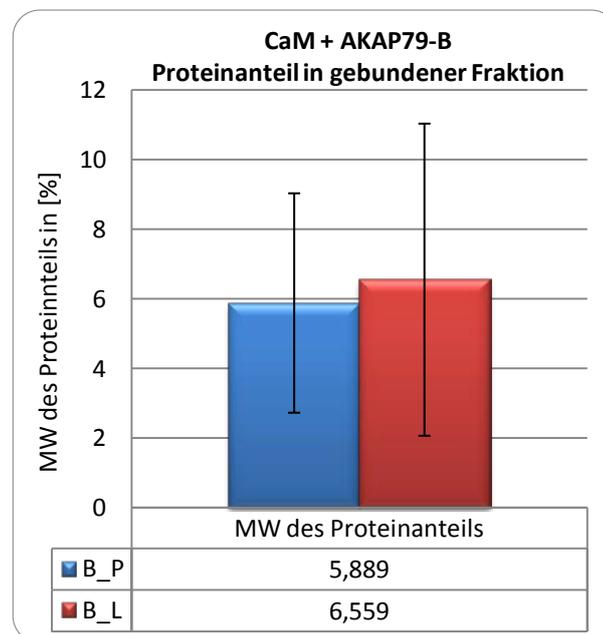


Abb. 18: Pulldown mit CaM-Sepharose und beiden Varianten der AKAP79-B-Domäne (B_P und B_L).

Zum Vergleich der Bindung des GFP-AKAP79-B_Prolin (B_P) und des GFP-AKAP79-B_Leucin (B_L) Allels wurden jeweils vier unabhängige HEK293-Zell-Extrakte, die eines der AKAP79-B-Allele exprimieren, mit CaM-Sepharose inkubiert.

A) Die gebundenen und ungebundenen Fraktionen wurden auf je ein Gel aufgetragen, wobei die Auftragung der Allele abwechselnd erfolgte. Die Blots sind gegen GFP gefärbt. Das Experiment wurde in Ca^{2+} -haltigem Puffer durchgeführt.

B) Graphische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der AKAP79-B-Proteinanteile in der gebundenen Fraktion nach Inkubation mit CaM-Sepharose.

Bindung von AKAP79-B_P oder _L an CaM-Sepharose	
Statistische Auswertung mittels ungepaartem, zweiseitigem T-Test	
P – Wert	0,8149
T – Wert	0,2584
f	6
MW ± STABW von AKAP79-B_P	5,889 ± 3,151 n=4
MW ± STABW von AKAP79-B_L	6,559 ± 4,482 n=4
Differenz zwischen den MW	-0,6700 ± 2,739
95% Konfidenzintervall	-7,373 bis 6,033

Tab. 37: Statistische Auswertung der Ergebnisse des Pulldowns mit CaM-Sepharose und beider AKAP79-B-Allele (AKAP79-B_Prolin (AKAP79-B_P) und AKAP79-B_Leucin (AKAP79-B_L)) mittels T-Test.

f – Freiheitsgrad; MW – Mittelwert; STABW – Standardabweichung

Nach einer Über-Nacht-Inkubation von CaM-Sepharose mit AKAP79-B, wie im vorherigen Pulldown, wurde kein messbarer Unterschied in der Bindungskapazität der beiden AKAP79-B-Allele an CaM gefunden. Dennoch kann man einen allelabhängigen Unterschied in der Bindungskinetik noch nicht ausschließen. Deshalb wurde nachfolgend die Zeitabhängigkeit der Bindung der beiden B-Domänen-Allele an CaM getestet. Die Inkubationszeiten wurden zwischen 10 Minuten und 5 Stunden gewählt. Der Blot in Abbildung 19A zeigt das Ergebnis repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

In der Graphik in Abbildung 19 sind die Mittelwerte der Proteinanteile der Allele in der gebundenen Fraktion zu den angegebenen Zeitpunkten dargestellt. Die gebundene Proteinmenge des GFP-AKAP79-B_P Fusionsproteins steigt langsam an und erreicht den Höchstwert nach 5h mit 35,7%. Die Standardabweichungen sind allerdings teilweise sehr hoch. Zum Beispiel beträgt die Standardabweichung des gebundenen Anteils nach 10 Minuten $\pm 10,4\%$ bei einem Mittelwert von 16,7%. Letztendlich scheint sich die gebundene Menge an GFP-AKAP79-B_P ab einem Zeitpunkt von 30 Minuten nicht mehr wesentlich zu ändern und es hat sich ein Gleichgewicht eingestellt.

Das GFP-AKAP79-B_L Fusionskonstrukt ist schon nach 10 Minuten zu einem hohen Anteil (MW = 46,3%, Abb. 19B) an CaM-Sepharose gebunden, die gemessene Proteinmenge schwankt jedoch zu den folgenden Zeitpunkten, wobei nach zwei Stunden ein Höchstwert von 75,3% erreicht wird. Die Standardabweichungen bewegen sich zwischen $\pm 5,6$ und $9,1\%$ (Abb. 19B).

Aufgrund der sehr hohen Variabilität in beiden Experimenten wurde kein weiteres Experiment durchgeführt und auf eine statistische Auswertung verzichtet. Anschließend wurde nach einem verlässlicheren Ansatz gesucht, um einen Unterschied in der CaM-Bindungskapazität und der Zeitabhängigkeit der Bindung der beiden Allele zu finden. Die Messung der Affinitäten zwischen CaM und AKAP79-B erfolgte zu einem späteren Zeitpunkt mit Hilfe der *Surface Plasmon Resonance* Methode, wie in Kapitel 3.3.1.5. beschrieben.

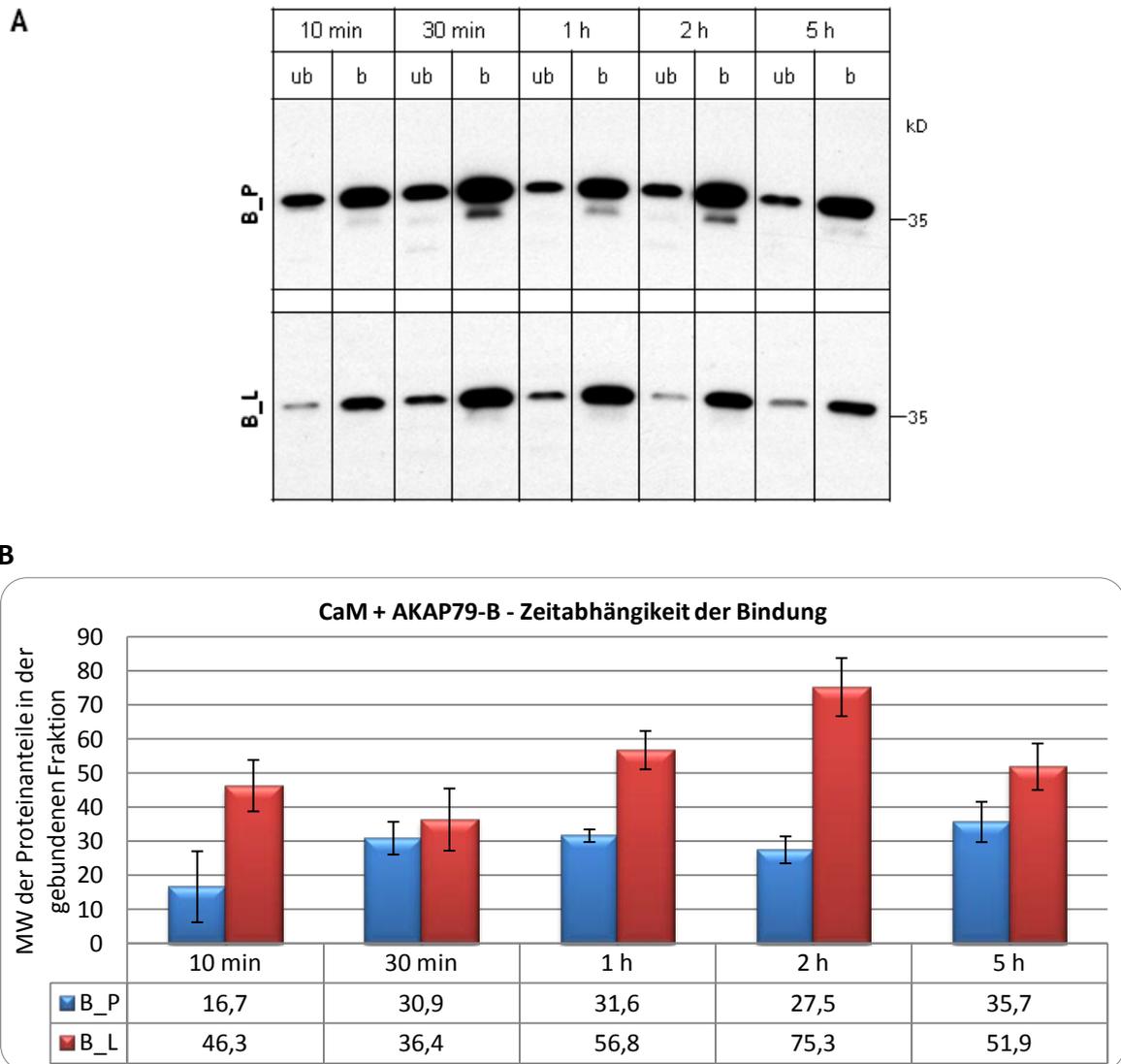


Abb. 19: Pulldown mit CaM-Sepharose GFP-AKAP79-B_Prolin (B_P) oder GFP-AKAP79-B_Leucin (B_L) und Inkubationszeiten zwischen 10 min – 5 h zur Abschätzung der Kinetik der Interaktion.

A) Anti-GFP gefärbter Blot, repräsentativ für zwei Experimente.

B) Graphische Darstellung der Mittelwerte der Proteinanteile (in %) beider Allele in der gebundenen Fraktion zum angegebenen Zeitpunkt. Die Mittelwerte wurden aus zwei unabhängigen Experimenten ermittelt. Die Standardabweichungen sind optisch als Fehlerindikatoren dargestellt.

ub – unbound, ungebundene Fraktion; b – bound, gebundene Fraktion

3.3.1.4. Calciumabhängigkeit der Interaktion zwischen Calmodulin und AKAP79-B-Varianten

Die meisten Interaktionen von CaM sind Ca^{2+} -abhängig, mit der Ausnahme zweier CaM-Bindungspartner, Neuromodulin und Neurogranin, welche in Anwesenheit von Ca^{2+} eine geringere Affinität zu CaM haben (Xia & Storm 2005, Andreasen *et al.* 1983, Prichard *et al.* 1999).

Die bisher gezeigten CaM-Sepharose-Pulldowns wurden in TBS mit Zusatz von 2 mM CaCl_2 durchgeführt. Nun sollte die Ca^{2+} -Abhängigkeit der Bindung zwischen CaM und AKAP79-B getestet werden, weswegen der Pulldown parallel in zwei verschiedenen Puffern durchgeführt wurde, einmal im ursprünglichen Ca^{2+} -haltigen TBS (Ca^{2+} -Puffer) und in TBS ohne Ca^{2+} dafür mit Zusatz von 2 mM des Chelators EGTA (EGTA-Puffer). Es zeigte sich, dass Ca^{2+} essentiell ist für die Bindung von CaM an AKAP79-B, da im EGTA-Puffer nachweislich keinerlei Bindung stattfindet (Abb. 20).

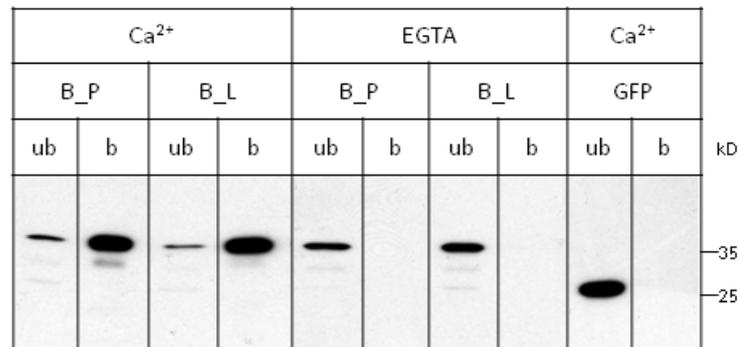


Abb. 20: Pulldown mit CaM-Sepharose und GFP-AKAP79-B_Prolin (B_P) oder _Leucin (B_L) oder GFP in Ca^{2+} - oder EGTA-Puffer.

B_P und B_L binden nur in Ca^{2+} -Anwesenheit an CaM-Sepharose. Im EGTA-Puffer ist keinerlei Bindung feststellbar. GFP bindet nicht an CaM-Sepharose.

ub – unbound, ungebundene Fraktion; b – bound, gebundene Fraktion; der Blot ist gegen GFP gefärbt.

Um das erhaltene Ergebnis zu untermauern, wurde ein weiterer Versuch zur Testung der Ca^{2+} -Abhängigkeit der CaM-AKAP-Interaktion unternommen. CaM-Sepharose und GFP-AKAP79-B wurden in Ca^{2+} -Puffer inkubiert, die ungebundene Fraktion abgenommen und EGTA-Puffer zu den Beads gegeben, um herauszufinden, ob der Entzug von Ca^{2+} nach erfolgter Etablierung der Bindung eine Auflösung der Bindung bewirkt.

Wie in Abbildung 21 gezeigt, wird der überwiegende Anteil an AKAP79-B durch den Entzug der Ca^{2+} -Ionen von CaM-Sepharose eluiert (el, Abb. 21). Nur ein sehr kleiner Teil verbleibt in der gebundenen Fraktion (+ EGTA b, Abb. 21). Zur Kontrolle wurde der Überstand des dritten und letzten Waschschritts nach Abnahme der ungebundenen Fraktion als Referenz gesammelt (w, Abb. 21). Gleiche Volumina der Waschfraktion (w) und der Elutionsfraktion (el) sind im Blot in Abbildung 21 aufgetragen. Man erkennt die Andeutung einer anti-GFP gefärbten Bande in der Waschfraktion, was darauf hindeuten könnte, dass ein minimaler Anteil an AKAP79-B auch in Anwesenheit von Ca^{2+} eluiert werden kann.

Parallel zum Elutionsexperiment wurde als Kontrolle und zum direkten Vergleich die Ca^{2+} -Abhängigkeit der Etablierung der Bindung wiederholt und in der linken Hälfte des Blots in

Abbildung 21 zeigt. Diese Ergebnisse bestätigen die Ca^{2+} -Abhängigkeit der Interaktion zwischen CaM und AKAP79-B.

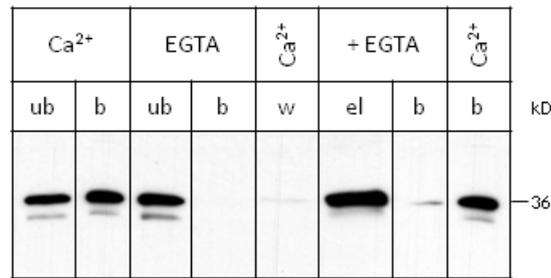


Abb. 21: Pulldown mit CaM-Sepharose und GFP-AKAP79-B_Prolin im Beisein und in Abwesenheit von Ca^{2+} und nachträgliche Zugabe von EGTA zur in Ca^{2+} -Anwesenheit etablierten Bindung.

In der linken Hälfte des Blots ist die Etablierung der Bindung von GFP-AKAP79-B an CaM-Sepharose in Ca^{2+} - oder EGTA-Puffer gezeigt. In der rechten Blothälfte ist zunächst zur Kontrolle 1/6 der letzten Waschfraktion (w) aufgetragen, die die Menge an GFP-AKAP79-B im dritten Waschgang nach Abnahme der ungebundenen Fraktion in Ca^{2+} -Puffer zeigt. Anschließend erfolgte die Zugabe von EGTA-Puffer zur gebundenen Fraktion, wodurch ein Großteil des an CaM-Sepharose gebundenen GFP-AKAP79-B eluiert wurde (el, 1/6 des Eluats). Zum direkten Vergleich der gebundenen Fraktion (b) nach und vor Zugabe des EGTA-Puffers, erfolgte am rechten Ende des Blots eine weitere Auftragung der im Beisein von Ca^{2+} gebundenen Fraktion.

ub – unbound, ungebundene Fraktion; b – bound, gebundene Fraktion; w – wash (1/6 des Gesamtvolumens); el – Eluat (1/6 des Gesamtvolumens); der Blot ist gegen GFP gefärbt.

3.3.1.5. Qualitative und quantitative Analyse der Interaktion zwischen AKAP79-B und CaM mittels *Surface Plasmon Resonance* Biosensoren

Eine etablierte Methode zur Untersuchung von Interaktionen zwischen Proteinen, Peptiden und Substanzen ist die Anwendung von *Surface Plasmon Resonance*-Biosensoren. Ein Interaktionspartner wird fest an die Dextranmatrix einer mit Gold beschichteten Sensoroberfläche eines Chips gekoppelt, der andere wird in Lösung injiziert und fließt darüber. Das Gerät schickt einen Lichtstrahl in einem bestimmten Winkel durch ein Glasprisma auf die den gekoppelten Proteinen abgewandte Oberflächenseite des Chips. Dieser Winkel ist größer oder gleich dem Winkel der Totalreflexion. Unter bestimmten Bedingungen tritt dabei ein Resonanzeffekt auf, bei dem die Energie der einstrahlenden Photonen auf die Plasmonen der Goldoberfläche übertragen wird, wobei die Lichtintensität des reflektierten Lichts anschließend geringer ist als die des einstrahlenden Lichts. Dieser Resonanzeffekt wird als *Surface Plasmon Resonance* (SPR) bezeichnet. Der Einstrahlwinkel, unter welchem SPR auftritt, wird Resonanzwinkel genannt und ist abhängig von der Masse des an die Chipoberfläche gebundenen Materials. Das Gerät variiert den Einstrahlwinkel des Lichts und detektiert, wann SPR auftritt.

Bindet nun das in Lösung befindliche injizierte Protein (Analyt) an das auf der Oberfläche des Chips gekoppelte Protein (Ligand), so ändert sich die Menge des Materials auf dem Chip und somit auch der Resonanzwinkel. Die Änderung dieses Winkels wird vom Gerät gemessen und ausgedrückt in sogenannten *Response Units* (RU). Anhand der Auftragung der gemessenen RU-Werte über die Zeit in einem Sensorgramm lassen sich Schlussfolgerungen auf die Kinetik, den Mechanismus und die Affinität der betrachteten Bindung bzw. der Bindungspartner ziehen.

In Kooperation mit einer schwedischen Arbeitsgruppe (siehe 2.2.4.) konnten Messungen an verschiedenen Biacore-Geräten (Biacore S51, T200 und X100) in Schweden durchgeführt werden.

Vorbereitend für die Messungen wurden zunächst die optimalen Bedingungen für die Immobilisierung des Liganden an die Oberfläche eines Chips gefunden. Dabei sind Aspekte wie der pH-Wert, die Konzentration des Proteins, die Flussrate und die Dauer der Injektion des Proteins über die aktivierte Chip-Oberfläche sowie die Oberflächeneigenschaften des benutzten Chips kritisch und müssen optimiert werden.

Es standen zwei AKAP79-B-Domänen-Konstrukte zur Verfügung: GST-AKAP79-B und 6xHis-SUMO-AKAP79-B. In Tabelle 38 sind die optimalen ermittelten Immobilisierungsbedingungen beider Konstrukte sowie die dabei erzielten Immobilisierungs-Niveaus zusammengefasst. Abbildung 22 zeigt ein typisches Sensorgramm einer Immobilisierung des 6xHis-SUMO-AKAP79-B-Konstrukts auf einer CM5-Chipoberfläche.

Konstrukt	Zeit	pH	Konz.	Flussrate	input [μg]	RU immob.
SUMO-B	5 min	5,5	0,1 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$	5 $\mu\text{l} / \text{min}$	2,5	~ 6000
GST-B	5 min	5	0,1 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$	5 $\mu\text{l} / \text{min}$	2,5	~ 4000

Tab. 38: Auflistung der optimalen Immobilisierungsbedingungen der Fusionsproteine 6xHis-SUMO-AKAP79-B (SUMO-B) und GST-AKAP79-B (GST-B).

Aufgrund der etwas höheren Immobilisierungsmenge des 6xHis-SUMO-AKAP79-B-Fusionsproteins (~6000 RUs im Vergleich zu ~4000 RUs bei GST-B, Tab. 38) haben wir uns für dieses in den folgenden Messungen entschieden.

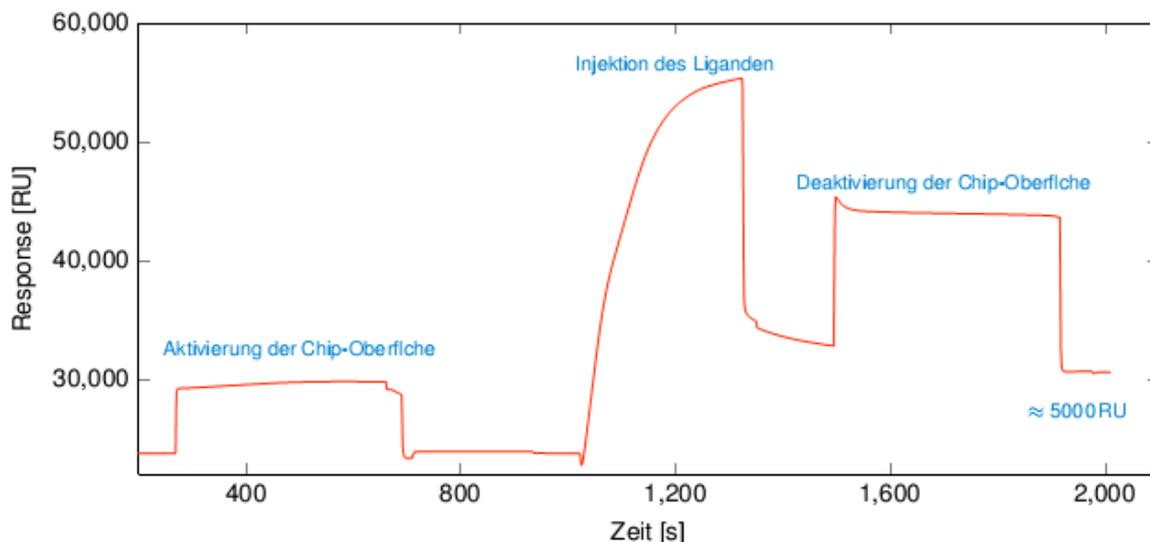


Abb. 22: Repräsentatives Sensorgramm einer 6xHis-SUMO-AKAP79-B Immobilisierung auf einem CM5-Chip, in welchem die *Response Units* (RU, y-Achse) gegen die Zeit (x-Achse, [s]) aufgetragen sind.

Die effektiv immobilisierte Ligandenmenge beträgt in diesem repräsentativen Beispiel 5000 RU und ist optisch ersichtlich an der Differenz zwischen der gemessenen Basislinie vor der Aktivierung der Chip-Oberfläche und nach Beendigung der Deaktivierung der Chip-Oberfläche. Die verschiedenen Abschnitte des Prozesses sind zur Orientierung blau beschriftet.

Zur Messung der Bindung von CaM an AKAP79-B wurden CaM-Konzentrationsreihen in aufsteigender Reihenfolge über den mit 6xHis-SUMO-AKAP79-B immobilisierten CM5-Chip gegeben. Von den dabei erhaltenen Messwerten wurden die Werte zweier Kontrollen abgezogen: erstens Messwerte von einem leeren Chip, über den parallel dieselben CaM-Lösungen injiziert wurden (Referenz), zweitens Messwerte, die durch reine Pufferinjektionen ohne Analyt (in diesem Fall ohne CaM) über die 6xHis-SUMO-AKAP79-B-Chipoberfläche generiert wurden (Blank). Die nach Abzug der Kontrollen erhaltenen Sensorgramme sind in Abbildung 23 zu sehen.

Die Bindung von CaM an 6xHis-SUMO-AKAP79-B zeichnet sich durch eine sehr schnelle Assoziationsphase (steiler Kurvenanstieg), das Erreichen eines Gleichgewichts der Assoziation und Dissoziation (Plateau der RU-Kurven bei 125 und 250 nM CaM) und eine schnelle Dissoziationsphase nach Austausch der Analyt-haltigen Injektionslösung gegen Analyt-freien Puffer (Kurvenabfall) aus (Abb. 23). Außerdem ist die Interaktion konzentrationsabhängig, was auf eine spezifische Bindung schließen lässt. Sie kann mit einem einfachen 1:1-Bindungsmodell (Reaktionsschema [4]) dargestellt werden, wie in Abbildung 23 als gestrichelte Linien gezeigt.

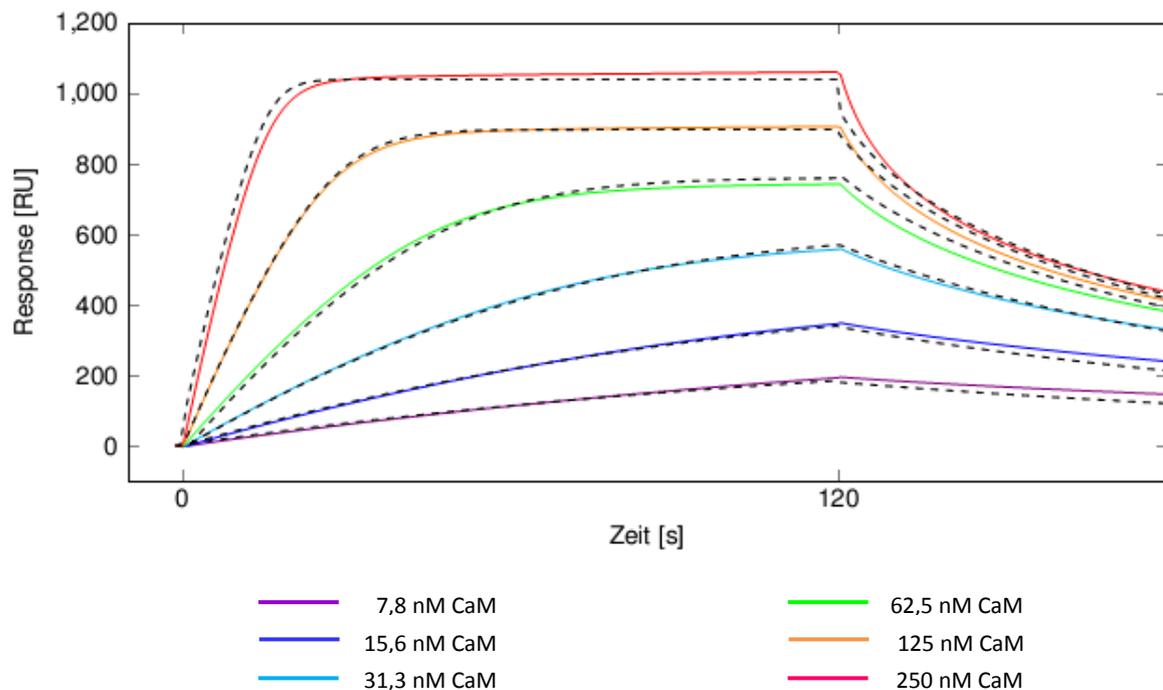


Abb. 23: Überlagerung repräsentativer Sensorgramme der Bindung unterschiedlicher Konzentrationen von CaM an einen mit 6xHis-SUMO-AKAP79-B_Prolin immobilisierten CM5-Sensorchip.

Eine Verdünnungsreihe einer 250 nM CaM-Lösung (in TBS + 2 mM CaCl_2 + 1 mM MgCl_2) bis hinunter zu einer Konzentration von 7,8 nM wurde angefertigt und diese Lösungen anschließend in aufsteigender Reihenfolge über den Sensorchip injiziert. Die farbigen Kurven repräsentieren die mit der jeweiligen CaM-Konzentration erhaltenen RU-Werte, wobei zu jeder Messung parallel eine Referenzmessung auf einem leeren CM5-Sensorchip erfolgte, dessen Messwerte von den Messwerten des mit 6xHis-SUMO-AKAP79-B beladenen Chips abgezogen wurden. Zwischen der Zugabe der einzelnen CaM-Lösungen wurden auf der Sensoroberfläche verbliebene Reste von CaM mit EGTA-haltigem Puffer (TBS + 2 mM EGTA) abgewaschen (Regeneration der Chip-Oberfläche, nicht gezeigt).

Die gestrichelten Linien stellen berechnete Anpassungen eines 1:1-Bindungsmodells an die jeweilige CaM-Konzentration dar.

Die Messwerte sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente mit 6xHis-SUMO-AKAP79-B_Prolin + CaM.

Das 1:1–Bindungsmodell wird durch folgendes Reaktionsschema repräsentiert:



	B_P		B_L	
	MW	STABW	MW	STABW
ka [$\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$]	2,37E+06	1,64E+06	2,54E+06	1,28E+06
kd [s^{-1}]	6,04E-02	3,46E-02	6,87E-02	1,51E-02
K_D [M]	3,00E-08	1,20E-08	3,18E-08	1,42E-08

Tab. 39: Auflistung der ermittelten kinetischen Parameter der Interaktion zwischen CaM und 6xHis–SUMO–AKAP79–B_Prolin (B_P) oder –B_Leucin (B_L).

ka – Assoziationskonstante, kd – Dissoziationskonstante, K_D – Affinitätskonstante, MW – Mittelwert, STABW – Standardabweichung

Die Messungen wurden je drei Mal mit beiden AKAP79–B–Allelen durchgeführt. Die Ergebnisse waren sehr gut reproduzierbar und vergleichbar zwischen beiden Allelen (Tab. 39). Bildet man für jede kinetische Konstante einen Mittelwert aus den Werten beider AKAP79–Allele, so ergibt sich eine Assoziationskonstante von $k_a = 2,5 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$, eine Dissoziationskonstante von $k_d = 6,5 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ und eine Affinitätskonstante von $K_D = 30 \text{ nM}$ ($n = 6$). Diese Werte liegen in dem Bereich der von Faux und Scott gefundenen Werte für Assoziations-, Dissoziations- und Affinitätskonstante zwischen AKAP79 und CaM (Faux & Scott 1997).

Die SPR–Messmethode bestätigte die Calciumabhängigkeit der Bindung von CaM an AKAP79–B. Erstens konnte die Chip–Oberfläche durch Injektion eines Ca^{2+} –freien Puffers komplett regeneriert werden. Zweitens wurden Messungen gemacht, in denen 500 nM CaM in Ca^{2+} –freiem, EGTA–haltigem TBS über den mit 6xHis–SUMO–AKAP79–B immobilisierten Sensorchip injiziert wurde. Im Sensorgramm in Abbildung 24 sind zum Vergleich zwei Messwertkurven dargestellt, beide wurden bei einer CaM–Konzentration von 500 nM gemessen. Die rote Kurve repräsentiert die Messwerte im Beisein von Ca^{2+} , die Werte der grünen Kurve wurden in Ca^{2+} –freiem EGTA–Puffer gemessen.

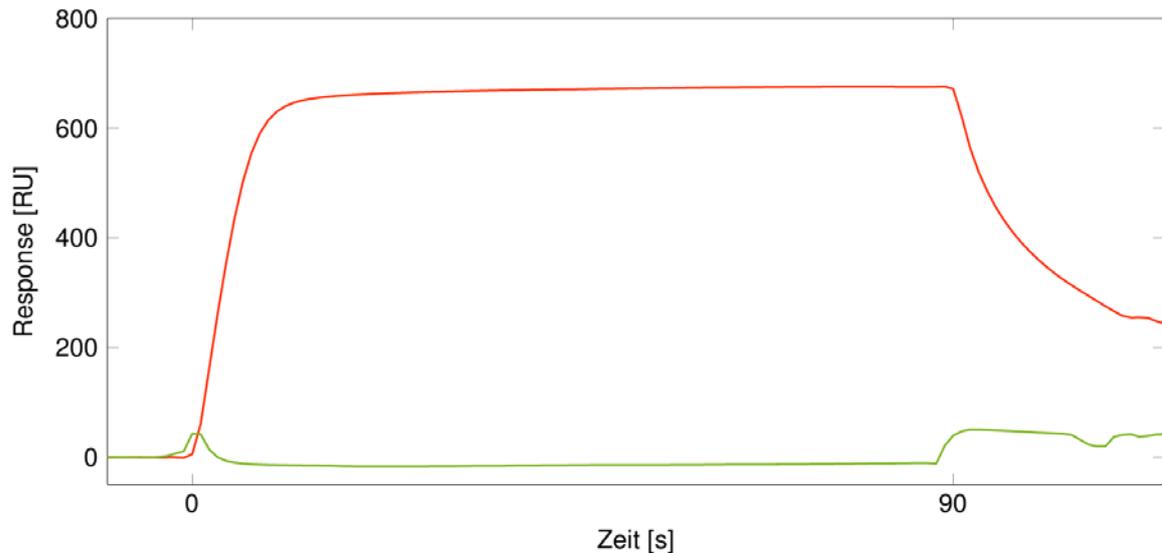


Abb. 24: Sensorgramm, welches die Calciumabhängigkeit der Bindung von CaM an 6xHis-SUMO-AKAP79-B zeigt. Die rote Kurve repräsentiert Messwerte in Ca^{2+} -haltigem, die grüne Kurve in Ca^{2+} -freiem Puffer. CaM wurde in einer Konzentration von 500 nM injiziert.

3.3.2. AKAP79/150 und Caldendrin

Caldendrin ist ein vor allem im Gehirn exprimiertes Ca^{2+} -bindendes Protein, dessen C-terminaler, Ca^{2+} -bindender Teil dem CaM sehr ähnlich ist. Es gibt einige Ca^{2+} /CaM-regulierte Proteine, die neben CaM auch Caldendrin binden. Das sind der IP_3 -Rezeptor (Haynes et al. 2004, Kasri et al. 2004), der P/Q-Typ Ca^{2+} -Kanal $\text{Ca}_v2.1$ (Lee et al. 2002) und der L-Typ spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanal $\text{Ca}_v1.2$ (Zhou et al. 2004, Zhou *et al.* 2005). Im Folgenden sollte getestet werden, ob das CaM-bindende AKAP79/150 auch ein Interaktionspartner von Caldendrin ist.

3.3.2.1. Caldendrin bindet an AKAP79

Um herauszufinden, ob AKAP79 mit Caldendrin interagieren könnte, wurde ein Pulldown mit dem C-terminalen, CaM-ähnlichen Teil von Caldendrin als GST-Fusionsprotein (GST-CDD) oder GST als Kontrolle und Extrakten AKAP79-GFP- oder GFP-transfizierter HEK293-Zellen durchgeführt. Der Blot in Abbildung 25 zeigt, dass AKAP79-GFP tatsächlich mit GST-CDD, nicht aber mit GST präzipitiert. GFP bindet nicht an GST-CDD.

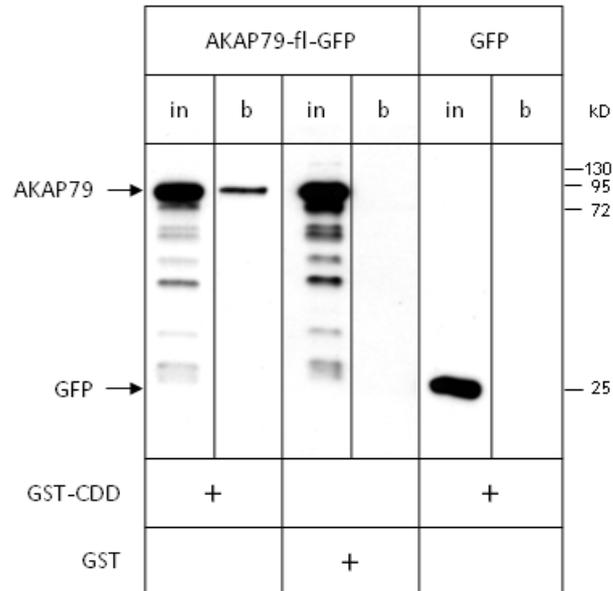


Abb. 25: GST-Pulldown mit GST-Caldendrin-C-term (GST-CDD) oder GST und AKAP79-*full-length*-GFP (AKAP79-fl-GFP / AKAP79) oder GFP.

in – input; b – bound. Das Experiment fand in Ca^{2+} -haltigem Puffer statt. Der Blot ist anti-GFP gefärbt.

Im zweiten Schritt war herauszufinden, welches Fragment von AKAP79 mit GST-CDD assoziiert ist. Im Ergebnisblot des zweiten Pulldowns in Abbildung 26 sieht man, dass nur der N-terminale, die drei polybasischen Domänen enthaltende Teil von AKAP79 mit GST-CDD interagiert, nicht aber das C-terminale AKAP79-Fragment.

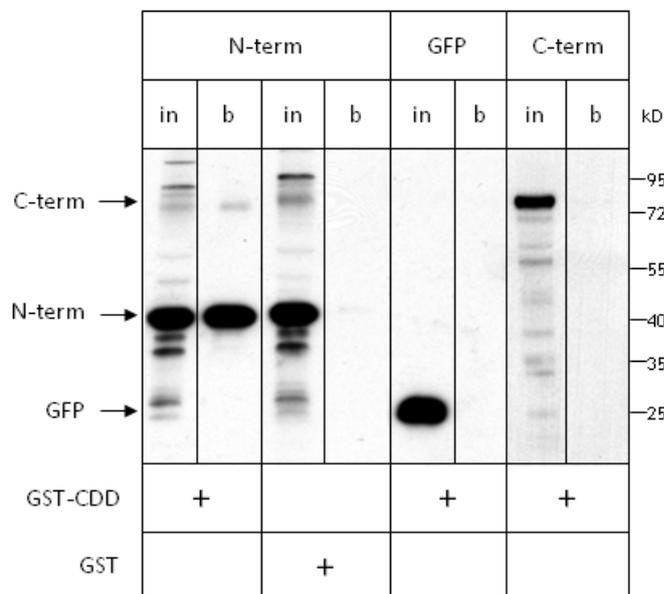


Abb. 26: GST-Pulldown mit GST-Caldendrin-C-term (GST-CDD) oder GST und dem GFP-markierten N-terminalen (N-term) oder C-terminalen (C-term) Teil von AKAP79 oder GFP als Kontrolle.

in – input; b – bound. Das Experiment fand in Ca^{2+} -haltigem Puffer statt. Der Blot ist anti-GFP gefärbt.

Im Weiteren wurden die drei basischen Domänen des N-terminalen AKAP79 Teils einzeln in einem Pulldown auf ihre Bindungsfähigkeit an GST-Caldendrin getestet. Nur die B-Domäne, für die auch eine Bindung an CaM gezeigt werden konnte, interagiert mit GST-CDD (Abb. 27).

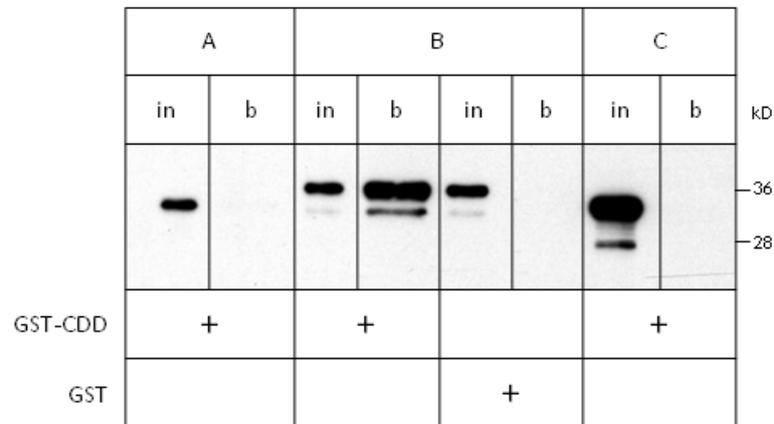


Abb. 27: GST-Pulldown mit GST-Caldendrin-C-term (GST-CDD) oder GST und den drei basischen N-terminalen AKAP79-Domänen A, B und C.

in – input; b – bound. Das Experiment fand in Ca^{2+} -haltigem Puffer statt. Der Blot ist anti-GFP gefärbt.

Um die Vermutung einer Interaktion zu untermauern und zu überprüfen, ob auch das vollständige *full-length* Caldendrin mit AKAP79-B assoziiert, wurde ein Pulldown Experiment durchgeführt, in dem die Rollen vertauscht waren: Die AKAP79-B-Domäne wurde in einen GST-Vektor kloniert und für den folgenden Pulldown als GST-Konstrukt (GST-B) aus Bakterien aufgereinigt. *Full-length* Caldendrin wurde als GFP-Konstrukt (CDD-GFP) in HEK293-Zellen exprimiert und das Extrakt mit GST-B-Sepharose inkubiert. Der Blot in Abbildung 28 bestätigt die Assoziation von Caldendrin mit AKAP79-B.

Damit gilt für Caldendrin ebenso wie für CaM: beide Proteine binden die AKAP79-B-Domäne.

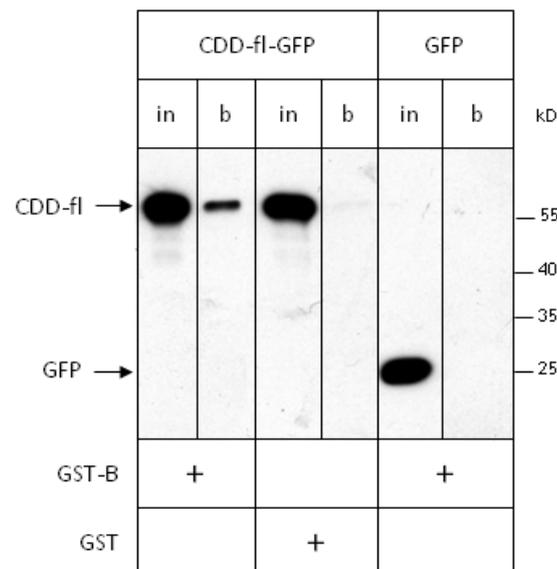


Abb. 28: GST-Pulldown mit der GST-markierten AKAP79-B-Domäne (GST-B) oder GST und GFP-markiertem *full-length* Caldendrin (CDD-fl bzw. CDD-fl-GFP) oder GFP als Kontrolle.

in – input; b – bound. Das Experiment fand in Ca^{2+} -haltigem Puffer statt. Der Blot ist anti-GFP gefärbt.

3.3.2.2. Calciumabhängigkeit der Interaktion zwischen Caldendrin und AKAP79

Alle bisher beschriebenen Pulldown-Experimente mit Caldendrin und AKAP79 oder Teilen von AKAP79 wurden in Ca^{2+} -haltigem Puffer durchgeführt. Da Caldendrin auch Ca^{2+} -unabhängig mit seinen Bindungspartnern interagieren kann, zum Beispiel mit LC3 (Seidenbecher et al. 2004), wurde im Folgenden die Ca^{2+} -Abhängigkeit der Bindung zwischen GST-CDD und GFP-B getestet. In diesem Test kamen beide GFP-B-Allele zum Einsatz, da wiederum geprüft werden sollte, ob ein sichtbarer Unterschied zwischen der Assoziation des Prolin- und des Leucin-Allels mit GST-CDD nachweisbar ist.

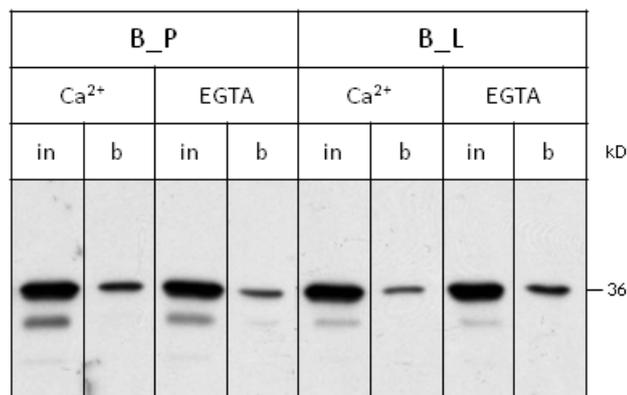


Abb. 29: Pulldown mit GST-Caldendrin-C-term und GFP-AKAP79-B_Prolin (B_P) oder _Leucin (B_L) zur Abschätzung der Ca^{2+} -Abhängigkeit der Bindung.

in – input; b – bound, gebundene Fraktion. Der Blot ist gegen GFP gefärbt.

Die Abwesenheit von Ca^{2+} scheint die Bindung der beiden AKAP79-B-Allele an GST-Caldendrin nicht zu stören – sie werden genauso gut im EGTA-Puffer wie im Ca^{2+} -Puffer gebunden (Abb. 29). Von einer Quantifizierung der Bindung wurde an dieser Stelle abgesehen, da sich dafür schon im Fall der Interaktion zwischen AKAP-B und CaM die SPR-Methode als wesentlich besser reproduzierbar erwiesen hat und im späteren auch für die Interaktion zwischen AKAP-B und Caldendrin zur Anwendung kommen sollte.

Im Folgenden wurde die Ca^{2+} -Abhängigkeit bzw. -Unabhängigkeit dieser Interaktion mit einem Elutionsexperiment verifiziert. Die linke Hälfte von Abbildung 30 zeigt zwei Pulldowns zwischen GST-Caldendrin und GFP-AKAP79-B in Anwesenheit oder Abwesenheit (EGTA) von Ca^{2+} . Zu beachten ist, dass in diesem Experiment im Vergleich zum vorhergehenden wesentlich weniger Protein eingesetzt wurde und beide Proteine etwa äquimolar zueinander vorlagen (GST-CDD: $2 \mu\text{g} = 0,044 \text{ nmol}$, GFP-AKAP79-B: $1,5 \mu\text{g} = 0,045 \text{ nmol}$). Es scheint, dass unter diesen Umständen die Interaktion der beiden Proteine eine gewisse Ca^{2+} -Sensitivität hat, denn ohne Ca^{2+} wird etwas weniger AKAP-B an GST-Caldendrin gebunden. Das Experiment wurde in dieser Form drei Mal wiederholt und das Ergebnis bestätigte sich jedes Mal.

In der rechten Hälfte der Abbildung 30 ist das Elutionsexperiment zu sehen. Zunächst ist ein Sechstel des Überstands des dritten und letzten Waschschritts nach Abnahme der im Beisein von Ca^{2+} ungebunden gebliebenen Proteine aufgetragen. Da sich kein AKAP-B in dieser Waschfraktion befindet, kann man von einer stabilen Interaktion zwischen Caldendrin und AKAP79-B ausgehen, da keine Fluktuation zu bestehen scheint, im Gegensatz zu äquivalenten

Experimenten mit CaM und AKAP-B (vgl. Abb. 21). Nach Inkubation der gewaschenen Beads in EGTA-Puffer findet sich eine minimale Menge an AKAP-B im Eluat (el), von dem ebenfalls ein Sechstel aufgetragen wurde. Dennoch bleibt der größte Teil von AKAP-B an GST-Caldendrin gebunden (+ EGTA b, Abb. 30). Zum direkten Vergleich wurde neben dieser Fraktion erneut die in Ca^{2+} -Puffer etablierte Bindung gezeigt (Ca^{2+} b, Abb. 30).

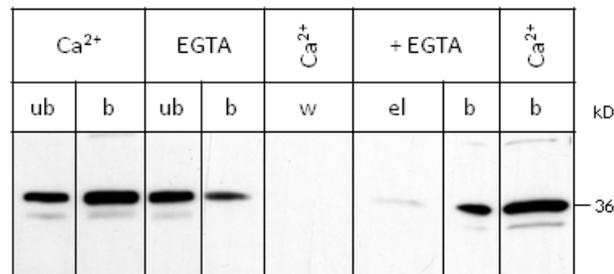


Abb. 30: Pulldown mit GST-Caldendrin-C-term (GST-CDD) und GFP-AKAP79-B zur Überprüfung der Ca^{2+} -Unabhängigkeit der Bindung.

Nach erfolgter Bindung zwischen GST-CDD und GFP-B in Ca^{2+} -Puffer wurde die ungebundene Fraktion (ub) abgenommen, die Beads drei Mal mit Ca^{2+} -Puffer gewaschen, der Überstand des letzten Waschschruttes (w) gesammelt und die Beads mit EGTA-Puffer versetzt. Die letzte Waschfraktion dient als Kontrolle zur Überprüfung der generellen Fluktuation zwischen gebundener (b) und ungebundener (ub) Fraktion im Beisein von Ca^{2+} . Ein Sechstel dieser Fraktion wurde neben einem Sechstel des Eluats (el) aufgetragen. Anschließend folgte die Auftragung der nach Inkubation mit dem EGTA-Puffer gebunden gebliebenen Fraktion (EGTA b) und als direkter Vergleich noch einmal die in Anwesenheit von Ca^{2+} gebundene Fraktion (Ca^{2+} b).

Parallel zum Elutionsexperiment erfolgte jeweils ein Pulldown in Ca^{2+} - bzw. in EGTA-Puffer. Deren Ergebnisse sind in der linken Hälfte des Blots aufgetragen.

ub – unbound, ungebundene Fraktion; b – bound, gebundene Fraktion; w – wash (1/6 des Gesamtvolumens); el – Eluat (1/6 des Gesamtvolumens); der Blot ist gegen GFP gefärbt.

Zusammenfassend lässt sich an dieser Stelle sagen, dass die Interaktion zwischen Caldendrin und AKAP79-B nicht auf das Vorhandensein von Ca^{2+} angewiesen ist, wobei dennoch eine gewisse Ca^{2+} -Sensitivität zu bestehen scheint.

3.3.2.3. AKAP79-B und Caldendrin binden direkt aneinander

Bisher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Bindung zwischen AKAP79 und Caldendrin über ein drittes Protein vermittelt wurde, welches in HEK293-Zellen exprimiert und damit im Extrakt vorhanden ist. Um sicher zu stellen, dass beide Proteine direkt miteinander interagieren, wurden Konstrukte beider Proteine im Bakterien hergestellt, die Fusionsproteine aufgereinigt und Pulldown-Experimente mit den aufgereinigten Proteinen durchgeführt.

Caldendrin- Δ 21 ist ein fast vollständiges Caldendrin-Konstrukt, dem die N-terminalen 21 Aminosäuren fehlen, da sich deren Vorhandensein als Ursache hoher Instabilität und schlechter Exprimierbarkeit des Proteins erwiesen hat. Dieses Protein wurde mit GST-AKAP79-B oder GST inkubiert. Abbildung 31 zeigt, dass Caldendrin- Δ 21 von beiden GST-AKAP79-B-Allelen präzipitiert wurde, jedoch nicht von GST.

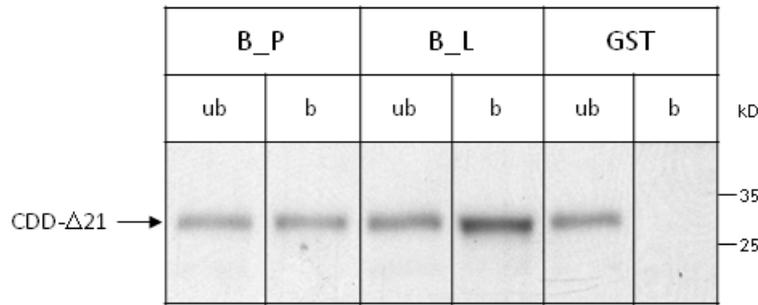


Abb. 31: Pulldown mit GST-AKAP79-B_Prolin (B_P), GST-AKAP79-B_Leucin (B_L) oder GST und Caldendrin- Δ 21 (CDD- Δ 21).

ub – unbound, ungebundene Fraktion; b – bound, gebundene Fraktion. Der Blot ist gegen Caldendrin gefärbt.

Die Bindung an das Leucin-Allel scheint etwas besser zu sein als die an AKAP79-B-Prolin. Dieser Eindruck wurde in mehreren Wiederholungen des Experiments gewonnen und deshalb wurde an dieser Stelle ein weiterer Quantifizierungsversuch unternommen. Die graphische Auswertung in Abbildung 32 fasst die Messungen der *Adjusted Volume*-Werte von insgesamt sechs Pulldown-Experimenten zusammen. Die ungebundene und gebundene Fraktion jeder Probe wurde wie unter 2.2.5.3. beschrieben normiert und der Mittelwert des Proteinanteils in der gebundenen Fraktion dargestellt (Abb. 32).

Der optische Eindruck wird von der statistischen Auswertung bestätigt: mit hoher Signifikanz ($P = 0,0007$) bindet Caldendrin- Δ 21 besser an das AKAP-Leucin-Allel als an das Prolin-Allel (Tab. 40).

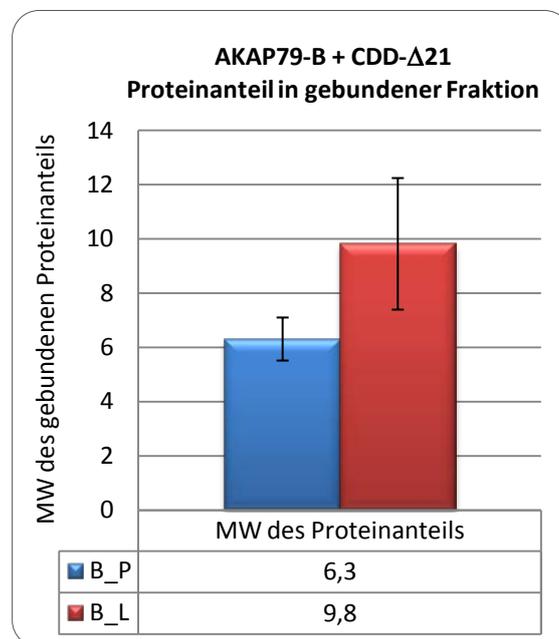


Abb. 32: Graphische Darstellung der Mittelwerte der Proteinanteile in den gebundenen Fraktionen sechs unabhängiger Pulldown-Experimente mit GST-AKAP79-B_Prolin (B_P), GST-AKAP79-B_Leucin (B_L) und Caldendrin- Δ 21.

Bindung von Caldendrin-Δ21 an AKAP79-B_P oder _L	
Statistische Auswertung mittels ungepaartem, zweiseitigem T-Test	
P-Wert	0,0007*
T-Wert	3,585
f	17
MW \pm STABW von AKAP79-B_P	1,262 \pm 0,1588 n=9
MW \pm STABW von AKAP79-B_L	1,963 \pm 0,4852 n=10
Differenz zwischen den MW	-0,7008 \pm 0,1696
95% Konfidenzintervall	-1,059 bis -0,3430

Tab. 40: Statistische Auswertung der Bindung von Caldendrin- Δ 21 an GST-AKAP79-B_Prolin (AKAP79-B_P) oder GST-AKAP79-B_Leucin (AKAP79-B_L).

Laut den Ergebnissen dieser Methode unterscheiden sich das AKAP79-B_P und AKAP79-B_L signifikant bezüglich ihrer Bindungsstärke zu Caldendrin- Δ 21.

f – Freiheitsgrad; MW – Mittelwert; STABW – Standardabweichung

Im Weiteren sollte dieses Ergebnis mit der *Surface Plasmon Resonance*-Methode an einem Biacore-Gerät untersucht werden, da diese Methode wesentlich genauere Ergebnisse mit besserer Reproduzierbarkeit liefert.

3.3.2.4. Qualitative und quantitative Analyse der Interaktion zwischen AKAP79-B und Caldendrin mittels *Surface Plasmon Resonance*

6xHis-SUMO-AKAP79-B_Prolin oder _Leucin (SUMO-B_P oder SUMO-B_L) wurde wie unter 3.3.1.5. beschrieben kovalent an einen CM5-Sensorchip gekoppelt. GST-Caldendrin-C-term (GST-CDD) wurde Schritt für Schritt in aufsteigender Konzentration injiziert und die Messwerte, ebenfalls wie unter 3.3.1.5. beschrieben, Referenz- und Blank-bereinigt. In Abbildung 33 ist das resultierende Sensorgramm gezeigt.

Die Bindung von GST-Caldendrin an AKAP79-B ist ebenfalls, wie schon im Fall von CaM, konzentrationsabhängig, was auf eine spezifische Interaktion hindeutet (Abb. 33). Die Bindung in der Assoziationsphase kann in zwei Stadien unterteilt werden – sie setzt schnell ein, scheint sich dann aber zu verlangsamen und resultiert in einem leichten aber stetigen Anstieg der gebundenen GST-Caldendrin-Menge an den Chip. In der gemessenen Zeit wird bei keiner Konzentration ein Gleichgewicht der Assoziation und Dissoziation in Form eines Plateaus erreicht. Im Gegensatz zu CaM, welches nach der Injektion schnell wieder in Lösung geht (Abb. 23), verbleibt ein großer Teil des gebundenen GST-Caldendrin am Sensorchip. Die Bindung erweist sich insgesamt als wesentlich komplexer als die einfache 1:1-Bindung von CaM an AKAP79-B.

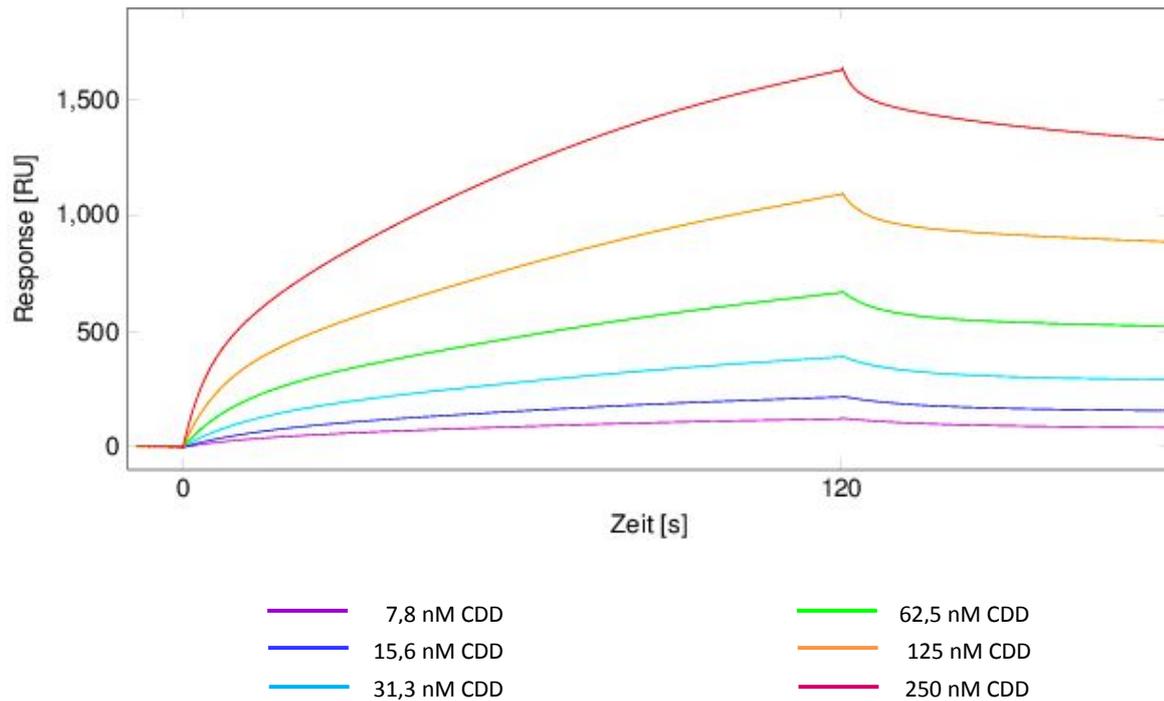


Abb. 33: Sensorgramm der Injektion aufsteigender GST-Caldendrin-C-term (CDD) -Konzentrationen über einen mit 6xHis-SUMO-AKAP79-B_Prolin gekoppelten CM5-Sensorchip.

Die farbigen Kurven repräsentieren die eingesetzten Konzentrationen entsprechend der Legende.

Um auszuschließen, dass die Komplexität der Bindung auf den GST-Anteil des Fusionsproteins zurückzuführen ist, wurde GST allein über den SUMO-B-Chip injiziert. Dabei konnte jedoch keine Bindung des GST an 6xHis-SUMO-AKAP79-B festgestellt werden (Abb. 34, graue Kurve).

Da auch nach Injektion eines Ca^{2+} -freien Puffers eine große Menge an GST-Caldendrin am Chip gebunden blieb, wurde eine spezielle Funktion des Biacore X100-Instruments genutzt, welche die unvollständige Regeneration der Chip-Oberfläche in die Berechnungen mit einbezieht (das Prinzip der Methode ist beschrieben in Karlsson et al. (Karlsson *et al.* 2006)). Diese Art der aufeinanderfolgenden Messungen nennt sich in der Biacore X100-Software *Single Cycle Kinetics* (SCK) und ermöglicht die Berechnung der Assoziations-, Dissoziations- und Affinitätskonstanten auch bei komplexeren Bindungsmechanismen. Die Messung der Bindung aufeinander folgender aufsteigender Analytkonzentrationen erfolgt hierbei ohne dazwischenliegende Regenerationsschritte und die nach der vorangegangenen Injektion gebunden gebliebene Menge des Analyten wird in der Berechnung der kinetischen Parameter berücksichtigt. Anschließend können mit Hilfe globaler, nicht-linearer Regressionsanalyse komplexe Bindungsmodelle wie das Modell der Bindung an einen heterogenen Liganden oder der Zwei-Stufen-Bindung, auch induzierte Bindung oder *induced fit* genannt, an die erhaltenen Kurven angepasst und daraus die Bindungsparameter errechnet werden. Beide Bindungsmodelle sind gleich gut an die real gemessene Kurve anpassbar. In Abbildung 34 wurde zur Veranschaulichung der Passgenauigkeit die Anpassung des Zwei-Stufen-Modells an ein repräsentatives SCK-Sensorgramm dargestellt (Abb. 34A, schwarz-gestrichelte Kurve). In Tabelle 41 sind die kinetischen Parameter dieser Anpassung aufgelistet.

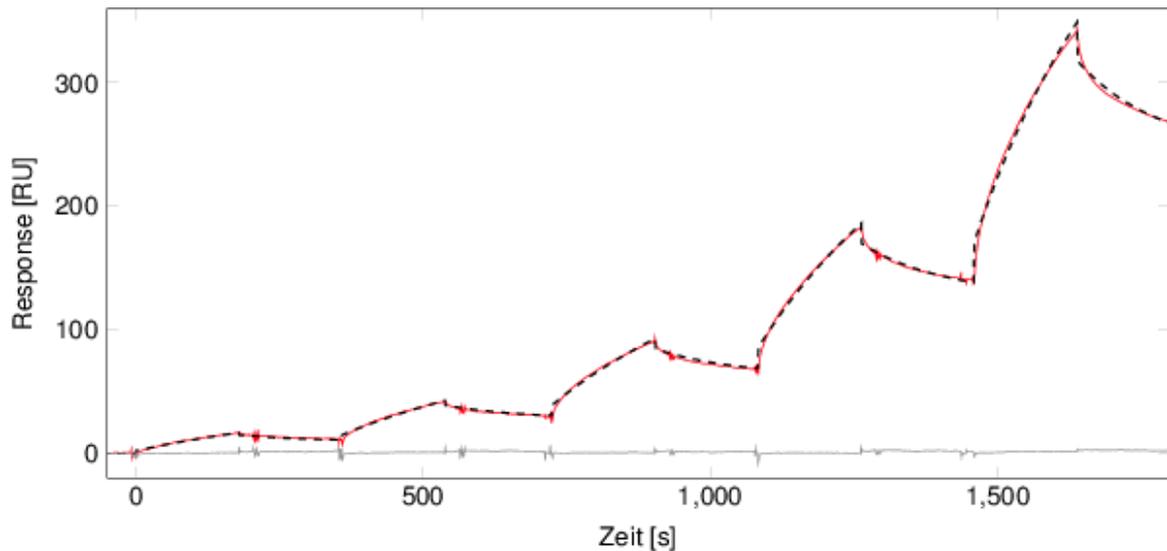


Abb. 34: Sensorgramm der Bindung von GST-Caldendrin-C-term an 6xHis-SUMO-AKAP79-B_Prolin in Ca^{2+} -haltigem Puffer und Anpassung des Zwei-Stufen-Bindungsmodells.

Caldendrin wurde stufenweise in aufsteigenden Konzentrationen von 15,5 bis 250 nM über einen mit 6xHis-SUMO-AKAP79-B immobilisierten CM5-Chip injiziert (rote Kurve). Ein Zwei-Stufen-Bindungsmodell (schwarze gestrichelte Kurve) wurde an das Sensorgramm angepasst. In grau ist die mit gleichen GST-Konzentrationen erhaltene RU-Kontrollkurve eingezeichnet.

$ka1$ [$s^{-1} M^{-1}$]	$kd1$ [s^{-1}]	$ka2$ [s^{-1}]	$kd2$ [s^{-1}]	K_D [M]	Rmax (RU)
2,44E+04	3,11E-03	2,24E-03	1,90E-04	9,96E-09	2063

Tab. 41: Auflistung der durch die Anpassung des Zwei-Stufen-Modells erhaltenen kinetischen Parameter der Bindung zwischen GST-Caldendrin-C-term und 6xHis-SUMO-AKAP79-B in Ca^{2+} -haltigem Puffer.

$ka1$ – Assoziationskonstante Reaktionsschritt 1, $kd1$ – Dissoziationskonstante Reaktionsschritt 1, $ka2$ – Assoziationskonstante Reaktionsschritt 2, $kd2$ – Dissoziationskonstante Reaktionsschritt 2, K_D – Affinitätskonstante; Rmax – theoretischer maximaler RU-Wert.

Das Reaktionsschema des Zwei-Stufen-Modells ist in Gleichung [6] angegeben.

Die Güte der Anpassung im Sinne der Passgenauigkeit bzw. Abweichung von den real gemessenen Werten wird durch den χ^2 -Wert evaluiert. Er beträgt in dem gezeigten Beispiel-Sensorgramm 3,4 RU^2 für die Anpassung des heterogenen und 4,2 RU^2 für die Anpassung des Zwei-Stufen-Modells. Im Vergleich zu den gemessenen RU-Werten von über 300 RU sind diese Abweichungen minimal und der Unterschied zwischen beiden Modellen vernachlässigbar.

SPR-Messungen mit beiden AKAP79-Allelen wurden pro Allel drei Mal wiederholt und daraus die kinetischen Parameter mit Hilfe der Anpassung des Zwei-Stufen-Modells berechnet. In Tabelle 42 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der berechneten Werte für beide Allele aufgelistet.

A

	B_P		B_L	
	MW	STABW	MW	STABW
ka1 [s⁻¹ M⁻¹]	7,89E+04	1,67E+04	5,89E+04	1,19E+04
kd1 [s⁻¹]	7,36E-02	4,23E-02	8,85E-02	2,72E-03
ka2 [s⁻¹]	2,26E-02	1,28E-02	2,79E-02	8,35E-03
kd2 [s⁻¹]	7,25E-04	1,09E-03	1,75E-03	1,34E-04
K_D [M]	2,50E-08	3,45E-08	9,70E-08	3,61E-08

B

	ka1 [s ⁻¹ M ⁻¹]	kd1 [s ⁻¹]	ka2 [s ⁻¹]	kd2 [s ⁻¹]	K _D [M]
P – Wert	0,166	0,576	0,583	0,18	0,067
signifikant	nein	nein	nein	nein	nein

Tab. 42: Auflistung der aus dem Zwei-Stufen-Bindungsmodell erhaltenen kinetischen Parameter der Interaktion zwischen GST-Caldendrin-C-term und 6xHis-SUMO-AKAP79-B_Prolin (B_P) oder _Leucin (B_L) und statistische Auswertung der Werte.

A) Auflistung der Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STABW) der aus dem Zwei-Stufen-Bindungsmodell erhaltenen kinetischen Parameter der Interaktion zwischen GST-Caldendrin-C-term und B_P oder B_L.

B) Statistische Auswertung mittels zweiseitigem T-Test. Die Affinitätskonstante K_D zeigt einen Trend, dieser ist aber nicht signifikant. In keinem der Parameter unterscheiden sich Prolin- und Leucin-Allel hinsichtlich ihrer Bindungskinetik mit Caldendrin signifikant.

ka1 – Assoziationskonstante Reaktionsschritt 1, kd1 – Dissoziationskonstante Reaktionsschritt 1, ka2 – Assoziationskonstante Reaktionsschritt 2, kd2 – Dissoziationskonstante Reaktionsschritt 2, K_D – Affinitätskonstante.

Das Reaktionsschema des Zwei-Stufen-Modells ist in Gleichung [6] angegeben.

Das Prolin-Allel hat eine mittlere Affinitätskonstante von K_D = 25 nM. Die Affinitätskonstante des Leucin-Allels liegt mit einem Wert von K_D = 97 nM etwas höher, jedoch nach wie vor in der gleichen Größenordnung (Tab. 42). Die statistische Auswertung mit Hilfe eines zweiseitigen T-Tests ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden AKAP79-Allelen in einem der kinetischen Parameter. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Affinität zwischen Caldendrin und AKAP79-B vergleichbar ist mit der zwischen CaM und AKAP79-B.

Wie in den Pulldown-Experimenten gezeigt, reagiert die Bindung zwischen AKAP79-B und Caldendrin zwar Ca²⁺-sensitiv, kann aber auch in Abwesenheit von Ca²⁺ etabliert werden. Ebenso konnte in den SPR-Messungen beobachtet werden, dass die Sensoroberfläche nicht durch einen Waschschrift mit Ca²⁺-freiem Puffer regeneriert werden konnte, im Gegensatz zur Interaktion zwischen AKAP79-B und CaM, welche vollkommen auf die Anwesenheit von Ca²⁺ angewiesen war.

Abbildung 35 zeigt das Sensorgramm eines SCK-Experiments mit Ca²⁺-freiem Puffer, welches die bisherigen Ergebnisse und Beobachtungen bestätigte. Die RU-Werte sind zwar um ein 10-faches geringer im Vergleich zur Bindung in Ca²⁺-haltigem Puffer. Dennoch scheint der Bindungsmechanismus derselbe zu sein und wiederum konnten beide Bindungsmodelle ähnlich gut angepasst werden und das Zwei-Stufen-Modell wurde zur Veranschaulichung der Anpassung gewählt (Abb. 35, gestrichelte schwarze Kurve). In Tabelle 43 sind die kinetischen Parameter der Anpassung des Zwei-Stufen-Modells aufgelistet. Der theoretische maximale RU-

Wert (R_{\max}) von 318 RU ist um ein 6,5-faches geringer als R_{\max} im Beisein von Ca^{2+} (vgl. Tab. 41 und Tab. 43).

Vergleicht man die kinetischen Parameter der Interaktion mit und ohne Ca^{2+} , so fällt auf, dass der Unterschied vor allem im ersten Reaktionsschritt liegt. Die initiale Assoziation (repräsentiert durch k_{a1}) ist ohne Ca^{2+} langsamer, die Dissoziation (k_{d1}) dagegen schneller als in Anwesenheit von Ca^{2+} (vgl. Tab. 41 und Tab. 43).

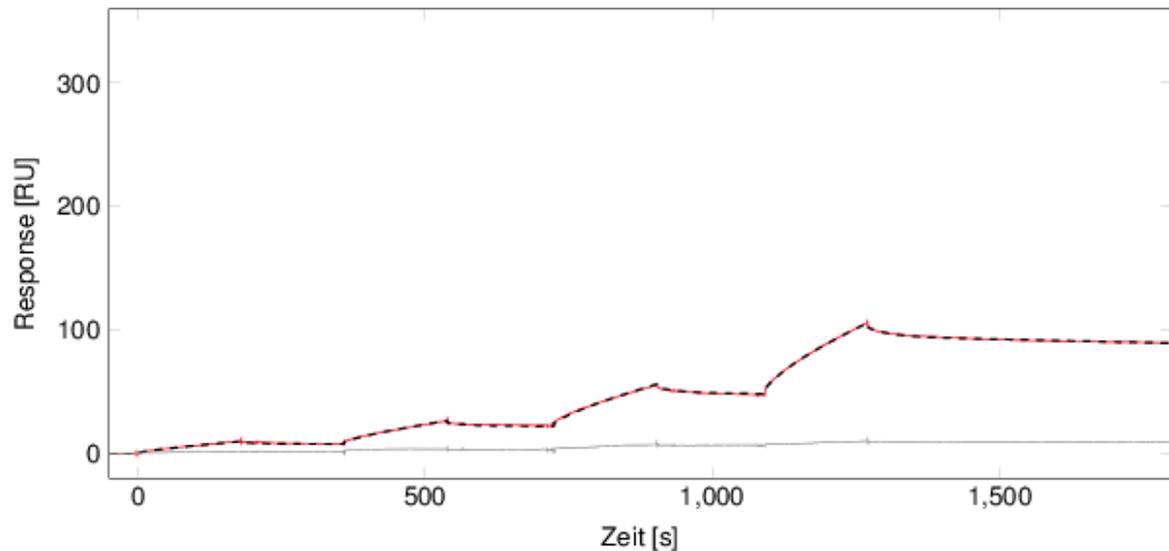


Abb. 35: Sensorgramm der Bindung von GST-Caldendrin-C-term an 6xHis-SUMO-AKAP79-B in Ca^{2+} -freiem EGTA-Puffer und Anpassung des Zwei-Stufen-Bindungsmodells.

Caldendrin wurde stufenweise in aufsteigenden Konzentrationen von 32,25 bis 500 nM über einen mit 6xHis-SUMO-AKAP79-B immobilisierten CM5-Chip injiziert (rote Kurve). Ein Zwei-Stufen-Bindungsmodell (schwarze gestrichelte Kurve) wurde an das Sensorgramm angepasst. In grau ist die mit gleichen GST-Konzentrationen erhaltene RU-Kontrollkurve eingezeichnet.

k_{a1} [$\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$]	k_{d1} [s^{-1}]	k_{a2} [s^{-1}]	k_{d2} [s^{-1}]	K_D [M]	R_{\max} (RU)
7,13E+03	3,65E-02	1,72E-02	1,89E-04	5,58E-08	318

Tab. 43: Auflistung der durch die Anpassung des Zwei-Stufen-Modells erhaltenen kinetischen Parameter der Bindung zwischen GST-Caldendrin-C-term und 6xHis-SUMO-AKAP79-B in Ca^{2+} -freiem EGTA-Puffer.

k_{a1} – Assoziationskonstante Reaktionsschritt 1, k_{d1} – Dissoziationskonstante Reaktionsschritt 1, k_{a2} – Assoziationskonstante Reaktionsschritt 2, k_{d2} – Dissoziationskonstante Reaktionsschritt 2, K_D – Affinitätskonstante; R_{\max} – theoretischer maximaler RU-Wert.

Das Reaktionsschema des Zwei-Stufen-Modells ist in Gleichung [6] angegeben.

Um herauszufinden, ob eine strukturelle Flexibilität des AKAP79-B-Fusionsproteins für die Interaktion erforderlich ist, was einen weiteren Hinweis auf den Mechanismus der Interaktion zwischen AKAP79-B und Caldendrin liefern würde, wurde 6xHis-SUMO-AKAP79-B nach Immobilisierung auf dem Chip kreuzverlinkt. Anschließend konnte keine Bindung von Caldendrin an den Chip mehr beobachtet werden, was darauf schließen lässt, dass AKAP79-B zur Etablierung der Interaktion einer gewissen Flexibilität bedarf. Allerdings verhinderte diese Kreuzverlinkung ebenfalls die Bindung von CaM. Die Daten dieser Experimente sind hier nicht gezeigt.

3.3.2.5. Hinweise auf eine *in-vivo* Interaktion zwischen Caldendrin und AKAP79/150

Bisher wurden mithilfe zweier Methoden, Pulldown-Experimenten und *Surface Plasmon Resonance*-Messungen, Beweise für eine direkte Interaktion zwischen AKAP79 und Caldendrin *in vitro* erhalten. Nun sollte nach Hinweisen auf eine *in vivo* Interaktion beider Proteine gesucht werden.

Es ist bekannt, dass AKAP150 vor allem in Regionen des Vorderhirns, wie dem Cortex und dem Hippocampus, stark exprimiert ist, dagegen nur minimal im Hirnstamm und im Cerebellum (Glantz *et al.* 1992). Ähnlich verhält es sich mit der Expression von humanem AKAP79: es wurde in Regionen des Vorderhirns, wie dem cerebralen Cortex, dem Striatum und im Hippocampus gefunden, aber nicht im Cerebellum, Hypothalamus, Thalamus und Hirnstamm (Ostroveanu *et al.* 2007). Übereinstimmend mit der Literatur konnte AKAP79 in Westernblot-Analysen von humanem *post-mortem* Hirngewebe nur im Hippocampus und im Cingulären Cortex, aber nicht im Cerebellum nachgewiesen werden (Abb. 36, humanes *post-mortem* Hirngewebe wurde zur Verfügung gestellt von Prof. Bernstein, Klinik für Psychiatrie, Universität Magdeburg).

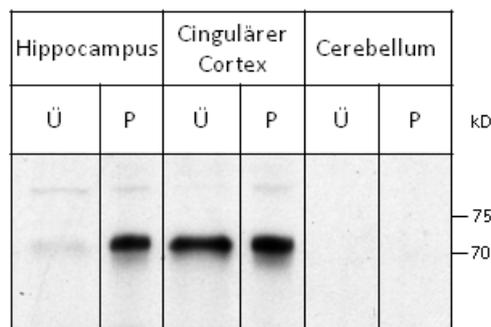


Abb. 36: Fraktionierung von AKAP79 in Triton-Extrakten von humanem *post-mortem*-Hirnmaterial.

Ü – Überstand, P – Pellet nach Extraktion in TBS + 1% Triton X-100.

Caldendrin ist im Gehirn in laminar aufgebauten Hirnstrukturen exprimiert, dabei am stärksten im cerebralen Cortex, aber auch im Hippocampus und im Cerebellum (Seidenbecher *et al.* 1998, Laube *et al.* 2002, Seidenbecher *et al.* 2004). Die Expression beider Proteine überlappt demnach vor allem in den Arealen des Vorderhirns. Aufgrund dessen wurden für die folgenden Co-Immunpräzipitationen (Co-IP) Extrakte aus Rattenvorderhirn verwendet. Die Co-IP-Experimente sollten Aufschluss über eine mögliche Interaktion beider Proteine *in vivo* geben.

Zunächst wurde ein Triton-Extrakt aus Rattenvorderhirn eingesetzt, da im Überstand alle löslichen sowie membrangebundene Proteine enthalten und nur die schwer löslichen Cytoskelett-Proteine im Pellet verblieben sein sollten. Zu dem Überstand wurden Caldendrin-Antikörper aus Kaninchen oder unspezifische Kaninchen-Immunglobuline (IgGs) als Kontrolle gegeben. Das Ergebnis einer dieser Co-IPs ist in Abbildung 37 zu sehen. AKAP150 konnte von den Caldendrin-Antikörpern, die entweder gegen das vollständige Caldendrin oder den C-terminalen Teil von Caldendrin gerichtet waren, nur in dem Extrakt ohne Ca^{2+} (EGTA) co-präzipitiert werden. Allerdings zeigt die IgG-Kontrolle ebenfalls eine leichte AKAP150-Immunreaktivität. Das Experiment wurde drei Mal wiederholt, wobei die Bedingungen mit jedem Mal stringenter gewählt wurden. Zum Beispiel wurde beim zweiten Mal das eingesetzte Extrakt im Vorfeld mit Protein-A-Agarose präinkubiert, um unspezifisch bindende Proteine zu

präzipitieren. Dennoch fand sich jedes Mal etwas AKAP150 in der EGTA-IgG-Kontrolle, wobei die Menge an AKAP150 im Kontrollpräzipitat meist nur minimal geringer war als das von den Caldendrin-Antikörpern präzipitierte AKAP150.

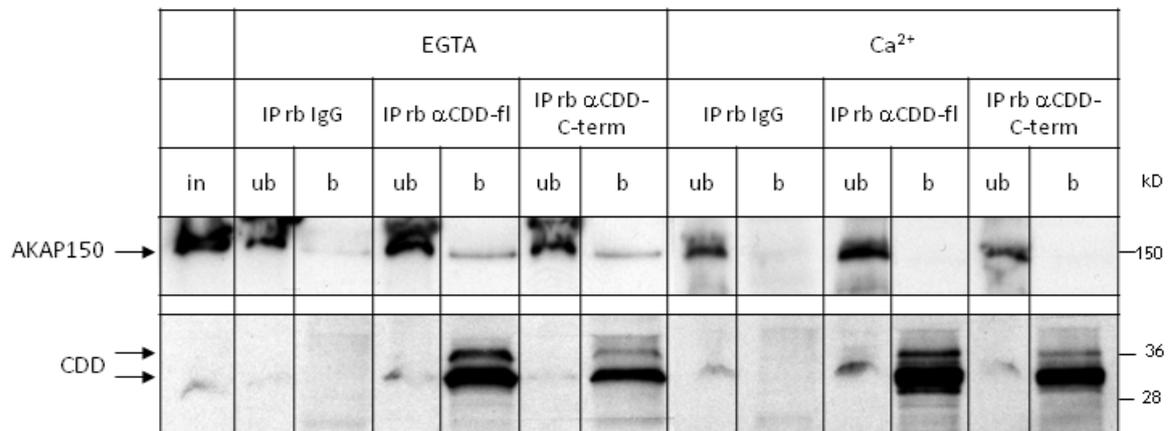


Abb. 37: Co-Immunpräzipitation von AKAP150 mit Caldendrin-Antikörpern aus Hirn-Triton-Extrakt im Beisein von Ca²⁺ oder ohne Ca²⁺ (EGTA).

Zwei verschiedene Kaninchen (rabbit, rb) anti-Caldendrin-Antikörper kamen zum Einsatz: ein Antikörper gegen das vollständige Caldendrin (rb αCDD-fl), der andere gegen den C-terminalen, CaM-ähnlichen Caldendrin-Teil (rb αCDD-C-term). Beide Antikörper konnten in Abwesenheit von Ca²⁺ AKAP150 co-präzipitieren (EGTA, linke Hälfte des Blots). In Anwesenheit von Ca²⁺ fand keine Co-Präzipitation statt (rechte Blothälfte).

IP – Immunpräzipitation; in – input; ub – unbound, ungebundene Fraktion; b – bound, gebundene Fraktion.

Anschließend erfolgte eine weitere Serie an Co-IP-Experimenten. In Anlehnung an eine publizierte erfolgreiche Co-IP mit Caldendrin-Antikörpern und einem membrangebundenen Protein (Tippens & Lee 2007) wurde ausschließlich mit der Membranfraktion gearbeitet. Rattenvorderhirn wurde in HEPES-Puffer mit 320 mM Saccharose homogenisiert, so dass durch die nachfolgende Ultrazentrifugation nur die cytosolischen Proteine im Überstand verblieben und sowohl Membran- als auch Cytoskelett-assoziierte Proteine pelletiert wurden. Aus dem resuspendierten Pellet wurden durch Zusatz von Triton X-100 die membrangebundenen Proteine gelöst und die cytoskelettäre Fraktion abzentrifugiert. Das Material der Membranfraktion wurde für die Co-IP eingesetzt.

Das Ergebnis ist eindeutig: Caldendrin-Antikörper co-präzipitieren AKAP150 nur in EGTA-haltigem Puffer, aber nicht in Ca²⁺-Puffer (Abb. 38), wobei in diesen Experimenten die Kaninchen-IgG-Kontrollen alle frei von AKAP150 sind.

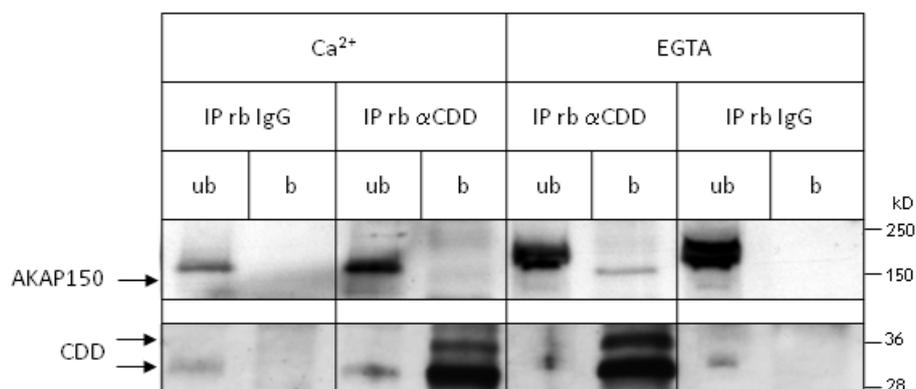


Abb. 38: Co-Immunpräzipitation aus Rattenhirnextrakt im Beisein von Ca^{2+} oder EGTA mit Kaninchen (rb) anti-Caldendrin (αCDD) Antikörpern oder unspezifischen Kaninchen IgGs (rb IgG) als Kontrolle.

Getestet wurde auf Co-Immunpräzipitation von AKAP150 (oberer Blot, gefärbt gegen AKAP150) und Immunpräzipitation (IP) von Caldendrin (CDD) (unterer Blot, gefärbt gegen Caldendrin).

ub – unbound, ungebundene Fraktion; b – bound, gebundene Fraktion.

Einen weiteren Hinweis auf eine *in vivo* –Interaktion zwischen Caldendrin und AKAP79/150 lieferte eine Co-Färbung primärer hippocampaler Rattenneurone.

AKAP150 und Caldendrin co-lokalisieren in 21 Tage alten hippocampalen Neuronen (Abb. 39). Beide Proteine sind stark im Soma und in Dendriten exprimiert. Die Caldendrin-Färbung ist eher punktuell, mit Ausnahme des stark gefärbten Zellkerns. Im Gegensatz dazu ist die AKAP150-Färbung etwas gleichmäßiger, mit einigen etwas stärker gefärbten Punkten bzw. Bereichen.

Als Synapsenmarkierung diente eine Färbung gegen PSD-95, welches in der Tat fast ausschließlich in der PSD und daneben im Soma lokalisiert ist. In vielen PSD-95-positiven Punkten finden sich auch AKAP150- und Caldendrin-Färbung (markiert mit Pfeilen in Abb. 39). Es existieren aber auch PSD-95-negative Punkte, in denen AKAP150- und Caldendrin-Färbung überlappen (Pfeilköpfe, Abb. 39).

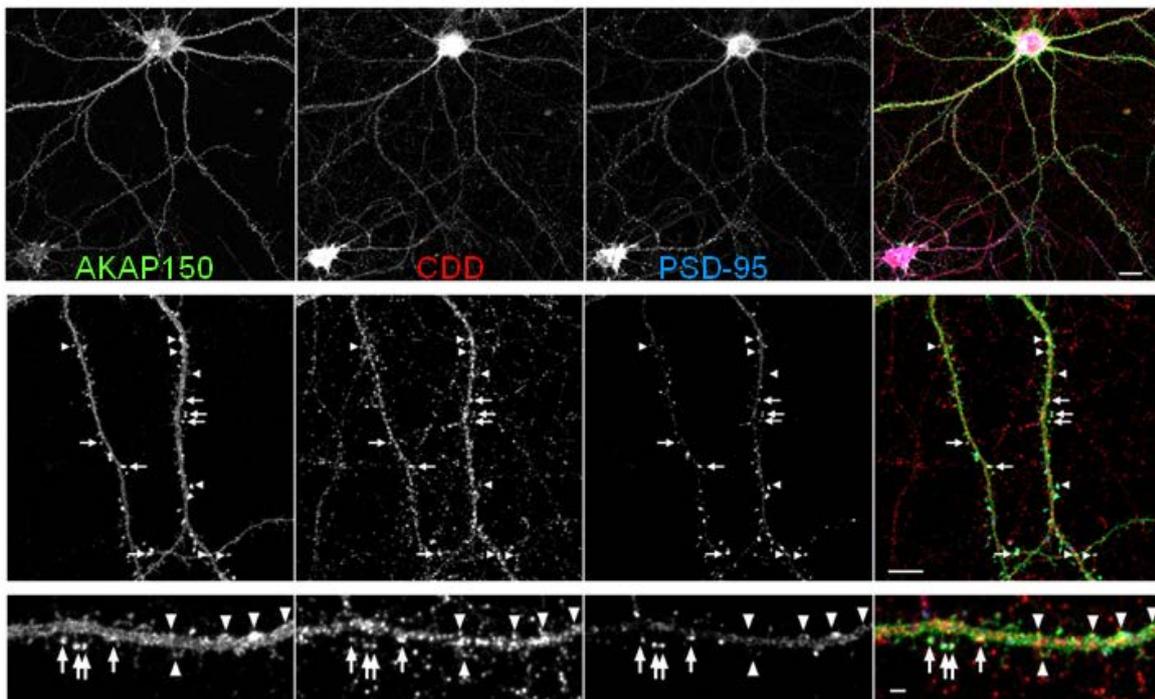


Abb. 39: Co-Lokalisation von AKAP150, Caldendrin (CDD) und PSD-95 in primären hippocampalen Rattenneuronen.

Erste Spalte: AKAP150, zweite Spalte: CDD, dritte Spalte: PSD-95, vierte Spalte: Überlagerung aller drei Kanäle, AKAP150 in grün, CDD in rot, PSD-95 in blau. Die Pfeile deuten auf eine Co-Lokalisation aller drei Proteine, die Pfeilköpfe weisen auf Punkte, an denen nur die AKAP150- und CDD-Färbung überlappen. In den Bildern der vierten Spalte sind die Größenmaßstäbe in Form weißer horizontaler Striche angegeben. Im obersten Bild entspricht der Maßstab 20 μm , im mittleren Bild 10 μm und im untersten Bild 2 μm .

Da die vorangegangenen Co-IP-Experimente eine Interaktion von AKAP150 und Caldendrin vor allem in Abwesenheit von Ca^{2+} nahelegen, wurden die Calciumbedingungen in den Neuronenkulturen der folgenden Experimente pharmakologisch manipuliert.

Ionomycin ist ein Ionophor. Es bindet bivalente Kationen und transportiert sie durch die Membran (Liu & Hermann 1978). Nach der Zugabe zu Zellen bewirkt es einen schnellen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration vor allem durch die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern (Morgan & Jacob 1994). Die Substanz ist sehr schädlich für die Zellen, da sie die Möglichkeit der Kommunikation und Signalweiterleitung über den sekundären Botenstoff Ca^{2+} stört. Eine Zugabe von Ionomycin erfolgt daher nur für eine bis wenige Minuten. Anschließend werden die Zellen sofort fixiert und gefärbt, so dass letztendlich ein Zustand extrem hoher Ca^{2+} -Konzentration in den Zellen eingefroren ist.

BAPTA (*1,2-bis(2-amino phenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid*) ist, wie EGTA (*ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid*), ein Ca^{2+} -Chelator. Beide weisen etwa gleiche Affinitäten für die Bindung von Ca^{2+} auf, aber BAPTA wirkt wesentlich schneller als EGTA (Adler *et al.* 1991). BAPTA-AM (*BAPTA-tetra-acetoxymethyl ester*) ist eine membranpermeable Form von BAPTA (Kan *et al.* 2010). Im Cytoplasma der Zelle wird die Veresterung von cytosolischen Esterasen entfernt, so dass BAPTA im Cytosol akkumuliert. Dort komplexiert es freies Ca^{2+} .

Beide Substanzen wurden vor der Fixierung dem Neuronenkulturmedium unabhängig voneinander zugesetzt, um entweder eine Bedingung erhöhter Ca^{2+} -Konzentration oder einen Ca^{2+} -armen Ruhezustand zu simulieren und anschließend die Co-Lokalisation von AKAP150, Caldendrin und PSD-95 zu beobachten. In Abbildung 40 ist die Auswertung der Co-Lokalisationen unter den verschiedenen Bedingungen im Vergleich zu unbehandelten Neuronen (Kontrollbedingung, control) dargestellt.

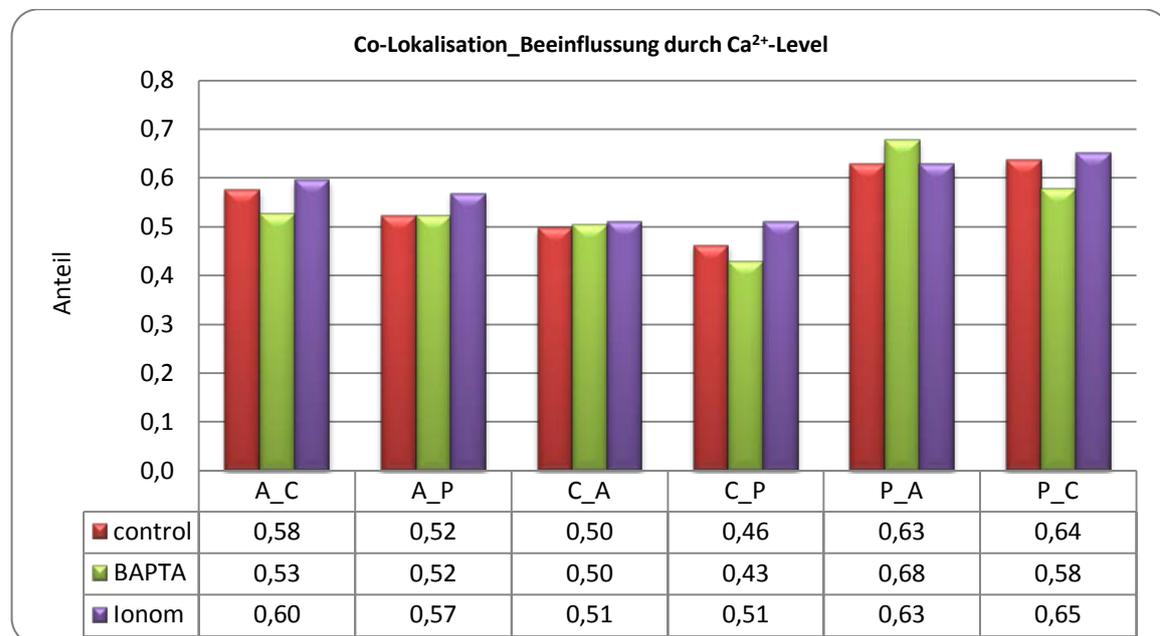


Abb. 40: Auswertung der Co-Lokalisation von AKAP150, Caldendrin und PSD-95 unter verschiedenen Ca^{2+} -Bedingungen.

Primäre hippocampale Neurone wurden vor der Fixierung mit BAPTA-AM (BAPTA) oder Ionomycin (Ionom) behandelt oder ohne Behandlung fixiert (control), anschließend gegen AKAP150 (A), Caldendrin (C) und PSD-95 (P) gefärbt und die Co-Lokalisation dieser Proteine unter den verschiedenen Ca^{2+} -Bedingungen mit OpenView analysiert. Im Säulendiagramm aufgetragen ist der Anteil der überlappenden Färbung. Als Referenz diente das zuerst angegebene Protein, worauf die Färbung des zweiten, nach dem Unterstrich angegebenen Proteins bezogen wurde.

Das Ca^{2+} -Niveau in den Neuronen hat in diesem Experiment keinen signifikanten Einfluss auf die Co-Lokalisation von AKAP150, Caldendrin und PSD-95. Das Experiment wurde einmal wiederholt, wobei sich ein ähnliches Ergebnis zeigte. Nimmt man AKAP150 als Grundlage, so überlappen etwa 57% der AKAP150-positiven Puncta mit Caldendrin und 54% mit PSD-95. Caldendrin-Puncta überlappen zu 50% mit AKAP150 und zu 47% mit PSD-95. PSD-95, welches als synaptischer Marker durch seine überwiegend punktuelle Färbung am besten für diese Art der Auswertung geeignet ist, überlappt zu 65% mit AKAP150 und zu 62% mit Caldendrin (Abb. 40).

3.3.3. Vergleich der essentiellen Bindungssequenzen von Calmodulin und Caldendrin in AKAP79

Auf der Basis der zuvor beschriebenen Experimente konnte belegt werden, dass CaM und Caldendrin an die gleiche Domäne in AKAP79 binden. Die Calmodulin-Target-Database verweist auf eine bestimmte Sequenz in der AKAP79-B-Domäne, welche laut Vorhersage essentiell für die Bindung von CaM an AKAP79-B ist (Abb. 16 und Abb. 41). Um diese Prädiktion zu überprüfen, wurde die B-Domäne in drei Peptide unterteilt, B1, B2 und B3, wobei B2 die vermeintliche CaM-Bindungssequenz enthält (Abb. 41). Diese Peptide wurden als GFP-Fusionsproteine in HEK293-Zellen exprimiert und Pulldown-Experimente mit CaM-Sepharose und GST-Caldendrin-C-term durchgeführt. Abbildung 41 zeigt eine schematische Darstellung der verwendeten Peptide. Zum besseren Verständnis sind die Aminosäuresequenzen neben den Schemata angegeben und die essentielle CaM-Bindungsstelle ist rot markiert. In Abbildung 42 sind die Ergebnisse der Pulldown-Experimente gezeigt.



Abb. 41: Schematische Darstellung der verwendeten B-Domänen Peptide.

Die Aminosäuresequenzen der Peptide sind rechts neben der Darstellung angegeben. Die essentielle CaM-Bindungssequenz ist zur besseren Orientierung rot markiert.

Wie erwartet bindet nur das Peptid B2 an CaM-Sepharose, nicht aber an Protein-A-Sepharose, die als Kontrolle diente (Abb. 42A). Allerdings scheint die für CaM essentielle Bindungssequenz nicht für die Interaktion mit Caldendrin auszureichen, denn weder B2 noch die anderen beiden Peptide binden an Caldendrin (Abb. 42B).

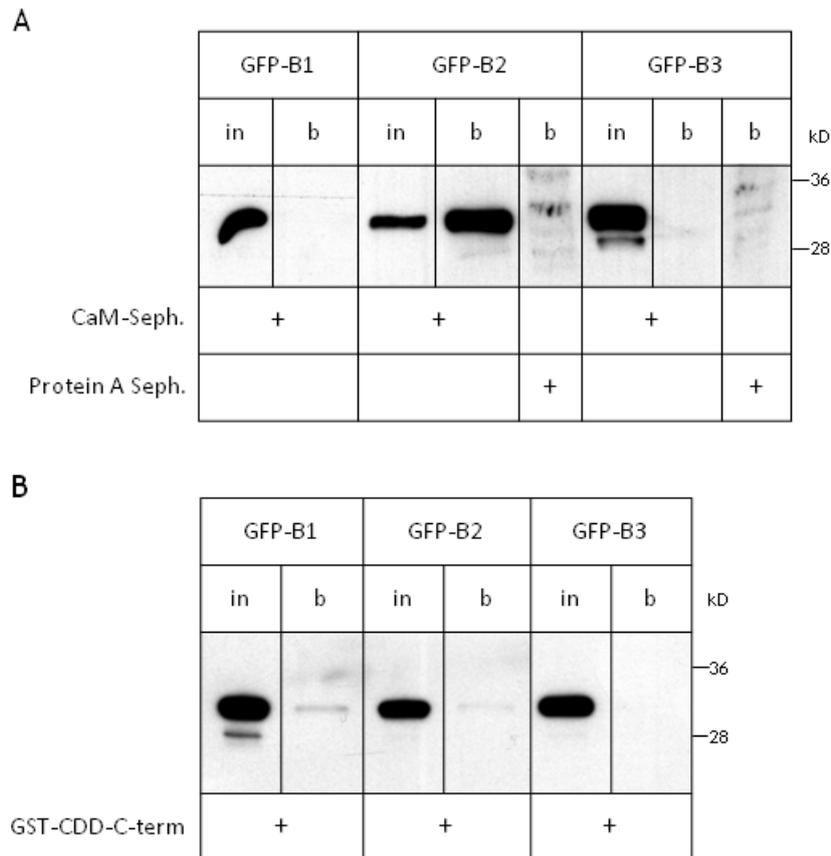


Abb. 42: Pulldown mit CaM-Sepharose, GST-Caldendrin-C-term und GFP-AKAP79-B1, -B2 und -B3-Peptiden.
A) Pulldown mit CaM-Sepharose (CaM-Seph.), Protein-A-Sepharose (Protein A Seph.) und GFP-B1, -B2 und B3.
B) Pulldown mit GST-Caldendrin-C-term (GST-CDD-C-term) und GFP-B1, -B2 und -B3.
 in – input; b – bound, gebundene Fraktion. Die Blots sind gegen GFP gefärbt.

Nach diesem unerwarteten Ergebnis wurden zwei weitere Konstrukte kloniert, welche die essentielle CaM-Bindungssequenz B2 entweder mit dem N-terminalen B1- oder dem C-terminalen B3-Peptid kombinieren (GFP-B1/2 und GFP-B2/3, siehe Abb. 41). Das Ergebnis der mit diesen Konstrukten durchgeführten Pulldowns ist in Abbildung 43 zu sehen.

Da beide Konstrukte die essentielle CaM-Bindungssequenz (B2) enthalten, werden beide, wie erwartet, von CaM-Sepharose präzipitiert (Abb. 43A). Caldendrin allerdings präzipitiert nur B1/2, das Peptid, welches die CaM-Bindungssequenz mit der N-terminalen Sequenz kombiniert (Abb. 43B). Caldendrin braucht demnach eine N-terminal erweiterte Sequenz, um an AKAP79-B binden zu können. Keines der Konstrukte bindet die Kontrollen (Protein-A-Sepharose und GST; Abb. 43A und B).

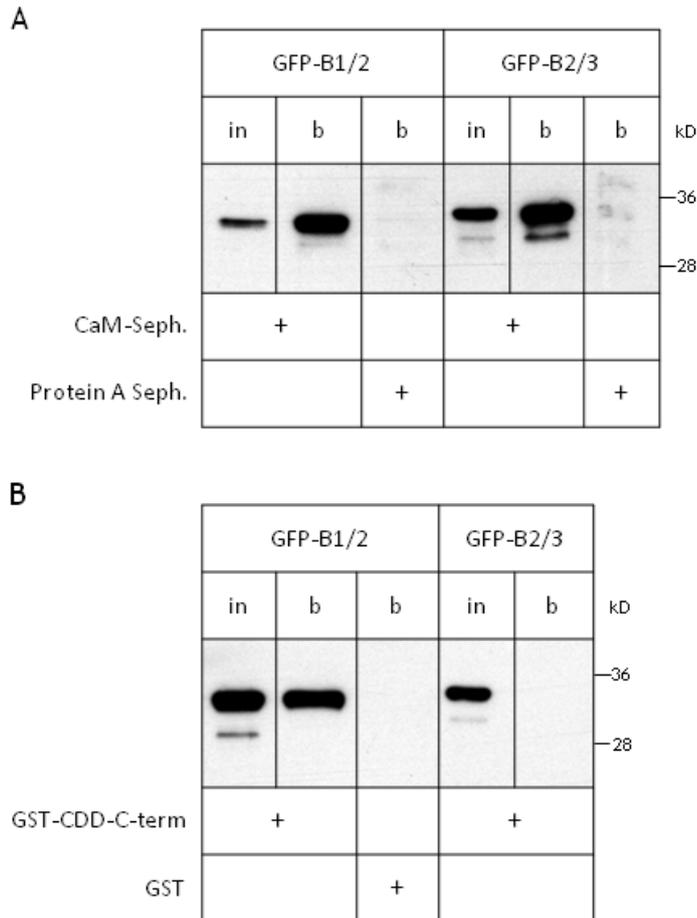


Abb. 43: Pulldown mit CaM-Sepharose, GST-Caldendrin-C-term und GFP-AKAP79-B1/2 und -B2/3-Peptiden.

A) Pulldown mit CaM-Sepharose (CaM-Seph.), Protein-A-Sepharose (Protein A Seph.) und GFP-B1/2 und -B2/3.

B) Pulldown mit GST-Caldendrin-C-term (GST-CDD-C-term) oder GST und GFP-B1/2 und -B2/3.

in – input; b – bound, gebundene Fraktion. Die Blots sind gegen GFP gefärbt.

3.3.4. **Kompetition von Calmodulin und Caldendrin um die Bindung an AKAP79-B**

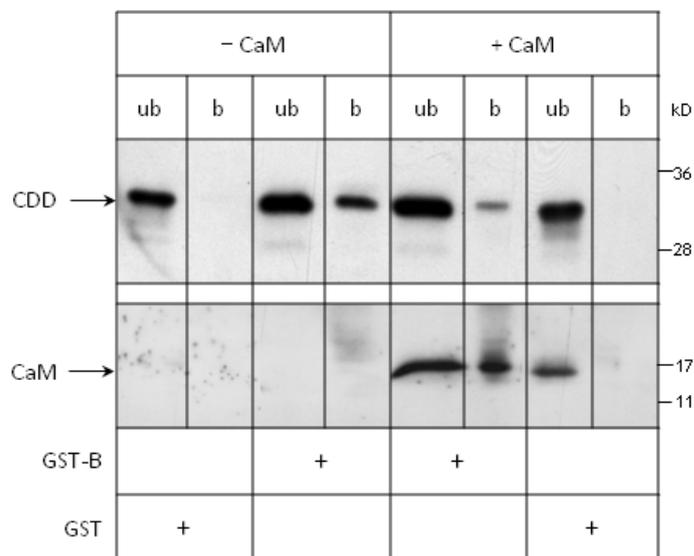
Obwohl Caldendrin eine längere Sequenz braucht, um an AKAP79-B zu binden, überlappen die Bindungssequenzen von CaM und Caldendrin. Beide Ca^{2+} -Sensoren binden AKAP79 in Anwesenheit von Ca^{2+} , aber nur Caldendrin kann AKAP79 auch Ca^{2+} -unabhängig binden. Es könnte eine Kompetition beider Proteine um den Bindungsplatz im Beisein von Ca^{2+} stattfinden.

Um diese Möglichkeit zu testen, wurde zunächst GST-AKAP79-B (GST-B) entweder nur mit Caldendrin- $\Delta 21$ oder mit beiden potentiellen Kompartnern gleichzeitig inkubiert. Das Ergebnis wird in Abbildung 44A gezeigt. Im Beisein von CaM wird wesentlich weniger Caldendrin- $\Delta 21$ von GST-B gebunden, als ohne CaM. Beide Ca^{2+} -Sensoren scheinen um die Bindung an GST-B zu kompetieren und werden gleichzeitig präzipitiert, wobei die Bindung von Caldendrin in Kompetition mit CaM deutlich schwächer ausfällt. Weder Caldendrin noch CaM binden an GST.

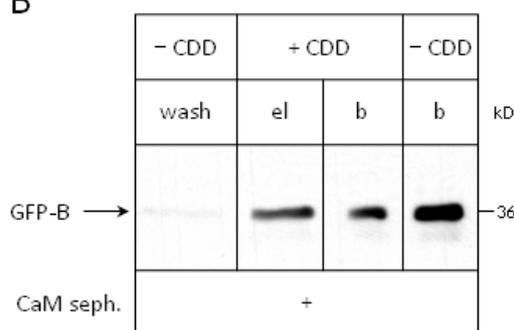
Ob einer der beiden AKAP79-B-Bindungspartner den anderen von der AKAP79-B Bindungsstelle verdrängen kann, wurde im nächsten Pulldown-Experiment getestet. CaM-Sepharose oder GST-

Caldendrin-C-term wurden zunächst mit GFP-AKAP79-B (GFP-B) im Beisein von Ca^{2+} inkubiert. Es folgten drei Waschschriffe, um ungebundenes GFP-B zu entfernen, wobei der letzte Waschschriff als Referenz aufbewahrt und auf das Auswertungsgel aufgetragen wurde (wash). Der gebundenen Fraktion wurde Ca^{2+} -Puffer mit entweder äquimolarer Menge (Caldendrin- $\Delta 21$) oder 4-facher bzw. sogar 8-facher Konzentration (CaM_4 und CaM_8) des Kompetitionpartners zugesetzt und für drei Stunden inkubiert. Der Überstand wurde als Eluat (el) abgenommen. In Abbildung 44B und 44C ist zu sehen, dass Caldendrin in äquimolarer Menge zu CaM einen großen Teil des gebundenen GFP-B von CaM-Sepharose zu eluieren vermag. CaM hingegen kann weder im 4-fachen noch im 8-fachen Konzentrationsüberschuss GFP-B von GST-Caldendrin-C-term lösen. Sogar eine 16-fach höhere CaM-Konzentration wurde getestet (Daten nicht gezeigt), aber das Ergebnis blieb das gleiche: CaM kann Caldendrin zumindest in diesen Experimenten nicht von der AKAP79-B-Bindungsstelle verdrängen.

A



B



C

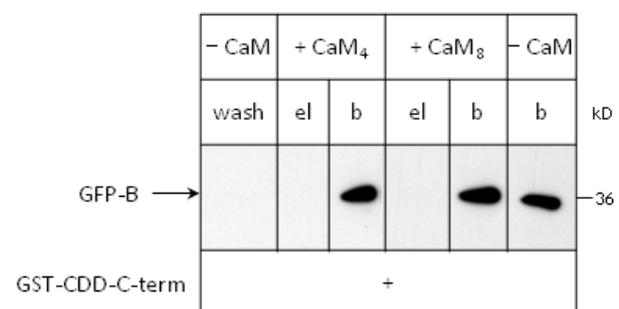


Abb. 44: Mit Pull-down-Experimenten wurde die Konkurrenz zwischen Caldendrin und CaM um die Bindung an AKAP79-B getestet.

- A) Pull-down mit GST-AKAP79-B (GST-B) oder GST als Kontrolle und entweder nur Caldendrin- $\Delta 21$ (CDD, - CaM) oder Caldendrin und CaM gleichzeitig (+ CaM). Der obere Blot ist gegen Caldendrin, der untere gegen CaM gefärbt.
- B) Pull-down mit CaM-Sepharose (CaM-Seph.) und GFP-AKAP79-B (GFP-B) allein (- CDD) oder nach Zusatz von Caldendrin (+ CDD). Der Blot ist gegen GFP gefärbt.
- C) Pull-down mit GST-Caldendrin-C-term (GST-CDD-C-term) und GFP-AKAP79-B (GFP-B) allein (- CaM) oder nach Zusatz von 4-facher (+ CaM₄) oder 8-facher (+ CaM₈) Konzentration (im Vergleich zu Caldendrin) von CaM. Der Blot ist gegen GFP gefärbt.

wash – 1/6 der dritten Waschfraktion; el – 1/6 des Eluats; b – bound, gebundene Fraktion; ub – unbound, ungebundene Fraktion.

Anschließend wurde die Konkurrenz auch mit SPR-Messungen getestet. Beide Ca^{2+} -Sensoren wurden entweder einzeln oder gleichzeitig in äquimolaren Konzentrationen (125 nM) über einen 6xHis-SUMO-AKAP79-B immobilisierten Chip injiziert. Im Sensorgramm in Abbildung 45 repräsentiert die grüne Kurve die RU-Werte für Caldendrin allein, die blaue Kurve die RU-Werte für CaM allein und die rote durchgehend gezeichnete Kurve die RU-Werte, wenn beide Ca^{2+} -Sensoren gleichzeitig injiziert werden. Die rote Kurve unterscheidet sich nur minimal (+ 6% am Ende der Injektion) von den mit CaM allein erhaltenen Messwerten. Man kann demnach davon ausgehen, dass bei einer kurzen Messung (Injektionszeit von 120 s) durch die schnelle Assoziation zwischen CaM und AKAP79-B CaM über Caldendrin dominiert.

Die rot-gestrichelte Kurve zeigt die theoretische Kurve, wenn sich die Signale von Caldendrin und CaM addiert hätten und keine Konkurrenz stattgefunden hätte.

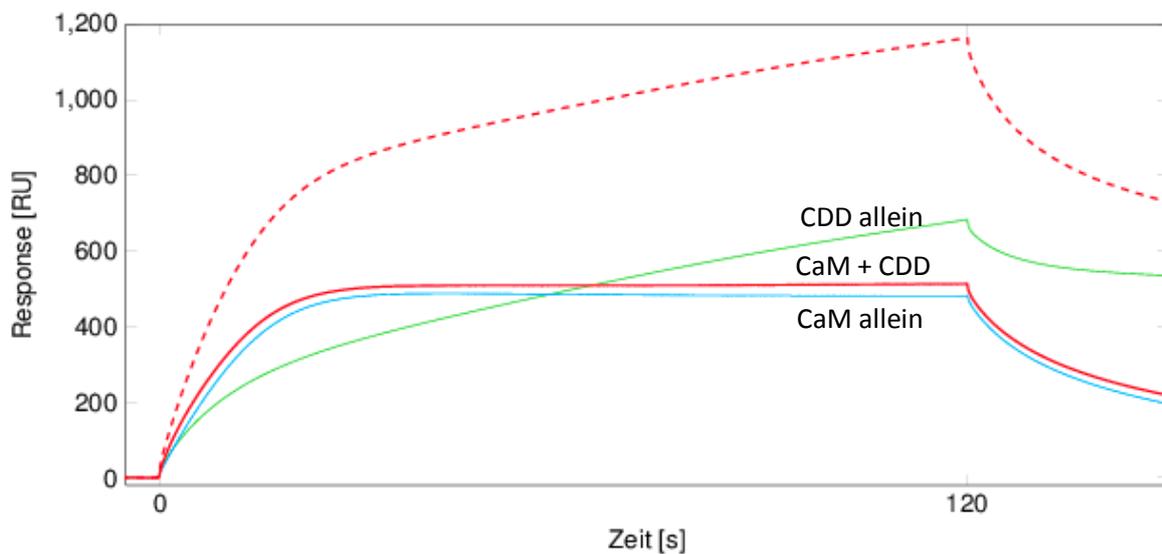


Abb. 45: Mit der SPR-Methode wurde auf Konkurrenz zwischen Caldendrin und CaM um die Bindung an immobilisiertes 6xHis-SUMO-AKAP79-B getestet.

Grün – Sensorgramm mit 125 nM GST-Caldendrin-C-term (CDD allein); blau – Sensorgramm mit 125 nM CaM (CaM allein); rot – Sensorgramm mit Caldendrin und CaM (CaM + CDD), beide in einer Konzentration von 125 nM; rot-gestrichelt – theoretisches Sensorgramm, wenn sich die Signale von Caldendrin und CaM addiert hätten.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde das Adapterprotein AKAP79/150 untersucht. Zum einen wurde der Einfluss eines Aminosäureaustauschs an Position 100 des Proteins auf die subzelluläre Lokalisation, Membranassoziation und Bindung an Interaktionspartner betrachtet, wobei ein signifikanter Einfluss des Polymorphismus auf die postsynaptische Lokalisation gezeigt werden konnte. Zum anderen wurde ein neuer Interaktionspartner gefunden und die Interaktion im Vergleich zu einem weiteren, schon bekannten Interaktionspartner charakterisiert.

4.1. CaM bindet an AKAP79-B

Dass AKAP79/150 ein CaM-bindendes Protein ist, war bereits bei seiner Entdeckung 1984 bekannt (Sarkar *et al.* 1984). Die Vorhersagen der CaM-Target-Database verwiesen auf zwei CaM-Bindungssequenzen im N-terminalen Teil von AKAP79. Eine davon war als solche schon beschrieben (Faux & Scott 1997). In der vorliegenden Arbeit konnte die Vorhersage der zweiten CaM-Bindungssequenz zunächst durch Pulldown-Experimente und später durch SPR-Messungen bestätigt werden.

Erstaunlicherweise lieferten die im Laufe dieser Arbeit gemachten Pulldown-Assays ein negatives Ergebnis für die erste, in der AKAP79-A-Domäne liegende CaM-Bindungssequenz (Abb. 17B). Das könnte auf ein – im Vergleich zum nativen AKAP79-Protein – abweichendes Faltungsverhalten des GFP-AKAP79-A-Fusionsproteins hindeuten. Im Kontext umgebender Aminosäuresequenzen im AKAP79-*full-length* Protein könnte die Faltung aufgrund von Wechselwirkungen zwischen den Aminosäureresten anders ausfallen, als es in der isolierten und mit GFP fusionierten A-Domäne möglich ist. Aus diesem Grund wurde die Sequenz des Fusionsproteins mit der CaM-Target-Database evaluiert, was jedoch keinen Hinweis auf eine Verschlechterung oder einen Verlust der CaM-Bindungsfähigkeit erbrachte.

Die SPR-Messungen von Faux *et al.* beruhen auf der Bindung von rekombinantem AKAP79 an CaM. Die Bindung des mit PKC interagierenden AKAP79₃₁₋₅₂-Peptids an CaM wurde nur indirekt über eine erhöhte PKC-Aktivität und ein negatives Ergebnis der Co-Immunpräzipitation zwischen AKAP79 und PKC im Beisein von Ca²⁺/CaM gezeigt (Faux & Scott 1997). Ein endgültiger Nachweis für eine direkte Interaktion zwischen CaM und der AKAP79-A-Domäne fehlt bisher.

Stattdessen konnte im Laufe dieser Arbeit der Nachweis einer direkten Bindung von CaM an die AKAP79-B-Domäne geliefert werden. Laut SPR-Studie bindet CaM mit einer Affinität von $K_D = 30$ nM an AKAP79-B. Dieser Wert stimmt überein mit der von Faux und Kollegen gefundenen Affinität zwischen CaM und *full-length* AKAP79 (Faux & Scott 1997).

Gomez und Kollegen haben gezeigt, dass CaM und F-Actin um die Bindung an den N-terminalen Teil von AKAP79 konkurrieren (Gomez *et al.* 2002). Auf welche der beiden CaM-bindenden AKAP79-Domänen sich diese Konkurrenz bezieht, ist bisher unklar und sollte experimentell überprüft werden.

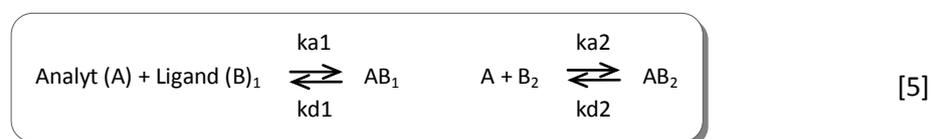
4.2. Caldendrin, ein neuer Interaktionspartner von AKAP79/150

Der C-terminale Teil von Caldendrin ist dem CaM sehr ähnlich, was Caldendrin zum nächsten Verwandten des CaM macht. Sowohl Caldendrin als auch AKAP79/150 sind vorwiegend im Gehirn exprimiert, lokalisieren dort somato-dendritisch in Neuronen und sind nach Fraktionierung zu einem großen Teil in der partikulären Fraktion zu finden (Carr et al. 1992, Glantz et al. 1992, Seidenbecher et al. 1998, Seidenbecher et al. 2004). Damit wurde die Frage aufgeworfen, ob es sich bei Caldendrin um einen weiteren AKAP79/150-Bindungspartner handeln könnte. Das Ergebnis war eindeutig: AKAP79 bindet an den C-terminalen, CaM-ähnlichen Teil von Caldendrin. Weitere Untersuchungen der einzelnen Abschnitte von AKAP79 ergaben, dass Caldendrin, genau wie CaM, die AKAP79-B-Domäne bindet.

4.3. Zwei Bindungspartner an der gleichen Stelle – mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften

Die Interaktion zwischen CaM und AKAP79-B kann mit einem 1:1-Bindungsmodell dargestellt werden (Abb. 24, Gleichung 4). Die Bindung von Caldendrin an AKAP79-B, welche durch SPR-Messungen bestätigt werden konnte, folgt nicht dem einfachen 1:1-Bindungsmodell, sondern ähnelt entweder einem heterogenen oder einem Zwei-Stufen-Bindungsmodell (Seeger *et al.* 2012).

Das Modell der heterogenen Bindung geht davon aus, dass die Komplexität der Bindung auf die Heterogenität entweder des Liganden oder des Analyten zurückzuführen ist (Morton *et al.* 1995, Karlsson & Falt 1997). Die Heterogenität kann durch eine Degeneration, eine abweichende Faltung, Dimerisierung oder Kreuzverlinkungen des Proteins entstehen, sodass Proteinpopulationen betrachtet werden, die sich bezüglich der Bindung unterschiedlich verhalten. Auch die Orientierung des Liganden auf der Sensoroberfläche kann zur Heterogenität beitragen. Darüber hinaus kann Heterogenität auch auf dem Vorhandensein zweier unabhängiger Bindungsstellen im Analyten oder Liganden beruhen. Dem hier angewendeten Bindungsmodell des heterogenen Liganden liegt folgendes Reaktionsschema zugrunde:



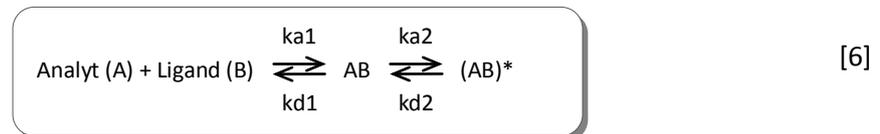
Es wird von zwei verschiedenen Ligandenpopulationen oder Bindungsstellen im Liganden ausgegangen, wobei beide den Analyten mit jeweils anderer Kinetik binden.

Ebenso könnte aber auch der Analyt in zwei verschiedenen Populationen vorliegen. Wingard und Fries berichteten übereinstimmend von einer Neigung von Caldendrin/CaBP1 zur Dimerisierung über den C-terminalen Teil (Wingard et al. 2005, Fries *et al.* 2010). Dies könnte für eine strukturelle Heterogenität von Caldendrin verantwortlich sein. Es ist nicht bekannt, ob Caldendrin-Dimere in der Lage sind, an AKAP79/150 zu binden, oder ob eine Homodimerisierung

weitere Interaktionen ausschließt (Fries et al. 2010, Mikhaylova et al. 2011). In Abbildung 46C ist die Hypothese der Caldendrin–Dimerisierung und Bindung an AKAP79–B schematisch dargestellt.

Ein weiterer Grund für Heterogenität könnten unterschiedlich gefaltete Proteinp Populationen sein. Die für die SPR–Messungen verwendeten Proteine wurden heterolog in Bakterien exprimiert. Da diese Proteine in Bakterien nicht endogen vorkommen, könnte es zu Falschfaltungen kommen.

Ein anderer Grund für das komplexe Bindungsverhalten zwischen AKAP79–B und Caldendrin könnte eine durch die Bindung induzierte Konformationsänderung sein. Das Zwei–Stufen–Modell geht zunächst von der schnellen Bildung eines initialen Komplexes zwischen dem Liganden und dem Analyten aus (Karlsson & Falt 1997). Durch das Zustandekommen dieses Komplexes, welcher relativ schnell wieder zerfallen kann, wird eine Konformationsänderung in einem der beiden Bindungspartner induziert, woraufhin eine finale, stabile Bindung zwischen beiden Interaktionspartnern entsteht. Die Entstehung der finalen Bindung setzt sich also, wie in folgender Gleichung [6] gezeigt, aus zwei Reaktionen mit zwei Assoziations– und zwei Dissoziationskonstanten zusammen.



Beide Bindungsmodelle lassen sich mit gleichwertiger Genauigkeit an die gemessenen Sensorgramme anpassen, wie χ^2 –Werte in einer Größenordnung von 3 – 4 RU² bei RU–Werten von über 300 RU beweisen.

Ein SPR–basiertes Experiment, in welchem AKAP79–B nach der Immobilisierung auf dem Sensorchip kreuzverlinkt wurde, verhinderte die Bindung von Caldendrin an AKAP79–B. Man kann also davon ausgehen, dass eine gewisse strukturelle Flexibilität von AKAP79–B erforderlich ist, um mit Caldendrin zu interagieren. Dieser Fakt spricht für ein Zwei–Stufen–Bindungsmodell, da gerade hier eine strukturelle Flexibilität im Sinne einer durch die initiale Bindung induzierten Konformationsänderung, in diesem Falle in AKAP79–B, essentiell für die Etablierung einer stabilen Bindung wichtig wäre. Allerdings verhinderte die Kreuzverlinkung des immobilisierten AKAP79–B auch die Bindung von CaM, obwohl diese dem 1:1–Bindungsmodell folgt.

Ein weiterer Hinweis auf eine induzierte Konformationsänderung ist die Stabilität der Interaktion zwischen Caldendrin und AKAP79–B. Eine schematische Veranschaulichung der Hypothese des Zwei–Stufen–Bindungsmodells, in welcher Caldendrin nach initialer Bindung an AKAP79–B eine Konformationsänderung vollzieht, wobei es zur Etablierung einer stabilen Interaktion kommt, ist in Abbildung 46B dargestellt.

Ein möglicher Grund für die unterschiedlichen Bindungsmechanismen von CaM und Caldendrin an AKAP79–B könnte die Verlängerung der Bindungssequenz sein, die Caldendrin im Gegensatz zu CaM für die Bindung an AKAP79–B benötigt. Die CaM–Bindungsstelle in AKAP79–B stimmt überein mit der durch die CaM–Target–Database vorhergesagten Sequenz. Jedes AKAP79–Konstrukt, welches diese Sequenz enthält, wird von CaM gebunden. Doch obwohl der C–terminale, CaM–ähnliche Teil von Caldendrin die Bindung an AKAP79–B vermittelt und die gleiche essentielle Bindungssequenz benötigt wie CaM, braucht Caldendrin eine zusätzliche N–

terminale Verlängerung dieser Sequenz, um mit AKAP79-B zu interagieren. Man kann spekulieren, dass die zusätzlichen Aminosäureseitenketten mit Seitenketten in Caldendrin interagieren, die spezifisch für Caldendrin sind, und dass auf diese Weise ein anderer Bindungsmechanismus zustande kommt, der die Bildung eines stabilen Komplexes zwischen beiden Proteinen ermöglicht (Seeger et al. 2012).

Außerdem ist die Linkersequenz zwischen den EF-Hand-Paaren in Caldendrin/CaBP1 vier Aminosäuren länger als in CaM, was eine erhöhte Flexibilität von Caldendrin/CaBP1 wahrscheinlich macht und einen *induced-fit*-Mechanismus der Interaktion zwischen AKAP79-B und Caldendrin zur Folge haben könnte (Haeseleer et al. 2000, Seeger et al. 2012).

Ob es sich bei der Interaktion zwischen Caldendrin und AKAP79 um eine Zwei-Stufen-Reaktion handelt, sollte durch die Anwendung weiterer Methoden, zum Beispiel mit Hilfe der Fluoreszenz-Spektroskopie, untersucht werden.

Die Interaktionen der Ca^{2+} -Sensoren CaM und Caldendrin sind oft, aber nicht immer abhängig von Ca^{2+} (Mikhaylova et al. 2011). Die Bindung von Ca^{2+} induziert eine Konformationsänderung in CaM, wobei eine hydrophobe Bindungstasche exponiert und damit für Interaktionspartner zugänglich gemacht wird (Zhang et al. 1995, Ikura 1996, Xia & Storm 2005). Die meisten Interaktionen von CaM sind somit von der Anwesenheit von Ca^{2+} abhängig und die Bindung an AKAP79-B macht hier keine Ausnahme. Entfernt man Ca^{2+} nach erfolgter Bindung zwischen CaM und AKAP79-B aus dem Ansatz, so wird an CaM-Sepharose gebundenes AKAP79-B fast vollständig heruntergewaschen. Ebenso konnte die mit AKAP79-B immobilisierte Chip-Oberfläche in den SPR-Biacore-Experimenten vollständig durch die Zugabe von EGTA-haltigem Puffer regeneriert werden. Darüber hinaus konnte in den SPR-Messungen eine starke Lösung der Bindung auch schon im Beisein von Ca^{2+} -haltigem Puffer beobachtet werden, sobald der Analyt CaM im Laufpuffer fehlte.

Die Bindung von Caldendrin an AKAP79-B wird von der Anwesenheit von Ca^{2+} gefördert, ist aber im Gegensatz zur Bindung von CaM an dieselbe AKAP79-Domäne wesentlich weniger von Ca^{2+} abhängig. In EGTA-haltigem Puffer bindet sichtbar weniger AKAP79-B an Caldendrin, obwohl laut SPR-Messungen der Bindungsmechanismus erhalten bleibt. Ist die Bindung zwischen Caldendrin und AKAP79-B allerdings erst einmal etabliert, scheint sie sehr stabil zu sein und reagiert kaum (in den SPR-Messungen) oder gar nicht (in den Pulldown-basierten Elutionsexperimenten) auf eine Ca^{2+} -Depletierung.

In Caldendrin/CaBP1 reagiert nur das C-terminale EF-Hand Paar mit einer Konformationsänderung auf die Bindung von Ca^{2+} (Wingard et al. 2005). Deshalb wurde vermutet, dass dieser Teil für die Ausbildung Ca^{2+} -abhängiger Bindungen zuständig ist, während das N-terminale EF-Hand Paar für die Fähigkeit, Interaktionspartner auch konstitutiv und in Abwesenheit von Ca^{2+} zu binden, verantwortlich gemacht wurde (Wingard et al. 2005). Angewendet auf die Interaktion zwischen Caldendrin und AKAP79/150 könnten diese Überlegungen die Ca^{2+} -Sensitivität aber auch die Ca^{2+} -Unabhängigkeit der Bindung erklären: Das C-terminale, CaM-ähnliche EF-Hand-Paar könnte die hoch-affine Ca^{2+} -abhängige Bindung zwischen Caldendrin und AKAP79-B vermitteln, wohingegen das N-terminale EF-Hand-Paar für die Ca^{2+} -unabhängige Komponente der Interaktion zuständig sein könnte. Die Überprüfung dieser Hypothese sollte experimentell verfolgt werden.

In NMR-spektroskopischen Untersuchungen der CaBP1-Struktur beobachteten Park, Li und Ames, dass das N-terminale EF-Hand-Paar sowohl in der Ca^{2+} -gebundenen als auch in der apo-

Form in einer geschlossenen Konformation vorliegt (Park et al. 2011). Da bisher keine Interaktionen mit geschlossenen EF-Hand-Strukturen bekannt sind, eröffnen sie die Hypothese, EF-Hand 1 würde mit Hilfe der Bindung eines Interaktionspartners eine *induced-fit* Öffnung der Konformation vollziehen. Sie spekulieren, dass CaBP1 seinen Interaktionspartner zunächst Ca^{2+} -abhängig über das C-terminale EF-Hand-Paar bindet, woraufhin das N-terminale EF-Hand-Paar in Position gebracht wäre und nun die Möglichkeit hätte, Ca^{2+} -unabhängig eine separate Sequenz im Interaktionspartner zu binden, wobei eine Konformationsänderung erfolgen würde (Park et al. 2011).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die meisten Überlegungen auf einen *induced-fit* Mechanismus der Bindung zwischen Caldendrin und AKAP79 hinweisen.

4.4. Die Ménage-à-trois zwischen Caldendrin, CaM und AKAP79/150

Zwischen CaM und Caldendrin besteht eine Konkurrenz um die Bindung an die AKAP79-B-Domäne, welche allerdings nur im Beisein von Ca^{2+} stattfindet.

Wie schon in der Einleitung ausgeführt, wird die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration streng reguliert, da sie essentielle Signalfunktionen erfüllt. Sie variiert innerhalb von Millisekunden und zwischen Micro- oder Nanodomänen, die kaum 100 nm umspannen (Muller et al. 2005, Keller et al. 2008, Kubota & Waxham 2010).

Die Ca^{2+} -Affinität vom Caldendrin-C-Terminus und der Isoform s-CaBP1 liegt mit 2,5 μM etwas höher als die von CaM mit 5 – 10 μM (Mikhaylova et al. 2011). Es wäre demnach anzunehmen, dass bei Ca^{2+} -Konzentrationen unter 5 μM , im Ruhezustand der Zelle, Caldendrin der bevorzugte AKAP79/150 Bindungspartner ist und entweder in Ca^{2+} -gebundenem oder -ungebundenem Zustand eine stabile Interaktion mit AKAP79/150 ausbilden kann. Unter hohen Ca^{2+} -Konzentrationen ist hingegen CaM im Vorteil gegenüber Caldendrin, da es die Interaktion zu AKAP79/150 schneller ausbilden kann als Caldendrin. Das Schema in Abbildung 46A veranschaulicht diese Hypothese. Gestützt wird sie außerdem durch die Ergebnisse der Co-Immunpräzipitationen. Sie deuten darauf hin, dass Caldendrin und AKAP150 *in vivo* vor allem unter Ca^{2+} -freien Bedingungen miteinander assoziiert sind.

Pulldown-Experimente zeigten, dass Caldendrin CaM im Beisein von Ca^{2+} aus der Interaktion mit AKAP79-B verdrängen kann, wohingegen CaM umgekehrt nicht in der Lage ist, Caldendrin zu verdrängen. Die Biacore-Ergebnisse bestätigen die hohe Stabilität der Bindung zwischen Caldendrin und AKAP79-B (Seeger et al. 2012).

Bisher ist unklar, über welchen Mechanismus die Interaktion zwischen Caldendrin und AKAP79 reguliert wird. Die Bindung von F-Actin an AKAP79 wird über eine PKC-abhängige Phosphorylierung des N-terminalen Teils von AKAP79 gesteuert. CaM-Bindung an AKAP79 (1–153) kann die Phosphorylierung durch PKC verhindern (Gomez et al. 2002). Es ist denkbar, dass Phosphorylierung auch eine entscheidende regulatorische Rolle in der Interaktion zwischen AKAP79 und Caldendrin spielt, aber bisher lieferten die Experimente keinen Hinweis darauf. Dennoch sollte dieser interessante Punkt in zukünftigen Experimenten untersucht werden.

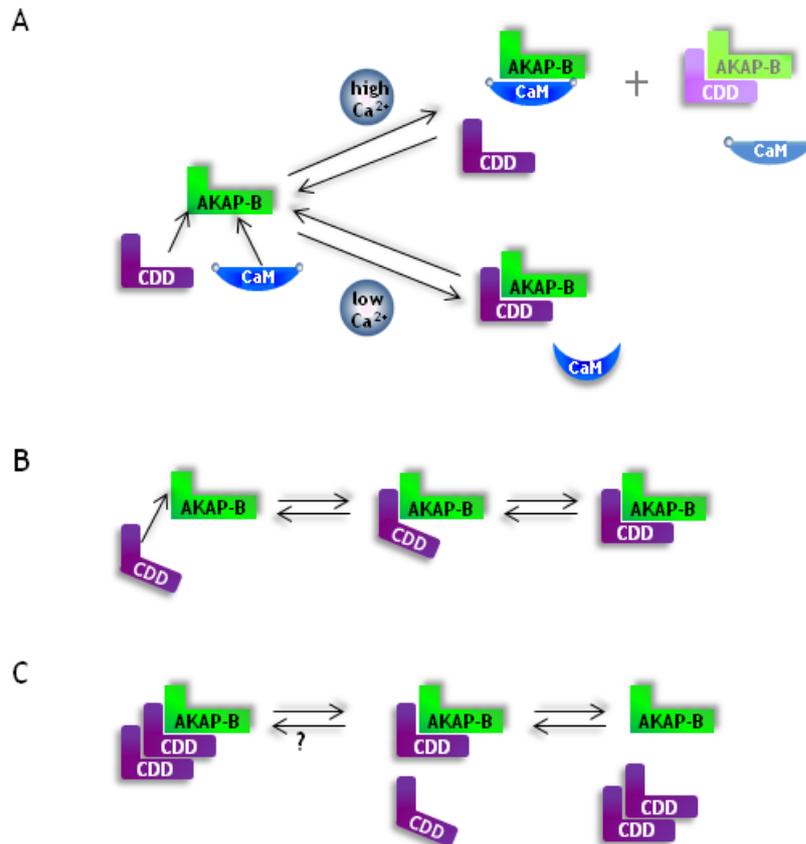


Abb. 46: Schematische Darstellung der hypothetischen Bindungsereignisse zwischen AKAP79-B (AKAP-B) und den beiden Ca^{2+} -Sensor Proteinen Caldendrin (CDD) und CaM.

A) Beide Ca^{2+} -Sensoren binden an die gleiche Sequenz in AKAP-B und konkurrieren damit um die Bindung daran.

In Anwesenheit hoher Ca^{2+} -Konzentrationen (high Ca^{2+}) bindet CaM schnell an AKAP-B und besetzt den gemeinsamen Bindungsplatz. Wird dieser Bindungsplatz aber frei, kann Caldendrin daran binden und eine stabile Interaktion etablieren. Da CaM unter diesen Bedingungen aber schneller an AKAP-B bindet, ist die Bindung von Caldendrin an AKAP-B hier schwächer gezeichnet.

Im Ruhezustand (low Ca^{2+}) kann nur noch Caldendrin an AKAP-B binden und es findet keine Konkurrenz mit CaM statt.

B) Schematische Darstellung der Hypothese des Zwei-Stufen- bzw. *induced-fit*-Modells der Bindung zwischen Caldendrin und AKAP79-B. Es wird spekuliert, dass der *induced-fit* im Caldendrin stattfindet und zu der beobachteten stabilen Bindung zwischen Caldendrin und AKAP79-B führt. Eine weitere im Schema angedeutete Spekulation ist die initiale Bindung des Caldendrin an die N-terminale Verlängerung der Bindungssequenz in AKAP79-B, woraufhin der *induced-fit* im Caldendrin stattfindet, so dass die komplette AKAP79-B-Bindungsregion in die stabile Interaktion eingebunden wird.

C) Caldendrin bildet Dimere. Es ist allerdings unklar, ob diese mit anderen Bindungspartnern interagieren können, oder ob die Dimerisierung die Interaktion mit weiteren Proteinen verhindert.

4.5. Die Liason der drei Proteine im zellulärem Kontext

Es bleibt die Frage, worin die zelluläre Funktion der Liason der zwei Ca^{2+} -Sensor-Proteine mit AKAP79/150 besteht.

Im Falle der CaM-Bindung an die AKAP79-A-Domäne konkurriert CaM mit der dort ebenfalls bindenden PKC, welche in Anwesenheit von Ca^{2+} von CaM verdrängt wird (Faux & Scott 1997). Die PKC wird in inaktivem Zustand gehalten, solange sie an AKAP79 gebunden ist. Ihre durch

Ca^{2+} /CaM geförderte Freisetzung hat somit gleichzeitig eine Erhöhung ihrer Aktivität zur Folge (Faux & Scott 1997).

Auch die Bindung von F-Actin an AKAP79 steht in Konkurrenz mit der Bindung von CaM (Gomez *et al.* 2002). Hier verhindert Präinkubation vom N-terminalen Teil von AKAP79 (AS 1–153) mit CaM die Bindung von und anschließende Co-Sedimentation mit F-Actin, und umgekehrt, Präinkubation mit F-Actin hemmt die Bindung von CaM.

Ob die Kompetition zwischen CaM und F-Actin über eine gemeinsame Bindungsstelle in der AKAP79-B-Domäne vermittelt wird, wurde bisher noch nicht untersucht. Unklar ist in diesem Zusammenhang auch, ob Caldendrin ebenfalls mit F-Actin um die Bindung an AKAP79 konkurrieren könnte.

Interessanterweise haben Caldendrin, CaM und AKAP79/150 im L-Typ spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanal $\text{Ca}_v1.2$ einen gemeinsamen Bindungspartner. Beide Ca^{2+} -Sensoren binden den $\text{Ca}_v1.2$ -Kanal über eine C-terminale IQ-Domäne in seiner α_1 -Untereinheit. Dabei werden die Kanaleigenschaften je nach bindendem Ca^{2+} -Sensor anders beeinflusst. CaM fördert den negativen Feedback-Mechanismus des Kanals, auch Ca^{2+} -abhängige Inaktivierung genannt, während Caldendrin/CaBP1 im Gegensatz dazu die Ca^{2+} -abhängige Inaktivierung verhindert und die Kanalöffnung stabilisiert (Zhou *et al.* 2004, Zhou *et al.* 2005, Tippens & Lee 2007).

AKAP79/150 und der $\text{Ca}_v1.2$ -Kanal binden direkt über modifizierte Leucin-Zipper-Motive in beiden Proteinen aneinander (Oliveria *et al.* 2007). Dadurch wird an AKAP79/150 gebundenes CaN/PP2B mit dem Kanal assoziiert. Ca^{2+} -Einstrom durch den Kanal aktiviert CaN/PP2B, welches daraufhin den Transkriptionsfaktor NFATc4 dephosphoryliert, so dass dieser in den Zellkern translozieren kann (Oliveria *et al.* 2007). Es ist daher denkbar, dass eine Art Ca^{2+} -abhängiger CaM/Caldendrin-Schalter existiert, der die Feinabstimmung dieser Ca^{2+} -regulierten Prozesse moduliert.

In AKAP79/150 überlappen die Bindungsstellen für den KCNQ2 K^+ -Kanal und CaM. Das gleiche gilt für die Bindungsstellen von AKAP79/150 und CaM im KCNQ2-Kanal. Die Co-Expression aller drei Proteine stört die Assoziation zwischen AKAP79 und KCNQ2, was auf der Konkurrenz zwischen CaM und AKAP79 um die Bindung an KCNQ2 beruht (Bal *et al.* 2010). Es wäre interessant zu testen, welche Konsequenzen die Zugabe von Caldendrin zu diesem Dreierkomplex hätte.

Für die MAGuK-Gerüstproteine hat die Bindung von Ca^{2+} /CaM eine Änderung der Konformation zur Folge (Paarmann *et al.* 2008). Ob die Bindung von CaM oder Caldendrin an AKAP79/150 einen konformationsbeeinflussenden Effekt hat, ist eine weitere der noch offenen Fragen.

Kürzlich wurde gezeigt, dass AKAP79 Homooligomere ausbildet (Gao *et al.* 2011), und dass ein AKAP79-Homodimer einen Komplex aus zwei CaM-Molekülen, zwei PKA-RII-Homodimeren und vier PP2B/CaN Heterodimeren versammeln kann (Gold *et al.* 2011). Es wäre denkbar, dass dieser Komplex, statt der beiden CaM-Moleküle, unter niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen auch zwei Caldendrin-Moleküle oder ein Caldendrin-Homodimer enthalten könnte, oder dass, in Anbetracht zweier CaM-Bindungssequenzen in AKAP79/150, unter hohen Ca^{2+} -Konzentrationen sogar beide Ca^{2+} -Sensoren gleichzeitig in diesem Komplex vereint sein könnten.

Bemerkenswert ist die ungewöhnliche Stabilität der Interaktion zwischen Caldendrin und AKAP79/150. Die Auswertung der SPR-Daten sagt eine vollständige Dissoziation beider Proteine erst nach zehn Stunden vorher (Seeger *et al.* 2012). Das verleitet zu der Hypothese, die

Caldendrin–AKAP79/150–Bindung könnte wie eine Markierung wirken, welche ein molekulares Gedächtnis für Low–Ca²⁺–Phasen darstellen könnte.

Weitere Aspekte der Integration von AKAP79/150 im postsynaptischen Proteinnetzwerk sollen in den folgenden Kapiteln diskutiert werden.

4.6. AKAP79/150 in der PSD – Funktionelle Aspekte

Mit Hilfe des Adapterproteins AKAP79/150 werden wichtige, die synaptische Plastizität koordinierende Enzyme, G–Protein gekoppelte Rezeptoren und Ca²⁺–Kanäle sowie Ca²⁺–Sensoren über die Verbindung zu weiteren Gerüstproteinen, zur Plasmamembran, zu Lipid Rafts, Cadherin und zum Cytoskelett in der PSD verankert.

Moita und Kollegen konnten zeigen, dass AKAP150 und PKA in der lateralen Amygdala zu großen Teilen co–lokalisieren und dass die dabei vermittelte Verankerung der PKA wichtig für die Konsolidierung im Angstgedächtnis ist (Moita *et al.* 2002).

Dass AKAP79/150 eine essentielle Funktion im Gehirn hat, wurde auch durch das Ausschalten des AKAP150–Gens (*akap5*) in Knockout–Mäusen ersichtlich: die bidirektionale Regulation der Phosphorylierung der AMPA–Rezeptoren, und damit einhergehend die synaptische Transmission, ist in diesen Mäusen gestört (Tunquist *et al.* 2008). Die PKA wird nicht ordnungsgemäß von AKAP79/150 in der PSD und somit in der Nähe der AMPA–Rezeptoren verankert, sondern akkumuliert stattdessen im dendritischen Schaft. Infolgedessen ist die GluR1–Untereinheit der postsynaptischen AMPA–Rezeptoren nur halb so stark phosphoryliert wie in Wildtyp–Mäusen. Der Prozess der LTP scheint in den Knockout–Mäusen normal zu funktionieren, im Gegensatz zur LTD, welche merklich reduziert ist (Tunquist *et al.* 2008). Außerdem sind Lern– und Gedächtnisdefizite in den AKAP150–Knockout–Mäusen detektiert worden: sie lernen langsamer, wo sich eine versteckte Plattform im *Morris Water Maze* befindet, und sie sind wesentlich weniger ängstlich, da sie sich im Licht–Dunkel–Test weniger lange im Dunkeln aufhalten als ihre Wildtyp–Artgenossen (Tunquist *et al.* 2008).

Noch stärkere Defizite in der LTD, aber auch in der LTP, weisen Mäuse auf, die ein mutiertes AKAP150 exprimieren, dessen PKA–Bindungssequenz deletiert wurde (Weisenhaus *et al.* 2010). Dieser in elektrophysiologischen Tests gemessene Befund spiegelt sich im langsameren reversiblen Lernen dieser Mäuse wider. Das mutierte AKAP150–Protein in diesen Mäusen bindet normal an alle seine Interaktionspartner, mit Ausnahme der PKA. Die Autoren spekulieren, dass das Gleichgewicht zwischen Kinasen und Phosphatasen durch den Wegfall der durch AKAP150 rekrutierten PKA in den mutierten Mäusen gestört ist und dadurch die beobachteten Effekte hervorgerufen werden (Weisenhaus *et al.* 2010).

Das zeigt, dass die Veränderung bzw. Mutation eines kleinen Teils des AKAP79/150–Proteins spürbare Einflüsse auf synaptische Prozesse haben kann, die sogar über den Effekt eines kompletten Knockouts von AKAP150 hinausgehen. Somit wäre es denkbar, dass auch eine Veränderung der Proteinstruktur einen Einfluss auf die Assoziation von AKAP79 mit den genannten Proteinen und Strukturen haben könnte.

4.7. Unterschiede und Gemeinsamkeiten beider AKAP79-Allele

In der Arbeitsgruppe „Imaging Genetics“ wurden die Konsequenzen des Aminosäureaustauschs an Position 100 des humanen AKAP79-Proteins untersucht. Auf neuropsychologischer Ebene wurde ein Unterschied zwischen beiden Allelen in Form eines signifikanten Einflusses des Polymorphismus auf das physische Aggressionsverhalten und die Ärgerkontrolle gefunden (Richter *et al.* 2011). Außerdem weichen die im fMRT gemessenen Aktivitätsmuster im ACC und OFC während der Durchführung einer mit emotionalen Stimuli unterlegten Flanker-Aufgabe zwischen den Trägern ohne und denen mit mindestens einem Leucin-Allel signifikant voneinander ab (Richter *et al.* 2011).

Da aggressives Verhalten unter anderem mit Beta-Rezeptorblockern behandelt werden kann, wird davon ausgegangen, dass Signalwege Beta-adrenerger Rezeptoren Aggressionen beeinflussen (Fava 1997). Der Beta-2-adrenerge Rezeptor bindet laut Fraser *et al.* direkt im N-terminalen Teil von AKAP79/150 und könnte somit Vermittler des Effekts des Polymorphismus auf das Aggressionsverhalten sein (Fraser *et al.* 2000). Um diese Spekulation zu überprüfen, wurden im Laufe dieser Arbeit Bindungsversuche mit dem vollständigen oder Fragmenten des Beta-2-adrenergen Rezeptors gemacht. Jedoch konnte die Interaktion im Zuge dieser Arbeit nicht bestätigt werden und die Versuche wurden abgebrochen.

Computerprädiktionsprogramme wie GOR IV, HNN und PEPFOLD sagen eine Veränderung der Struktur des Proteins um den Polymorphismus voraus (Garnier *et al.* 1996, Guermeur *et al.* 1999, Maupetit *et al.* 2009). Diese Strukturveränderung könnte einen Einfluss auf die Membranassoziation der beiden AKAP79-Allele haben. Die zwei durchgeführten Membranfraktionierungen vermittelten übereinstimmend den Eindruck, als wäre das AKAP79-L-Allel in Ca^{2+} -haltigem Puffer etwas besser löslich und damit schwächer mit Membranen und dem Cytoskelett assoziiert, wohingegen die Löslichkeit des P-Allels nicht vom Ca^{2+} -Gehalt des Puffers abhängig zu sein schien (Abb. 11 und Tab. 35). Allerdings variieren die Ergebnisse beider Fraktionierungen so stark, dass sie nicht direkt vergleichbar sind.

Einen Einfluss auf das Ergebnis der ersten Fraktionierung könnte die geringere Expressionsmenge des P-Allels im Vergleich zum L-Allel haben. Das Expressionsniveau könnte auch die Aggregatbildung beeinflussen, welche nach Expression der beiden N-terminalen AKAP79-Fragmente in Cos7-Zellen beobachtet wurde. Somit würde auch die Löslichkeit beeinflusst. Des Weiteren könnte die Exposition des mit ECL-Reagenz gefärbten Ergebnisblots der zweiten Fraktionierung etwas zu lang gewählt worden sein, so dass die Banden der P100-Fractionen zu stark gefärbt wurden und die gemessene optische Dichte nicht mehr im linearen Bereich liegt und damit ein verfälschtes Ergebnis liefert (Abb. 11).

Die nachfolgende Untersuchung der Flotation beider AKAP79-Allele in Ca^{2+} -haltigem und -freiem Puffer ergab keinen messbaren Unterschied in der Membranassoziation des P- und des L-Allels (Abb. 12 und 13), wobei auch hier methodenbedingte Unzulänglichkeiten durch zu schwache oder zu starke Exposition der Blots bzw. einzelner Banden in Kauf genommen werden mussten. In weiteren auf SDS-PAGE basierenden Analysen sollte deshalb die Färbung der Blots mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern bevorzugt werden, da deren Fluoreszenzstärke über einen größeren Bereich proportional und linear zur aufgetragenen Proteinmenge ist (Zellner *et al.* 2008).

Ein überraschendes Ergebnis lieferte die Expression von AKAP79 in primären Neuronen: es wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Allelen bezüglich ihrer postsynaptischen Co-Lokalisation mit Homer gefunden (Abb. 14 und 15 und Tab. 36). Homer diente in dem Experiment als Markerprotein der PSD. Bisher besteht kein Hinweis auf eine direkte Bindung zwischen beiden Proteinen, aber die in der PSD integrierten Proteine sind stark untereinander vernetzt. Das Leucin-Allel lokalisiert verstärkt in Homer-positiven Postsynapsen im Vergleich zum Prolin-Allel. Ein Nachteil dieser Co-Färbungen ist der Fakt, dass es sich bei den AKAP79-Allelen um nicht-endogene, überexprimierte Proteine handelt, welche nicht unbedingt den *in vivo* Zustand widerspiegeln müssen. Dennoch sollte das Ergebnis durch analoge Experimente zur Quantifizierung der Co-Lokalisation mit weiteren postsynaptischen Markerproteinen, zum Beispiel PSD-95, überprüft werden, da es sich hierbei um den bisher einzigen Hinweis auf einen signifikanten Unterschied zwischen beiden AKAP79-Allelen und damit auf eine zellbiologische Erklärung der gefundenen neuropsychologischen Signifikanzen handelt. Alternativ könnte eine PSD-Aufreinigung AKAP79-transfizierter primärer Neuronenkulturen nach Cotman et al. erfolgen, wobei die Menge des jeweiligen AKAP79-Allels nach anschließender SDS-PAGE und Färbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern abgeschätzt werden könnte (Cotman et al. 1974). Für ein solches Experiment müssten allerdings hohe Expressionsraten gewährleistet sein, welche vor allem durch virale Transfektionssysteme erzielt werden können.

AKAP79/150 ist für die Verankerung der PKA, der PKC, CaN/PP2B und PP1 in der PSD verantwortlich (Carr et al. 1992, Coghlan et al. 1995b, Klauck et al. 1996, Le et al. 2011). Es wäre somit denkbar, dass ein verstärktes Vorhandensein des Leucin-Alles in der PSD im Vergleich zum Prolin-Allel ebenfalls eine verstärkte Lokalisation der AKAP79/150-Bindungspartner in der PSD zur Folge hat.

Die durch AKAP79/150 an der PSD verankerten Kinasen und Phosphatasen regulieren das Phosphorylierungslevel der Proteine in der PSD, unter anderem der AMPA- und NMDA-Rezeptoren, sowie bestimmter Ionenkanäle, zum Beispiel des spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanals $\text{Ca}_v1.2$, des M-Typ K^+ -Kanals KCNQ und des A-Typ K^+ -Kanals $\text{K}_v4.2$ (Oliveria et al. 2007, Higashida et al. 2005, Bal et al. 2010, Lin et al. 2011). Dabei werden die Erregbarkeit, die Transmission und Prozesse synaptischer Plastizität gesteuert, sodass es denkbar wäre, dass diese durch den Polymorphismus betroffen sein könnten.

AKAP79-Überexpression in unreifen Neuronen hat darüber hinaus Einfluss auf die Größe und Dichte postsynaptischer Spines und auf die Lokalisation und Aktivität postsynaptischer AMPA-Rezeptoren (Robertson et al. 2009). Es wäre demnach interessant zu überprüfen, ob das AKAP79-Leucin-Allel einen, wenn auch nur minimalen, Effekt auf die Spine-Größe und das Vorhandensein von AMPA-Rezeptoren in der PSD hat.

Während die Bindung beider AKAP79-Allele an CaM äquivalent war, zeigte sich in der Bindung an das Ca^{2+} -Sensor-Protein Caldendrin ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Allelen im Pulldown-Assay (Abb. 31 und 32 und Tab. 40). Das Leucin-Allel schien stärker an Caldendrin zu binden, als das Prolin-Allel. Dieser Unterschied konnte jedoch von den SPR-Messungen nicht bestätigt werden (Tab. 42). Im Gegenteil verzeichneten die SPR-Messungen eher einen umgekehrten Trend, nämlich dass Caldendrin mit geringfügig höherer Affinität an das Prolin-Allel bindet im Vergleich zum Leucin-Allel. Allerdings wurde hier keine Signifikanz erreicht.

Die unterschiedlichen Ergebnisse aus beiden Methoden könnten auf unterschiedliche Qualitäten der eingesetzten Proteine zurückzuführen sein, da sie aus verschiedenen Aufreinigungschargen

stammen. Außerdem könnten die Charakteristika des experimentellen Aufbaus der beiden verschiedenen Methoden, zum Beispiel die Immobilisierung eines der Interaktionspartner auf einer Chip-Oberfläche anstelle seiner GST-vermittelten Kopplung an frei bewegliche Sepharose-Beads, einen Einfluss auf das Verhalten der Bindungspartner haben.

Im Endeffekt sollten die mit der SPR-Methode erhaltenen Ergebnisse höher bewertet werden, da diese Methode wesentlich genauer ist und die Ergebnisse sehr gut reproduzierbar sind. Selbst bei sorgfältigster Arbeitsweise liegen auf dem Weg zur vollständigen Auswertung der Pulldown-Experimente mehrere Arbeitsschritte, welche zu Variationen im Endergebnis beitragen können, wohingegen die Interaktionsmessungen an Biacore-Geräten direkt ohne Zwischenschritte erfolgen.

4.8. Schlussfolgerung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit lässt sich in zwei wesentliche Abschnitte unterteilen. Zunächst wurde nach einem Unterschied zwischen den Allelen des AKAP79-Pro100Leu-Polymorphismus gesucht, welcher die dargestellten humanexperimentellen Befunde erklären könnte. Es wurde ein signifikanter Unterschied in der postsynaptischen Co-Lokalisation mit Homer gefunden, der aber noch durch weitere Experimente überprüft werden sollte.

Ein verstärktes Vorhandensein des AKAP79-Leucin-Allels in der PSD könnte eine ebenfalls verstärkte Lokalisation der direkt oder indirekt an AKAP79/150 gebundenen Proteine nach sich ziehen und darüber einen Einfluss auf die synaptische Transmission, Morphologie und Prozesse synaptischer Plastizität, wie der LTP oder der LTD, ausüben. Diese Spekulationen könnten durch weitere Bindungsexperimente, immunocytochemische Co-Lokalisationsstudien, Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Studien und Messungen der Dichte und Größe der Synapsen überprüft werden.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Bindung der Ca^{2+} -Sensoren CaM und Caldendrin an AKAP79/150. Die Bindung von CaM an die zweite vorhergesagte AKAP79-Sequenz konnte experimentell bestätigt werden. Darüber hinaus wurde Caldendrin als neuer AKAP79/150-Bindungspartner identifiziert. Die Bindungssequenzen beider Ca^{2+} -Sensoren überlappen zwar, aber Caldendrin braucht zur Ausbildung der Interaktion eine N-terminale Sequenzverlängerung in AKAP79-B. Außerdem weisen beide Interaktionen verschiedene Bindungsmechanismen und Ca^{2+} -Abhängigkeiten auf. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass, in Anwesenheit von Ca^{2+} , CaM zwar den zeitabhängigen Wettlauf mit Caldendrin um die Bindung an AKAP79 gewinnt, aber Caldendrin, mit und ohne Ca^{2+} , die längere Ausdauer hat und das stabilere Verhältnis zu AKAP79/150 ausbildet.

Interessant wäre es herauszufinden, in welchem Bereich der N-terminalen polybasischen AKAP79-Domänen F-Actin bindet. Bezüglich seiner Bindung an den N-terminalen Teil von AKAP79/150 steht es in Konkurrenz zu CaM – würde es auch mit Caldendrin kompetieren? Oder gibt es einen anderen Mechanismus, der die Interaktion zwischen AKAP79/150 und Caldendrin reguliert? Es wäre zum Beispiel möglich, dass Phosphorylierungen bestimmter Aminosäurereste in AKAP79/150 oder Caldendrin das Zustandekommen der Bindung verhindern, oder dass Caldendrin die Phosphorylierung von AKAP79/150 an der Bindungssequenz verhindert, so dass Bindungen anderer Proteine an AKAP79/150 unterbunden werden.

Eine weitere interessante Option wäre, den C-terminalen, CaM-ähnlichen Teil von Caldendrin aufzuteilen und das N-terminale und C-terminale EF-Hand-Paar einzeln auf ihre Bindung an AKAP79/150 zu untersuchen. Es könnte sein, dass beide EF-Hand-Paare unabhängig voneinander an AKAP79 binden, in Analogie zum L-Typ spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanal $\text{Ca}_v1.2$ (Findeisen & Minor 2010). Bindungsexperimente mit beiden EF-Hand-Paaren könnten darüber hinaus Aufschluss erteilen über die Frage, welchem Bindungsmodell die Interaktion zwischen beiden Proteinen entspricht.

Interessant wäre des Weiteren, die Lokalisation von Caldendrin in AKAP150-Knockout-Mäusen zu beobachten. Es könnte die Frage beantworten, inwieweit AKAP150 für die postsynaptische Lokalisation von Caldendrin verantwortlich ist und ob andere Lokalisationsmechanismen wie die cytoskelettäre Assoziation von Caldendrin oder die Bindung an Ca^{2+} -Kanäle das Fehlen von AKAP150 kompensieren können.

In der vorliegenden Arbeit wurden weitere Erkenntnisse über das Adapterprotein AKAP79/150 gewonnen. Seine Integration in das postsynaptische Proteinnetzwerk scheint durch einen Aminosäureaustausch an Position 100 im humanen AKAP79-Protein beeinflusst zu werden. Und der in dieser Arbeit identifizierte Interaktionspartner Caldendrin stellt mit seiner ungewöhnlich starken Bindung an AKAP79 einen interessanten neuen Mitspieler in den Geschehnissen und Interaktionen an der durch AKAP79/150 assemblierten Signalplattform dar.

*„Die Natur hat sich so viel Freiheit vorbehalten,
dass wir mit Wissen und Wissenschaft ihr nicht durchgängig beikommen
oder sie in die Enge treiben können.“
(Johann Wolfgang Goethe)*

5. Referenzen

- Adler, E. M., Augustine, G. J., Duffy, S. N. and Charlton, M. P. (1991) Alien intracellular calcium chelators attenuate neurotransmitter release at the squid giant synapse. *J Neurosci*, **11**, 1496-1507.
- Andreasen, T. J., Luetje, C. W., Heideman, W. and Storm, D. R. (1983) Purification of a novel calmodulin binding protein from bovine cerebral cortex membranes. *Biochemistry*, **22**, 4615-4618.
- Bal, M., Zhang, J., Hernandez, C. C., Zaika, O. and Shapiro, M. S. (2010) Ca²⁺/calmodulin disrupts AKAP79/150 interactions with KCNQ (M-Type) K⁺ channels. *J Neurosci*, **30**, 2311-2323.
- Bauman, A. L., Soughayer, J., Nguyen, B. T. et al. (2006) Dynamic regulation of cAMP synthesis through anchored PKA-adenylyl cyclase V/VI complexes. *Mol Cell*, **23**, 925-931.
- Bear, M. F. and Malenka, R. C. (1994) Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr Opin Neurobiol*, **4**, 389-399.
- Benfenati, F. (2007) Synaptic plasticity and the neurobiology of learning and memory. *Acta Biomed*, **78 Suppl 1**, 58-66.
- Benke, T. A., Luthi, A., Isaac, J. T. and Collingridge, G. L. (1998) Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity. *Nature*, **393**, 793-797.
- Berridge, M. J. (1998) Neuronal calcium signaling. *Neuron*, **21**, 13-26.
- Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-1523.
- Bregman, D. B., Bhattacharyya, N. and Rubin, C. S. (1989) High affinity binding protein for the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase II-B. Cloning, characterization, and expression of cDNAs for rat brain P150. *J Biol Chem*, **264**, 4648-4656.
- Buss, A. H. and Perry, M. (1992) The aggression questionnaire. *J Pers Soc Psychol*, **63**, 452-459.
- Carr, D. W., Stofko-Hahn, R. E., Fraser, I. D., Cone, R. D. and Scott, J. D. (1992) Localization of the cAMP-dependent protein kinase to the postsynaptic densities by A-kinase anchoring proteins. Characterization of AKAP 79. *J Biol Chem*, **267**, 16816-16823.
- Chattopadhyaya, R., Meador, W. E., Means, A. R. and Quijcho, F. A. (1992) Calmodulin structure refined at 1.7 Å resolution. *J Mol Biol*, **228**, 1177-1192.
- Cheung, W. Y. (1970) Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase. Demonstration of an activator. *Biochem Biophys Res Commun*, **38**, 533-538.
- Coghlan, V. M., Hausken, Z. E. and Scott, J. D. (1995a) Subcellular targeting of kinases and phosphatases by association with bifunctional anchoring proteins. *Biochem Soc Trans*, **23**, 592-596.
- Coghlan, V. M., Perrino, B. A., Howard, M., Langeberg, L. K., Hicks, J. B., Gallatin, W. M. and Scott, J. D. (1995b) Association of protein kinase A and protein phosphatase 2B with a common anchoring protein. *Science*, **267**, 108-111.
- Colledge, M., Dean, R. A., Scott, G. K., Langeberg, L. K., Haganir, R. L. and Scott, J. D. (2000) Targeting of PKA to glutamate receptors through a MAGUK-AKAP complex. *Neuron*, **27**, 107-119.
- Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W., Roses, A. D., Haines, J. L. and Pericak-Vance, M. A. (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, **261**, 921-923.
- Cotman, C. W., Banker, G., Churchill, L. and Taylor, D. (1974) Isolation of postsynaptic densities from rat brain. *J Cell Biol*, **63**, 441-455.
- Cox, J. A. (1988) Interactive properties of calmodulin. *Biochem J*, **249**, 621-629.
- Cull-Candy, S., Kelly, L. and Farrant, M. (2006) Regulation of Ca²⁺-permeable AMPA receptors: synaptic plasticity and beyond. *Curr Opin Neurobiol*, **16**, 288-297.

- Delint-Ramirez, I., Willoughby, D., Hammond, G. V., Ayling, L. J. and Cooper, D. M. (2011) Palmitoylation targets AKAP79 protein to lipid rafts and promotes its regulation of calcium-sensitive adenylyl cyclase type 8. *J Biol Chem*, **286**, 32962-32975.
- Dell'Acqua, M. L., Dodge, K. L., Tavalin, S. J. and Scott, J. D. (2002) Mapping the protein phosphatase-2B anchoring site on AKAP79. Binding and inhibition of phosphatase activity are mediated by residues 315-360. *J Biol Chem*, **277**, 48796-48802.
- Dell'Acqua, M. L., Faux, M. C., Thorburn, J., Thorburn, A. and Scott, J. D. (1998) Membrane-targeting sequences on AKAP79 bind phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate. *EMBO J*, **17**, 2246-2260.
- Dell'Acqua, M. L., Smith, K. E., Gorski, J. A., Horne, E. A., Gibson, E. S. and Gomez, L. L. (2006) Regulation of neuronal PKA signaling through AKAP targeting dynamics. *Eur J Cell Biol*, **85**, 627-633.
- DeMarco, S. J. and Strehler, E. E. (2001) Plasma membrane Ca²⁺-atpase isoforms 2b and 4b interact promiscuously and selectively with members of the membrane-associated guanylate kinase family of PDZ (PSD95/Dlg/ZO-1) domain-containing proteins. *J Biol Chem*, **276**, 21594-21600.
- Dieterich, D. C., Karpova, A., Mikhaylova, M. et al. (2008) Caldendrin-Jacob: a protein liaison that couples NMDA receptor signalling to the nucleus. *PLoS Biol*, **6**, e34.
- Eckel-Mahan, K. L. and Storm, D. R. (2008) 4.21 - Second Messengers: Calcium and cAMP Signaling. In: *Learning and Memory: A Comprehensive Reference*, (H. B. Editor-in-Chief: John ed.), pp. 427-448. Academic Press, Oxford.
- Efendiev, R., Samelson, B. K., Nguyen, B. T., Phatarpekar, P. V., Baameur, F., Scott, J. D. and Dessauer, C. W. (2010) AKAP79 interacts with multiple adenylyl cyclase (AC) isoforms and scaffolds AC5 and -6 to alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate (AMPA) receptors. *J Biol Chem*, **285**, 14450-14458.
- Ehlers, M. D. (1999) Synapse structure: Glutamate receptors connected by the shanks. *Current Biology*, **9**, R848-R850.
- Elgersma, Y. and Silva, A. J. (1999) Molecular mechanisms of synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol*, **9**, 209-213.
- Eriksen, B., and Eriksen, C. (1974) Effects of noise letters upon identification of a target letter in a non- search task. *Perception and Psychophysics*, **16**, 143-149.
- Faux, M. C., Rollins, E. N., Edwards, A. S., Langeberg, L. K., Newton, A. C. and Scott, J. D. (1999) Mechanism of A-kinase-anchoring protein 79 (AKAP79) and protein kinase C interaction. *Biochem J*, **343 Pt 2**, 443-452.
- Faux, M. C. and Scott, J. D. (1997) Regulation of the AKAP79-protein kinase C interaction by Ca²⁺/Calmodulin. *J Biol Chem*, **272**, 17038-17044.
- Fava, M. (1997) Psychopharmacologic treatment of pathologic aggression. *Psychiatr Clin North Am*, **20**, 427-451.
- Findeisen, F. and Minor, D. L., Jr. (2010) Structural basis for the differential effects of CaBP1 and calmodulin on Ca(V)1.2 calcium-dependent inactivation. *Structure*, **18**, 1617-1631.
- Frank, B., Wiestler, M., Kropp, S. et al. (2008) Association of a common AKAP9 variant with breast cancer risk: a collaborative analysis. *J Natl Cancer Inst*, **100**, 437-442.
- Fraser, I. D., Cong, M., Kim, J., Rollins, E. N., Daaka, Y., Lefkowitz, R. J. and Scott, J. D. (2000) Assembly of an A kinase-anchoring protein-beta(2)-adrenergic receptor complex facilitates receptor phosphorylation and signaling. *Curr Biol*, **10**, 409-412.
- Friedberg, F. (1990) Species comparison of calmodulin sequences. *Protein Seq Data Anal*, **3**, 335-337.
- Fries, R., Reddy, P. P., Mikhaylova, M., Haverkamp, S., Wei, T., Muller, M., Kreutz, M. R. and Koch, K. W. (2010) Dynamic cellular translocation of caldendrin is facilitated by the Ca²⁺-myristoyl switch of recoverin. *J Neurochem*, **113**, 1150-1162.
- Gao, S., Wang, H. Y. and Malbon, C. C. (2011) AKAP5 and AKAP12 Form Homo-oligomers. *J Mol Signal*, **6**, 3.

- Garnier, J., Gibrat, J. F. and Robson, B. (1996) GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. *Methods Enzymol*, **266**, 540-553.
- Garrison, J. C. and Wagner, J. D. (1982) Glucagon and the Ca²⁺-linked hormones angiotensin II, norepinephrine, and vasopressin stimulate the phosphorylation of distinct substrates in intact hepatocytes. *J Biol Chem*, **257**, 13135-13143.
- Glantz, S. B., Amat, J. A. and Rubin, C. S. (1992) cAMP signaling in neurons: patterns of neuronal expression and intracellular localization for a novel protein, AKAP 150, that anchors the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase II beta. *Mol Biol Cell*, **3**, 1215-1228.
- Glantz, S. B., Li, Y. and Rubin, C. S. (1993) Characterization of distinct tethering and intracellular targeting domains in AKAP75, a protein that links cAMP-dependent protein kinase II beta to the cytoskeleton. *J Biol Chem*, **268**, 12796-12804.
- Gold, M. G., Stengel, F., Nygren, P. J., Weisbrod, C. R., Bruce, J. E., Robinson, C. V., Barford, D. and Scott, J. D. (2011) Architecture and dynamics of an A-kinase anchoring protein 79 (AKAP79) signaling complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 6426-6431.
- Gomez, L. L., Alam, S., Smith, K. E., Horne, E. and Dell'Acqua, M. L. (2002) Regulation of A-kinase anchoring protein 79/150-cAMP-dependent protein kinase postsynaptic targeting by NMDA receptor activation of calcineurin and remodeling of dendritic actin. *J Neurosci*, **22**, 7027-7044.
- Gorski, J. A., Gomez, L. L., Scott, J. D. and Dell'Acqua, M. L. (2005) Association of an A-kinase-anchoring protein signaling scaffold with cadherin adhesion molecules in neurons and epithelial cells. *Mol Biol Cell*, **16**, 3574-3590.
- Greenwood, P. E. and Nikulin, M. S. (1996) *A guide to chi-squared testing*: Wiley series in probability and statistics. Applied probability and statistics. Wiley, New York.
- Guermeur, Y., Geourjon, C., Gallinari, P. and Deleage, G. (1999) Improved performance in protein secondary structure prediction by inhomogeneous score combination. *Bioinformatics*, **15**, 413-421.
- Haeseleer, F., Sokal, I., Verlinde, C. L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Pronin, A. N., Benovic, J. L., Fariss, R. N. and Palczewski, K. (2000) Five members of a novel Ca²⁺-binding protein (CABP) subfamily with similarity to calmodulin. *J Biol Chem*, **275**, 1247-1260.
- HapMap, T. I. H. C. (2003) The International HapMap Project. *Nature*, **426**, 789-796.
- Hardy, G. H. (1908) Mendelian Proportions in a Mixed Population. *Science*, **28**, 49-50.
- Hart, S. J., Green, S. R., Casp, M. and Belger, A. (2010) Emotional priming effects during Stroop task performance. *Neuroimage*, **49**, 2662-2670.
- Haynes, L. P., Tepikin, A. V. and Burgoyne, R. D. (2004) Calcium-binding protein 1 is an inhibitor of agonist-evoked, inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated calcium signaling. *J Biol Chem*, **279**, 547-555.
- Higashida, H., Hoshi, N., Zhang, J. S., Yokoyama, S., Hashii, M., Jin, D., Noda, M. and Robbins, J. (2005) Protein kinase C bound with A-kinase anchoring protein is involved in muscarinic receptor-activated modulation of M-type KCNQ potassium channels. *Neurosci Res*, **51**, 231-234.
- Hirsch, A. H., Glantz, S. B., Li, Y., You, Y. and Rubin, C. S. (1992) Cloning and expression of an intron-less gene for AKAP 75, an anchor protein for the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase II beta. *J Biol Chem*, **267**, 2131-2134.
- Howland, J. G. and Wang, Y. T. (2008) Synaptic plasticity in learning and memory: stress effects in the hippocampus. *Prog Brain Res*, **169**, 145-158.
- Ikura, M. (1996) Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. *Trends Biochem Sci*, **21**, 14-17.
- Jurado, L. A., Chockalingam, P. S. and Jarrett, H. W. (1999) Apocalmodulin. *Physiol Rev*, **79**, 661-682.
- Kakiuchi, S. and Yamazaki, R. (1970) Calcium dependent phosphodiesterase activity and its activating factor (PAF) from brain studies on cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase (3). *Biochem Biophys Res Commun*, **41**, 1104-1110.

- Kan, M. C., Oruganty-Das, A., Cooper-Morgan, A., Jin, G., Swanger, S. A., Bassell, G. J., Florman, H., van Leyen, K. and Richter, J. D. (2010) CPEB4 is a cell survival protein retained in the nucleus upon ischemia or endoplasmic reticulum calcium depletion. *Mol Cell Biol*, **30**, 5658-5671.
- Karlsson, R. and Falt, A. (1997) Experimental design for kinetic analysis of protein-protein interactions with surface plasmon resonance biosensors. *J Immunol Methods*, **200**, 121-133.
- Karlsson, R., Katsamba, P. S., Nordin, H., Pol, E. and Myszka, D. G. (2006) Analyzing a kinetic titration series using affinity biosensors. *Anal Biochem*, **349**, 136-147.
- Kasri, N. N., Holmes, A. M., Bultynck, G. et al. (2004) Regulation of InsP3 receptor activity by neuronal Ca²⁺-binding proteins. *EMBO J*, **23**, 312-321.
- Keith, D. J., Sanderson, J. L., Gibson, E. S., Woolfrey, K. M., Robertson, H. R., Olszewski, K., Kang, R., El-Husseini, A. and Dell'acqua, M. L. (2012) Palmitoylation of a-kinase anchoring protein 79/150 regulates dendritic endosomal targeting and synaptic plasticity mechanisms. *J Neurosci*, **32**, 7119-7136.
- Keller, D. X., Franks, K. M., Bartol, T. M., Jr. and Sejnowski, T. J. (2008) Calmodulin activation by calcium transients in the postsynaptic density of dendritic spines. *PLoS One*, **3**, e2045.
- Kim, E. and Sheng, M. (2009) The postsynaptic density. *Current Biology*, **19**, R723-R724.
- Klauck, T. M., Faux, M. C., Labudda, K., Langeberg, L. K., Jaken, S. and Scott, J. D. (1996) Coordination of three signaling enzymes by AKAP79, a mammalian scaffold protein. *Science*, **271**, 1589-1592.
- Kornau, H. C. (2009) Postsynaptic Density/Architecture at Excitatory Synapses. In: *Encyclopedia of Neuroscience*, (R. S. Editor-in-Chief: Larry ed.), pp. 809-815. Academic Press, Oxford.
- Kretsinger, R. H. and Nockolds, C. E. (1973) Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description. *J Biol Chem*, **248**, 3313-3326.
- Kringelbach, M. L. (2005) The human orbitofrontal cortex: linking reward to hedonic experience. *Nat Rev Neurosci*, **6**, 691-702.
- Kubota, Y. and Waxham, M. N. (2010) Lobe specific Ca²⁺-calmodulin nano-domain in neuronal spines: a single molecule level analysis. *PLoS Comput Biol*, **6**, e1000987.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Laube, G., Seidenbecher, C. I., Richter, K. et al. (2002) The neuron-specific Ca²⁺-binding protein caldendrin: gene structure, splice isoforms, and expression in the rat central nervous system. *Mol Cell Neurosci*, **19**, 459-475.
- Le, A. V., Tavalin, S. J. and Dodge-Kafka, K. L. (2011) Identification of AKAP79 as a protein phosphatase 1 catalytic binding protein. *Biochemistry*, **50**, 5279-5291.
- Lee, A., Westenbroek, R. E., Haeseleer, F., Palczewski, K., Scheuer, T. and Catterall, W. A. (2002) Differential modulation of Ca(v)2.1 channels by calmodulin and Ca²⁺-binding protein 1. *Nat Neurosci*, **5**, 210-217.
- Lee, H. K., Takamiya, K., Han, J. S. et al. (2003) Phosphorylation of the AMPA receptor GluR1 subunit is required for synaptic plasticity and retention of spatial memory. *Cell*, **112**, 631-643.
- Lewit-Bentley, A. and Rety, S. (2000) EF-hand calcium-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol*, **10**, 637-643.
- Li, C., Chan, J., Haeseleer, F., Mikoshiba, K., Palczewski, K., Ikura, M. and Ames, J. B. (2009) Structural insights into Ca²⁺-dependent regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by CaBP1. *J Biol Chem*, **284**, 2472-2481.
- Li, Y., Ndubuka, C. and Rubin, C. S. (1996) A kinase anchor protein 75 targets regulatory (RII) subunits of cAMP-dependent protein kinase II to the cortical actin cytoskeleton in non-neuronal cells. *J Biol Chem*, **271**, 16862-16869.
- Lin, L., Sun, W., Kung, F., Dell'Acqua, M. L. and Hoffman, D. A. (2011) AKAP79/150 impacts intrinsic excitability of hippocampal neurons through phospho-regulation of A-type K⁺ channel trafficking. *J Neurosci*, **31**, 1323-1332.

- Liu, C. and Hermann, T. E. (1978) Characterization of ionomycin as a calcium ionophore. *J Biol Chem*, **253**, 5892-5894.
- Malenka, R. C. (1994) Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD. *Cell*, **78**, 535-538.
- Mansouri, F. A., Tanaka, K. and Buckley, M. J. (2009) Conflict-induced behavioural adjustment: a clue to the executive functions of the prefrontal cortex. *Nat Rev Neurosci*, **10**, 141-152.
- Maravall, M., Mainen, Z. F., Sabatini, B. L. and Svoboda, K. (2000) Estimating intracellular calcium concentrations and buffering without wavelength ratioing. *Biophys J*, **78**, 2655-2667.
- Maupetit, J., Derreumaux, P. and Tuffery, P. (2009) PEP-FOLD: an online resource for de novo peptide structure prediction. *Nucleic Acids Res*, **37**, W498-503.
- Mikhaylova, M., Hradsky, J. and Kreutz, M. R. (2011) Between promiscuity and specificity: novel roles of EF-hand calcium sensors in neuronal Ca²⁺ signalling. *J Neurochem*, **118**, 695-713.
- Mikhaylova, M., Sharma, Y., Reissner, C., Nagel, F., Aravind, P., Rajini, B., Smalla, K. H., Gundelfinger, E. D. and Kreutz, M. R. (2006) Neuronal Ca²⁺ signaling via caldendrin and calneurons. *Biochim Biophys Acta*, **1763**, 1229-1237.
- Minerbi, A., Kahana, R., Goldfeld, L., Kaufman, M., Marom, S. and Ziv, N. E. (2009) Long-term relationships between synaptic tenacity, synaptic remodeling, and network activity. *PLoS Biol*, **7**, e1000136.
- Moita, M. A., Lamprecht, R., Nader, K. and LeDoux, J. E. (2002) A-kinase anchoring proteins in amygdala are involved in auditory fear memory. *Nat Neurosci*, **5**, 837-838.
- Morgan, A. J. and Jacob, R. (1994) Ionomycin enhances Ca²⁺ influx by stimulating store-regulated cation entry and not by a direct action at the plasma membrane. *Biochem J*, **300 (Pt 3)**, 665-672.
- Morton, T. A., Myszka, D. G. and Chaiken, I. M. (1995) Interpreting complex binding kinetics from optical biosensors: a comparison of analysis by linearization, the integrated rate equation, and numerical integration. *Anal Biochem*, **227**, 176-185.
- Muller, A., Kukley, M., Stausberg, P., Beck, H., Muller, W. and Dietrich, D. (2005) Endogenous Ca²⁺ buffer concentration and Ca²⁺ microdomains in hippocampal neurons. *J Neurosci*, **25**, 558-565.
- Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A. and Prochiantz, A. (1984) Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature*, **307**, 462-465.
- Oliveria, S. F., Dell'Acqua, M. L. and Sather, W. A. (2007) AKAP79/150 anchoring of calcineurin controls neuronal L-type Ca²⁺ channel activity and nuclear signaling. *Neuron*, **55**, 261-275.
- Ostroveanu, A., Van der Zee, E. A., Dolga, A. M., Luiten, P. G., Eisel, U. L. and Nijholt, I. M. (2007) A-kinase anchoring protein 150 in the mouse brain is concentrated in areas involved in learning and memory. *Brain Res*, **1145**, 97-107.
- Paarmann, I., Lye, M. F., Lavie, A. and Konrad, M. (2008) Structural requirements for calmodulin binding to membrane-associated guanylate kinase homologs. *Protein Sci*, **17**, 1946-1954.
- Palade, G. E., and Palay, S. L. (1954) Electron microscopic observations of interneuronal and neuromuscular synapses. *Anatomical Record*, **118**, 335-336.
- Park, S., Li, C. and Ames, J. B. (2011) Nuclear magnetic resonance structure of calcium-binding protein 1 in a Ca(2+) -bound closed state: Implications for target recognition. *Protein Sci*.
- Pearson, K. (1900) *On the criterion that a given system of deviations from the probable in the case of a correlated system of variables is such that it can be reasonably supposed to have arisen from random sampling*. London,.
- Popov, N., Schmitt, M., Schulzeck, S. and Matthies, H. (1975) [Reliable micromethod for determination of the protein content in tissue homogenates]. *Acta Biol Med Ger*, **34**, 1441-1446.
- Prichard, L., Deloulme, J. C. and Storm, D. R. (1999) Interactions between neurogranin and calmodulin in vivo. *J Biol Chem*, **274**, 7689-7694.
- Richter, S. (2010) Einfluss genetischer Variabilität des synaptischen Adapterproteins AKAP5 auf Emotion, Exekutivfunktionen und deren Interaktion *Dissertation*.

- Richter, S., Gorny, X., Marco-Pallares, J. et al. (2011) A Potential Role for a Genetic Variation of AKAP5 in Human Aggression and Anger Control. *Front Hum Neurosci*, **5**, 175.
- Robertson, H. R., Gibson, E. S., Benke, T. A. and Dell'Acqua, M. L. (2009) Regulation of postsynaptic structure and function by an A-kinase anchoring protein-membrane-associated guanylate kinase scaffolding complex. *J Neurosci*, **29**, 7929-7943.
- Rosenmund, C., Carr, D. W., Bergeson, S. E., Nilaver, G., Scott, J. D. and Westbrook, G. L. (1994) Anchoring of protein kinase A is required for modulation of AMPA/kainate receptors on hippocampal neurons. *Nature*, **368**, 853-856.
- Rozsa, B., Zelles, T., Vizi, E. S. and Lendvai, B. (2004) Distance-dependent scaling of calcium transients evoked by backpropagating spikes and synaptic activity in dendrites of hippocampal interneurons. *J Neurosci*, **24**, 661-670.
- Sarkar, D., Erlichman, J. and Rubin, C. S. (1984) Identification of a calmodulin-binding protein that co-purifies with the regulatory subunit of brain protein kinase II. *J Biol Chem*, **259**, 9840-9846.
- Schwenkmezger, P. and Hodapp, V. (1991) [A questionnaire for assessing anger and expression of anger]. *Z Klin Psychol Psychopathol Psychother*, **39**, 63-68.
- Scott, J. D. and Santana, L. F. (2010) A-kinase anchoring proteins: getting to the heart of the matter. *Circulation*, **121**, 1264-1271.
- Seeger, C., Gorny, X., Reddy, P. P., Seidenbecher, C. and Danielson, U. H. (2012) Kinetic and mechanistic differences in the interactions between caldendrin and calmodulin with AKAP79 suggest different roles in synaptic function. *Journal of Molecular Recognition*, **in press**.
- Seidenbecher, C. I., Landwehr, M., Smalla, K. H. et al. (2004) Caldendrin but not calmodulin binds to light chain 3 of MAP1A/B: an association with the microtubule cytoskeleton highlighting exclusive binding partners for neuronal Ca(2+)-sensor proteins. *J Mol Biol*, **336**, 957-970.
- Seidenbecher, C. I., Langnaese, K., Sanmarti-Vila, L., Boeckers, T. M., Smalla, K. H., Sabel, B. A., Garner, C. C., Gundelfinger, E. D. and Kreutz, M. R. (1998) Caldendrin, a novel neuronal calcium-binding protein confined to the somato-dendritic compartment. *J Biol Chem*, **273**, 21324-21331.
- Seidenbecher, C. I., Reissner, C. and Kreutz, M. R. (2002) Caldendrins in the inner retina. *Adv Exp Med Biol*, **514**, 451-463.
- Shepherd, J. D. and Huganir, R. L. (2007) The cell biology of synaptic plasticity: AMPA receptor trafficking. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **23**, 613-643.
- Snyder, E. M., Colledge, M., Crozier, R. A., Chen, W. S., Scott, J. D. and Bear, M. F. (2005) Role for A kinase-anchoring proteins (AKAPS) in glutamate receptor trafficking and long term synaptic depression. *J Biol Chem*, **280**, 16962-16968.
- Spielberger, C. D. (1991) State-Trait Anger Expression Inventory: STAXI Professional Manual. *Psychological Assessment Resources, Florida*.
- Tavalin, S. J. (2008) AKAP79 selectively enhances protein kinase C regulation of GluR1 at a Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II/protein kinase C site. *J Biol Chem*, **283**, 11445-11452.
- Tippens, A. L. and Lee, A. (2007) Caldendrin, a neuron-specific modulator of Cav1.2 (L-type) Ca²⁺ channels. *J Biol Chem*, **282**, 8464-8473.
- Tsuriel, S., Geva, R., Zamorano, P., Dresbach, T., Boeckers, T., Gundelfinger, E. D., Garner, C. C. and Ziv, N. E. (2006) Local sharing as a predominant determinant of synaptic matrix molecular dynamics. *PLoS Biol*, **4**, e271.
- Tunquist, B. J., Hoshi, N., Guire, E. S., Zhang, F., Mullendorff, K., Langeberg, L. K., Raber, J. and Scott, J. D. (2008) Loss of AKAP150 perturbs distinct neuronal processes in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 12557-12562.
- Weinberg, W. (1908) Über den Nachweis der Vererbung beim Menschen. *Jahreshefte des Vereins für vaterländische Naturkunde in Württemberg*, **64**, 368-382.

- Weisenhaus, M., Allen, M. L., Yang, L., Lu, Y., Nichols, C. B., Su, T., Hell, J. W. and McKnight, G. S. (2010) Mutations in AKAP5 disrupt dendritic signaling complexes and lead to electrophysiological and behavioral phenotypes in mice. *PLoS One*, **5**, e10325.
- Wingard, J. N., Chan, J., Bosanac, I., Haeseleer, F., Palczewski, K., Ikura, M. and Ames, J. B. (2005) Structural analysis of Mg²⁺ and Ca²⁺ binding to CaBP1, a neuron-specific regulator of calcium channels. *J Biol Chem*, **280**, 37461-37470.
- Xia, Z. and Storm, D. R. (2005) The role of calmodulin as a signal integrator for synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*, **6**, 267-276.
- Zellner, M., Babeluk, R., Diestinger, M., Pirchegger, P., Skeledzic, S. and Oehler, R. (2008) Fluorescence-based Western blotting for quantitation of protein biomarkers in clinical samples. *Electrophoresis*, **29**, 3621-3627.
- Zhang, M., Tanaka, T. and Ikura, M. (1995) Calcium-induced conformational transition revealed by the solution structure of apo calmodulin. *Nat Struct Biol*, **2**, 758-767.
- Zhou, H., Kim, S. A., Kirk, E. A., Tippens, A. L., Sun, H., Haeseleer, F. and Lee, A. (2004) Ca²⁺-binding protein-1 facilitates and forms a postsynaptic complex with Cav1.2 (L-type) Ca²⁺ channels. *J Neurosci*, **24**, 4698-4708.
- Zhou, H., Yu, K., McCoy, K. L. and Lee, A. (2005) Molecular mechanism for divergent regulation of Cav1.2 Ca²⁺ channels by calmodulin and Ca²⁺-binding protein-1. *J Biol Chem*, **280**, 29612-29619.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACC	anteriorer cingulärer Cortex
Adj. Vol.	<i>Adjusted Volume</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AC	Adenylyl-Cyclasen
AKAP	A-Kinase Anker-Protein
AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol Propionsäure/-acid
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BAPTA	<i>1,2-bis(2-amino phenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
bp	Basenpaare
BPS	Borderline Persönlichkeitsstörung
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CaBP1	Ca ²⁺ binding protein 1
CaM	Calmodulin
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Ca _v 2.1	P/Q-Typ spannungsgesteuerter Ca ²⁺ -Kanal
Ca _v 1.2	L-Typ spannungsgesteuerter Ca ²⁺ -Kanal
Co-IP	Co-Immunpräzipitation
Cos7	<i>African green monkey kidney cells</i> (Zelllinie)
CREB	Ca ²⁺ /cAMP response element binding protein
DIV	<i>days in vitro</i>
D-MEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
ECL	<i>Enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF-Hand	Ca ²⁺ -bindende Helix-Loop-Helix Struktur in Proteinen
EGTA	<i>ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
ER	Endoplasmatisches Reticulum
f	Freiheitsgrad
fl	<i>full-length</i>
fMRT	funktionelle Magnetresonanztomographie
g	Erdbeschleunigung
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
gp65	Glycoprotein 65
GST	Glutathion-S-Transferase
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HEK293	<i>Human embryonal kidney cells clone 293</i> (Zelllinie)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

HWG	Hardy–Weinberg–Gleichgewicht
IgG	Immunoglobulin G
IP	Immunpräzipitation
IP ₃	Inositol–1,4,5–triphosphat
IPTG	Isopropyl– β –D–thiogalactosid
KCNQ2/3	M–Typ K ⁺ –Kanal
kD	Kilo Dalton
L, Leu	Leucin
LTD	Langzeitdepression
LTP	Langzeitpotenzierung
MAGuKs	membranassoziierte Guanylat–Kinasen
mbm	Magdeburg–Berlin–Magdeburg
ncbi	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCS	neuronaler Ca ²⁺ –Sensor
NG	NeuroGen
NMDA	N–Methyl–d–Aspartat
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
OFC	orbitofrontaler Cortex
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PI	Abkürzung für die verwendeten Protease–Inhibitor Tabletten von Roche
pl	isoelektrischer Punkt
PIP ₂	Phosphatidylinositol–4,5–biphosphat
PKA	cAMP–abhängigen Proteinkinase, Proteinkinase A
PKC	Ca ²⁺ –abhängiger Proteinkinase, Proteinkinase C
PMCA	Plasmamembranständige Ca ²⁺ ATPasen
PP2B/CaN	Phosphatase 2B/Calcineurin
P, Pro	Prolin
PSD	Postsynaptische Dichte
rpm	Runden pro Minute
RT	Raumtemperatur
RU	<i>Response Units</i>
SDS–PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis</i>
SERCA	<i>Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
SUMO	<i>Small Ubiquitin–like Modifier</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris–Acetat–EDTA
TRPC	<i>transient receptor potential cation</i>
vgl.	vergleiche

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Strukturelle und Schematische Repräsentation von CaBP1/Caldendrin und CaM. ..16
Abb. 2:	Schematische Darstellung von AKAP79/150 und seinen wichtigsten Bindungs- partnern.19
Abb. 3:	Strukturformeln der vom AKAP79 Pro100Leu SNP betroffenen Aminosäuren Prolin und Leucin.21
Abb. 4:	Darstellung des mit Bromphenolblau eingefärbten Saccharosegradienten vor und nach der Ultrazentrifugation.36
Abb. 5:	Proteinstrukturvorhersagen für beide Allele des AKAP79 Pro100Leu SNPs mit Hilfe dreier Prädiktionsprogramme, A) GOR IV, B) HNN und C) PEPFOLD.44
Abb. 6:	Darstellung der Nukleotid-Sequenz des Offenen Leserasters des Thymin-Allels des humanen AKAP5 Gens.45
Abb. 7:	Repräsentativer Ausschnitt eines AKAP79 Pro100Leu Typisierungsgels mit allen Genotypen.46
Abb. 8:	Tabellarische und graphische Zusammenfassung und Veranschaulichung der Ergebnisse der AKAP79 Pro100Leu bzw. AKAP79 C299T Genotypisierung in drei Probandenkohorten und Aufteilung dieser Kohorten in weibliche und männliche Probandengruppen.49
Abb. 9:	GFP-, AKAP79_Prolin-GFP- (AKAP79_P) oder AKAP79_Leucin-GFP- (AKAP79_L) Expression in transfizierten Cos7-Zellen.53
Abb. 10:	Expression von GFP, GFP-N-term_Prolin (N-term_P) und GFP-N-term_Leucin (N-term_L) in Cos7-Zellen.54
Abb. 11:	Ergebnisse von zwei Membranfraktionierungen von GFP-AKAP79-N-term_ Prolin (N-term_P) oder GFP-AKAP79-N-term_Leucin (N-term_L) exprimierenden HEK293-Zellextrakten.55
Abb. 12:	Vergleich der Flotation der N-terminalen AKAP79-Fusionsproteine AKAP79-N- term_Prolin (N-term_P) oder _Leucin (N-term_L) oder des Membranproteins gp65.57
Abb. 13:	Graphische Darstellung der prozentualen Anteile des GFP-AKAP79-N-term_ Prolin (N-term_P) und des GFP-AKAP79-N-term_Leucin (N-term_L) Allels in den Fraktionen eines Flotation Assays.59
Abb. 14:	Transfektion primärer Cortex-Neurone mit AKAP79_Prolin-GFP (AKAP79_P) oder AKAP79_Leucin-GFP (AKAP79_L) und Co-Färbung gegen endogenes Homer zur Abschätzung und Messung der Co-Lokalisation. Im Overlay-Bild ist AKAP79 in grün und Homer in rot dargestellt.60
Abb. 15:	Graphische Darstellung der Mittelwerte (MW) und der Standardabweichung (STABW) der mit OpenView ermittelten Überlappung der Homer-Färbung mit der AKAP79-GFP-Fluoreszenz.61
Abb. 16:	Vorhersage der Wahrscheinlichkeit von CaM-Bindungssequenzen in A) AKAP79, B) AKAP79-A-Domäne, C) AKAP79-B-Domäne und D) AKAP79-C-Domäne, und deren Evaluierung durch die CaM-Target-Database.62/63

Abb. 17:	Schema der Aufteilung von AKAP79 in N- und C-terminale Domänen und Pulldown-Experiment mit CaM-Sepharose und AKAP79-GFP-Fusionskonstrukten.	64
Abb. 18:	Pulldown mit CaM-Sepharose und beiden Varianten der AKAP79-B-Domäne (B_P und B_L).	65
Abb. 19:	Pulldown mit CaM-Sepharose GFP-AKAP79-B_Prolin (B_P) oder GFP-AKAP79-B_Leucin (B_L) und Inkubationszeiten zwischen 10 min – 5 h zur Abschätzung der Kinetik der Interaktion.	67
Abb. 20:	Pulldown mit CaM-Sepharose und GFP-AKAP79-B_Prolin (B_P) oder _Leucin (B_L) oder GFP in Ca ²⁺ - oder EGTA-Puffer.	68
Abb. 21:	Pulldown mit CaM-Sepharose und GFP-AKAP79-B_Prolin im Beisein und in Abwesenheit von Ca ²⁺ und nachträgliche Zugabe von EGTA zur in Ca ²⁺ -Anwesenheit etablierten Bindung.	69
Abb. 22:	Repräsentatives Sensorgramm einer 6xHis-SUMO-AKAP79-B Immobilisierung auf einem CM5-Chip, in welchem die <i>Response Units</i> (RU, y-Achse) gegen die Zeit (x-Achse, [s]) aufgetragen sind.	70
Abb. 23:	Überlagerung repräsentativer Sensorgramme der Bindung unterschiedlicher Konzentrationen von CaM an einen mit 6xHis-SUMO-AKAP79-B_Prolin immobilisierten CM5-Sensorchip.	71
Abb. 24:	Sensorgramm, welches die Calciumabhängigkeit der Bindung von CaM an 6xHis-SUMO-AKAP79-B zeigt.	73
Abb. 25:	GST-Pulldown mit GST-Caldendrin-C-term (GST-CDD) oder GST und AKAP79- <i>full-length</i> -GFP (AKAP79-fl-GFP / AKAP79) oder GFP.	74
Abb. 26:	GST-Pulldown mit GST-Caldendrin-C-term (GST-CDD) oder GST und dem GFP-markierten N-terminalen (N-term) oder C-terminalen (C-term) Teil von AKAP79 oder GFP als Kontrolle.	74
Abb. 27:	GST-Pulldown mit GST-Caldendrin-C-term (GST-CDD) oder GST und den drei basischen N-terminalen AKAP79-Domänen A, B und C.	75
Abb. 28:	GST-Pulldown mit der GST-markierten AKAP79-B-Domäne (GST-B) oder GST und GFP-markiertem <i>full-length</i> Caldendrin (CDD-fl bzw. CDD-fl-GFP) oder GFP als Kontrolle.	75
Abb. 29:	Pulldown mit GST-Caldendrin-C-term und GFP-AKAP79-B_Prolin (B_P) oder _Leucin (B_L) zur Abschätzung der Ca ²⁺ -Abhängigkeit der Bindung.	76
Abb. 30:	Pulldown mit GST-Caldendrin-C-term (GST-CDD) und GFP-AKAP79-B zur Überprüfung der Ca ²⁺ -Unabhängigkeit der Bindung.	77
Abb. 31:	Pulldown mit GST-AKAP79-B_Prolin (B_P), GST-AKAP79-B_Leucin (B_L) oder GST und Caldendrin-Δ21 (CDD-Δ21).	78
Abb. 32:	Graphische Darstellung der Mittelwerte der Proteinanteile in den gebundenen Fraktionen sechs unabhängiger Pulldown-Experimente mit GST-AKAP79-B_Prolin (B_P), GST-AKAP79-B_Leucin (B_L) und Caldendrin-Δ21.	78
Abb. 33:	Sensorgramm der Injektion aufsteigender GST-Caldendrin-C-term (CDD) – Konzentrationen über einen mit 6xHis-SUMO-AKAP79-B_Prolin gekoppelten CM5-Sensorchip.	80

Abb. 34:	Sensorgamm der Bindung von GST–Caldendrin–C–term an 6xHis–SUMO–AKAP79–B_Prolin in Ca^{2+} –haltigem Puffer und Anpassung des Zwei–Stufen–Bindungsmodells.	81
Abb. 35:	Sensorgamm der Bindung von GST–Caldendrin–C–term an 6xHis–SUMO–AKAP79–B in Ca^{2+} –freiem EGTA–Puffer und Anpassung des Zwei–Stufen–Bindungsmodells.	83
Abb. 36:	Fraktionierung von AKAP79 in Triton–Extrakten von humanem <i>post–mortem</i> –Hirnmaterial.	84
Abb. 37:	Co–Immunpräzipitation von AKAP150 mit Caldendrin–Antikörpern aus Hirn–Triton–Extrakt im Beisein von Ca^{2+} oder ohne Ca^{2+} (EGTA).	85
Abb. 38:	Co–Immunpräzipitation aus Rattenhirnextrakt im Beisein von Ca^{2+} oder EGTA mit Kaninchen (rb) anti–Caldendrin (αCDD) Antikörpern oder unspezifischen Kaninchen IgGs (rb IgG) als Kontrolle.	85
Abb. 39:	Co–Lokalisation von AKAP150, Caldendrin (CDD) und PSD–95 in primären hippocampalen Rattenneuronen.	86
Abb. 40:	Auswertung der Co–Lokalisation von AKAP150, Caldendrin und PSD–95 unter verschiedenen Ca^{2+} –Bedingungen.	87
Abb. 41:	Schematische Darstellung der verwendeten B–Domänen Peptide.	88
Abb. 42:	Pulldown mit CaM–Sepharose, GST–Caldendrin–C–term und GFP–AKAP79–B1, –B2 und –B3–Peptiden.	89
Abb. 43:	Pulldown mit CaM–Sepharose, GST–Caldendrin–C–term und GFP–AKAP79–B1/2 und –B2/3–Peptiden.	90
Abb. 44:	Mit Pulldown–Experimenten wurde die Competition zwischen Caldendrin und CaM um die Bindung an AKAP79–B getestet.	91
Abb. 45:	Mit der SPR–Methode wurde auf Competition zwischen Caldendrin und CaM um die Bindung an immobilisiertes 6xHis–SUMO–AKAP79–B getestet.	92
Abb. 46:	Schematische Darstellung der hypothetischen Bindungsereignisse zwischen AKAP79–B (AKAP–B) und den beiden Ca^{2+} –Sensorproteinen Caldendrin (CDD) und CaM.	98

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Überblick über die verwendeten Kits, den entsprechenden Herstellern zugeordnet.	23
Tab. 2:	Überblick über die verwendeten Puffer und Angabe der Zusammensetzung.	23
Tab. 3:	Angabe der verwendeten Bakterienstämme und Zelllinien.	24
Tab. 4:	Überblick über die verwendeten Bakterienmedien und Angabe ihrer Zusammensetzung.	24
Tab. 5:	Überblick über die verwendeten Zellkulturmedien und Angabe ihrer Zusammensetzung.	24
Tab. 6:	Überblick über die eingesetzten primären Antikörper und deren Verwendung.	25
Tab. 7:	Überblick über die eingesetzten sekundären Antikörper und deren Verwendung.	25
Tab. 8:	Überblick über die eingesetzten Vektoren und deren Verwendung.	25
Tab. 9:	Überblick über die verwendeten Fusionskonstrukte: Bezeichnung, Angabe der Aminosäuren des klonierten Proteins, des Vektors und der Klonierungsschnittstellen.	26
Tab. 10:	Angabe der Bezeichnung und Sequenz der Typisierungsprimer des AKAP79 Pro100Leu SNPs.	26
Tab. 11:	Angabe der Bezeichnung und Sequenz der Klonierungssprimer des vollständigen humanen AKAP5-Gens.	26
Tab. 12:	Angabe der Bezeichnung und Zusammensetzung der bei der Mini-Präparation verwendeten Puffer.	27
Tab. 13:	Angabe der Bezeichnung und Zusammensetzung der bei der Agarose-Gelelektrophorese verwendeten Puffer.	28
Tab. 14:	Übersicht der Zusammensetzung eines Ligationsansatzes.	29
Tab. 15:	Übersicht über die Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes und gegebenenfalls Angabe der Hersteller der verwendeten Lösungen.	29
Tab. 16:	Auflistung der Schritte des zur Typisierung verwendeten Mastercycler-Programms.	30
Tab. 17:	Übersicht der Zusammensetzung des zur Typisierung des AKAP79 Pro100Leu SNPs genutzten Restriktionsverdau.	30
Tab. 18:	Übersicht der Zusammensetzung der Transfektionslösungen für eine Transfektion mittels CaPO ₄ -Methode.	30
Tab. 19:	Übersicht der Zusammensetzung der zur Immunfärbung und zum Einbetten verwendeten Puffer.	31
Tab. 20:	Übersicht der Zusammensetzung der zur Proteinbestimmung genutzten Puffer.	32
Tab. 21:	Übersicht der Zusammensetzung der Puffer zur Herstellung von Proteingelen nach Laemmli.	32
Tab. 22:	Übersicht der Zusammensetzung von zwölf 12%-igen Trenngelen und zwölf 3,5%-igen Sammelgelen nach Laemmli.	33

Tab. 23:	Übersicht der Zusammensetzung der Puffer zur Coomassie-Färbung.	33
Tab. 24:	Übersicht der Zusammensetzung der für das Western-Blotting und die Immundetektion benötigten Puffer.	34
Tab. 25:	Übersicht der Zusammensetzung der Puffer für die HEK-Zell- Membranfraktionierung.	35
Tab. 26:	Übersicht zur Herstellung eines 25 – 52,5%-igen Saccharose-Gradienten aus einer 25%-igen und einer 52,5%-igen Saccharose-Stammlösung.	35
Tab. 27:	Übersicht der Zusammensetzung der für die proteinbiochemische Aufarbeitung von Hirngewebe verwendeten Puffer.	36
Tab. 28:	Übersicht der Zusammensetzung der für die Membranfraktionierung von Hirngewebe verwendeten Puffer.	36
Tab. 29:	Übersicht der Zusammensetzung der für die Immunpräzipitation aus Hirngewebeextrakten verwendeten Puffer.	37
Tab. 30:	Übersicht der Zusammensetzung oder Verwendung der Lösungen für die Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen in/aus Bakterien.	37
Tab. 31:	Übersicht der Zusammensetzung oder Verwendung der Lösungen für die Expression und Aufreinigung von 6xHis-SUMO-Fusionsproteinen in/aus Bakterien.....	38
Tab. 32:	Übersicht der Zusammensetzung der im GST-Pulldown Assay verwendeten Puffer.	39
Tab. 33:	Übersicht der Zusammensetzung der Puffer für <i>Surface Plasmon Resonance</i> – Messungen.	40
Tab. 34:	AKAP79 Pro/Leu bzw. C/T –Allelfrequenzen und Abweichung vom HWG ausgedrückt durch den χ^2 –Wert.	50
Tab. 35:	Prozentuale Anteile der Fusionsproteine N-term_P oder N-term_L in der löslichen (S100) und unlöslichen (P100) Fraktion nach der Membranfraktionierung.	56
Tab. 36:	Statistische Auswertung der Co-Lokalisation von Homer und beiden AKAP79- Allelen mittels ungepaartem, zwei-seitigem T-Test.	61
Tab. 37:	Statistische Auswertung der Ergebnisse des Pulldowns mit CaM-Sepharose und beider AKAP79-B-Allele (AKAP79-B_Prolin (AKAP79-B_P) und AKAP79-B- Leucin (AKAP79-B_L)) mittels T-Test.	66
Tab. 38:	Auflistung der optimalen Immobilisierungsbedingungen der Fusionsproteine 6xHis-SUMO-AKAP79-B (SUMO-B) und GST-AKAP79-B (GST-B).	70
Tab. 39:	Auflistung der ermittelten kinetischen Parameter der Interaktion zwischen CaM und 6xHis-SUMO-AKAP79-B_Prolin (B_P) oder -B_Leucin (B_L).	72
Tab. 40:	Statistische Auswertung der Bindung von Caldendrin- Δ 21 an GST-AKAP79- B_Prolin (AKAP79-B_P) oder GST-AKAP79-B_Leucin (AKAP79-B_L).	79
Tab. 41:	Auflistung der durch die Anpassung des Zwei-Stufen-Modells erhaltenen kinetischen Parameter der Bindung zwischen GST-Caldendrin-C-term und 6xHis-SUMO-AKAP79-B.	81
Tab. 42:	Auflistung der aus dem Zwei-Stufen-Bindungsmodell erhaltenen kinetischen Parameter der Interaktion zwischen GST-Caldendrin-C-term und 6xHis- SUMO-AKAP79-B_Prolin (B_P) oder -_Leucin (B_L) und statistische Auswertung der Werte.	82

Tab. 43: Auflistung der durch die Anpassung des Zwei-Stufen-Modells erhaltenen kinetischen Parameter der Bindung zwischen GST-Caldendrin-C-term und 6xHis-SUMO-AKAP79-B in Ca^{2+} -freiem EGTA-Puffer.83

Gleichungsverzeichnis

[1] Summe der Allelfrequenzen eines biallelen Genlocus

$$p + q = 1$$

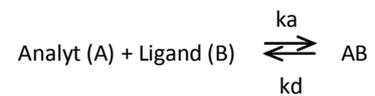
[2] Hardy–Weinberg–Gleichung

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

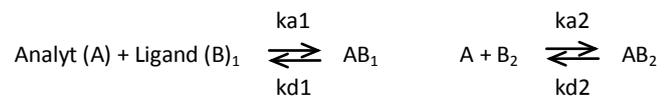
[3] Gleichung zur Ermittlung des χ^2 -Wertes

$$\chi^2 = \sum [\text{beobachtete Anzahl} - \text{erwartete Anzahl}]^2 / \text{erwartete Anzahl}$$

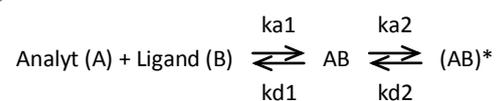
[4] Reaktionsschema des 1:1–Bindungsmodells



[5] Reaktionsschema des heterogenen Liganden Bindungsmodells



[6] Reaktionsschema des Zwei–Stufen bzw. *induced fit* –Bindungsmodells



Erklärung zur eigenständigen Abfassung der Arbeit

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

„Das Adapterprotein AKAP79/150 – Charakterisierung eines genetischen Polymorphismus und eines neuen Bindungspartners“

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

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

Magdeburg, 27.08.2012

Xenia Gorny

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Xenia Gorny
Geburtstag: 20.11.1978
Geburtsort: Altdöbern
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Eltern: Valentina Gorny
Hans-Eberhard Gorny

Promotion

05/2006 – 08/2012 Anfertigung der Promotion
in Kooperation der Abteilungen Verhaltensneurologie und
Neurochemie & Molekularbiologie
des Leibniz-Instituts für Neurobiologie, Magdeburg

Hochschulbildung

10/1999 – 04/2006 Biologie-Studium an der Humboldt-Universität Berlin
04/2006 Abschluss des Diploms
05/2005 – 02/2006 Diplomarbeit in der Abteilung Cytogenetik
der Humboldt-Universität Berlin
04/2002 Abschluss des Vordiploms an der Humboldt-Universität Berlin

Schulbildung

06/1991 – 06/1999 Ernst-Friedrich Gymnasium Berlin,
Abschluss: allgemeine Hochschulreife
09/1987 – 06/1991 17. Oberschule mit erweitertem Russischunterricht, Berlin-Treptow
09/1985 – 09/1987 2. Oberschule „Robert-Koch“, Berlin-Treptow

Publikationen

Gorny et al., 2012 **“AKAP79/150 Interacts with the Neuronal Calcium-Binding Protein Caldendrin”**

Gorny, X., Mikhaylova, M., Seeger, C., Reddy, P. P., Reissner, C., Schott, B. H., Helena Danielson, U., Kreutz, M. R. and Seidenbecher, C.

J Neurochem. 2012 Jun 13.; doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07828.x.; pubmed: 22693956

Richter et al., 2011 **“A Potential Role for a Genetic Variation of AKAP5 in Human Aggression and Anger Control.”**

Richter S, Gorny X, Marco-Pallares J, Krämer UM, Machts J, Barman A, Bernstein HG, Schüle R, Schöls L, Rodriguez-Fornells A, Reissner C, Wüstenberg T, Heinze HJ, Gundelfinger ED, Düzel E, Münte TF, Seidenbecher CI, Schott BH.

Front Hum Neurosci. 2011;5:175. Epub 2011 Dec 29.

Seeger et al., 2012 **“Kinetic and mechanistic differences in the interactions between caldendrin and calmodulin with AKAP79 suggest different roles in synaptic function”**

Seeger, C., Gorny X, Reddy, P. P., Seidenbecher, C., and Danielson, U. Helena

Journal of Molecular Recognition, in press